

UNIVERZITET U BEOGRADU  
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Biljana D. Mirković

**EFEKTI FUNGICIDA NA *Didymella  
applanata* (Niessl.) Sacc. *in vitro* I  
MOGUĆNOST HEMIJSKE ZAŠTITE  
MALINE**

doktorska disertacija

Beograd, 2018.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF AGRICULTURE

Biljana D. Mirković

**EFFECTS OF FUNGICIDES ON  
*Didymella applanata* (Niessl.) Sacc. *in vitro* AND POSSIBILITY OF CHEMICAL  
PROTECTION OF RASPBERRY**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018.

Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet

Mentor: Dr Milan Stević, vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet

Drugi mentor: Dr Brankica Tanović, viši naučni saradnik  
Institut za pesticide i zaštitu životne sredine, Beograd

Članovi komisije: Dr Emil Rekanović, viši naučni saradnik  
Institut za pesticide i zaštitu životne sredine, Beograd

Dr Goran Delibašić, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet

Dr Mihailo Nikolić, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet

Datum odbrane:

*Neizmerno hvala mentoru **prof. dr Milanu Steviću**, sa kojim sam započela svoj naučni rad tokom izrade master rada, a potom ga, na svoje veliko zadovoljstvo, nastavila tokom izrade doktorske disertacije. Zahvaljujem mu se što mi je pružio priliku, obezbedio uslove i imao puno strpljenja i poverenja u mene. Veliku zahvalnost mu dugujem za sve što me je naučio, stičem nova znanja, razvijam kreativnost u eksperimentima i velikom razumevanju od prvih istraživačkih koraka.*

*Beskrajnu zahvalnost dugujem mentoru **dr Brankici Tanović** na nesebičnom angažovanju, svesrdnoj stručnoj pomoći u svim koracima nastajanja ove teze i pruženom znanju prilikom izrade disertacije. Najlepše joj hvala na podršci i savetima tokom mog učenja i eksperimentalnog rada, a pre svega na ukazanom poverenju i pruženoj prilici. Njen izvanredan metodološki pristup mi je pokazao put ka kreativnosti i inventivnosti u nauci, na čemu sam joj neizmerno zahvalna.*

*Najiskrenije hvala cenjenom **prof. dr Petru Vukši** na neprocenjivoj pomoći, uloženoj trudu i usmeravanju prilikom izrade ove doktorske disertacije. Takođe, veliku zahvalnost mu dugujem za nesebičnu podršku za profesionalno usavršavanje i prenošenje znanja i iskustva iz njegove bogate karijere.*

*Zahvalna sam članovima komisije **prof. dr Mihailu Nikoliću**, **prof. dr Goranu Delibašiću** i **dr Emilu Rekanoviću** na korisnim sugestijama prilikom pisanja disertacije.*

*Najlepše hvala profesorima sa Katedre za pesticide na pruženoj stručnoj pomoći, iskrenim savetima i razumevanju.*

*Deo doktorske disertacije urađen je u Institutu za pesticide i zaštitu životne sredine u Zemunu. Zahvaljujem svim kolegama iz Instituta, posebno dragim koleginicama **dr Jovani Hrustić** i **dr Milici Mihajlović** na lepoj i uspešnoj saradnji, pruženoj stručnoj pomoći i velikom strpljenju tokom izrade ovog rada.*

*Naročitu zahvalnost želim da izrazim dragoj drugarici i koleginici **dr Katarini Zečević**, čije su mi sugestije, nesebična pomoć i prijateljski saveti značajno doprineli u izradi disertacije.*

*Takođe, najlepše hvala iskrenim prijateljima i kolegama **Aleksandri Savić**, **Filipu Vranješ**, **Stevanu Jevtiću**, **Milošu Rankoviću**, **Mileni Radivojević** i **Aleksandri Žebeljanin** na pruženoj pomoći, dobronamernim savetima i bezrezervnoj podršci tokom nastajanja ove teze.*

*Beskrajno hvala porodici na ljubavi i podršci.*

# **EFEKTI FUNGICIDA NA *Didymella applanata* (Niessl.) Sacc. *in vitro* I MOGUĆNOST HEMIJSKE ZAŠTITE MALINE**

**Biljana D. Mirković, mast. inž.**

## **REZIME**

Uzorci obolelih izdanaka maline, sa simptomima kestenjaste pegavosti, sakupljeni su tokom četvorogodišnjeg perioda, od 2013. do 2016. godine, u najvažnijim rejonima gajenja ove jagodaste voćne vrste u Srbiji, sa ciljem identifikacije prouzrokovača oboljenja, ispitivanja osetljivosti izolata *D. applanata* na fungicide različitih mehanizama delovanja *in vitro*, kao i uticaja različitih temperatura na toksičnost fungicida *in vitro*. Jedan deo ovog rada bio je posvećen utvrđivanju efikasnosti fungicida u uslovima praktične primene, u kojima je analizirana kako efikasnost fungicida, tako i uloga ukupnog broja i rasporeda tretiranja u odnosu na fenofazu razvoja maline u postignutom nivou zaštite.

Na osnovu proučenih patogenih, morfoloških, odgajivačkih i ekoloških odlika, utvrđeno je da svi izolati pripadaju fitopatogenoj gljivi *Didymella applanata* (Niessl.) Sacc. Identitet izolata potvrđen je analizom sekvenci DNK fragmenta dobijenog univerzalnim ITS1/ITS4 parom prajmera.

Sa ciljem utvrđivanja najboljih uslova za razvoj ovog patogena *in vitro*, proučen je uticaj pet hranljivih podloga: krompir dekstrozna podloga (KDA), ovsena podloga (OA), podloga od malta (MA) i podloga od šargarepe (CA); četiri temperature (20°C, 22°C, 24°C i 26°C) i dva svetlosna uslova (stalni mrak i 12 h svetlost/12 h mrak) na porast micelije izolata *D. applanata*. Najveći porast micelije svih izolata utvrđen je na ovsenoj podlozi (30,4-42,8 mm/7 dana). Takođe, na ovoj podlozi izolati su formirali kolonije ovalnog oblika sa ravnim ivicama. Najveći prosečan porast za većinu izolata bio je na temperaturi 22°C (32,5-40,6 mm/7 dana) i u svetlosnom uslovu 12 h svetlost/12 h mrak (30,3-38,4 mm/7 dana). Na osnovu toga, definisani su uslovi za utvrđivanje osetljivosti izolata na fungicide.

Osetljivost izolata na fungicide iz različitih hemijskih grupa i različitih mehanizama delovanja i to: fungicidi nespecifičnih mehanizama delovanja (Cu-hidroksid, mankozeb, kaptan, hlorotalonil, ditianon) i fungicidi specifičnih mehanizama delovanja (fluopiram, boskalid, azoksistrobin, piraklostrobin, fluazinam, difenokonazol i tebukonazol) u *in vitro* uslovima utvrđena je metodom inhibicije porasta micelije, pri čemu je određivana koncentracija fungicida koja inhibira porast micelije 50% u odnosu na kontrolu ( $EC_{50}$ ) i nagiba regresione linije (b). Faktor rezistentnosti (RF) izračunat je kao odnos  $EC_{50}$  vrednosti posmatranog i  $EC_{50}$  vrednosti najosetljivijeg izolata u istraživanju.

Na osnovu utvrđenih vrednosti srednje efektivne koncentracije ( $EC_{50}$ ), difenokonazol je najviše inhibirao porast micelije izolata (0,23-0,49 mg/L), dok je porast micelije izolata najmanje inhibiran fungicidom Cu-hidroksid ( $EC_{50}$  39,48-51,19 mg/L). Svi izolati su svrstani u kategoriju osetljivih na Cu-hidroksid, mankozeb, kaptan, hlorotalonil, ditianon, difenokonazol i tebukonazol ( $RF < 3$ ). Međutim, utvrđeno je prisustvo visoko rezistentnih izolata na azoksistrobin i piraklostrobin i umereno rezistentnih na fluazinam, boskalid i fluopiram. Vrednosti faktora rezistentnosti za piraklostrobin za pojedine izolate bile su preko 200, a za azoksistrobin preko 5000, dok je RF vrednost za umereno rezistentan izolat na fluazinam iznosila 7,4. Pronađena su četiri umereno rezistentna izolata na boskalid sa faktorom rezistentnosti u rasponu 6,3-11.

Našim istraživanjima je utvrđeno da različite temperature statistički značajno utiču ( $P < 0,05$ ) na toksičnost svih ispitivanih fungicida u *in vitro* uslovima. Takođe, utvrđeno je da je toksičnost većine fungicida bila najveća na najnižoj temperaturi (15°C), a najmanja na najvišoj temperaturi (26°C). Nema objavljenih podataka o uticaju različitih temperatura na toksičnost fungicida *in vitro* za prave gljive.

Utvrđeno je da je u uslovima intenziteta oboljenja u kontroli od 53,7% i 76,3%, najveća efikasnost ostvarena primenom tebukonazola, fluopirama i boskalida (94,7-99,3%). Efikasnost fungicida nespecifičnih mehanizama delovanja (Cu-hidroksid, mankozeb, hlorotalonil i ditianon), bila je u intervalu 64,4-81,7%, što se s obzirom na jak intenzitet oboljenja u kontroli može smatrati dobrom. Međutim, ustanovljena je veoma slaba efikasnost fluazinama (20,2-27,1%), kao i oba fungicida iz grupe strobilurina (13,7-16,2% za azoksistrobin, odnosno 32,9-37,8% za piraklostrobin).

Utvrđeno je da je kritičan period primene tebukonazola kada su izbojci maline oko 25-40 cm dužine. Kada fungicid nije primenjen u ovom periodu, njegova efikasnost iznosila je samo 73,4%, što se statistički značajno razlikovalo od ostvarene efikasnosti u ostalim ispitivanim varijantama.

**Ključne reči:** *Didymella applanata*, fungicidi, osetljivost, rezistentnost, efikasnost, malina

**Naučna oblast:** Biotehničke nauke

**Uža naučna oblast:** Fitofarmacija

**UDK:** 634.711/248.231:632.934/043.31.

**EFFECTS OF FUNGICIDES ON *Didymella applanata* (Niessl.)  
Sacc. *in vitro* AND POSSIBILITY OF CHEMICAL  
PROTECTION OF RASPBERRY**

**Biljana D. Mirković, MSc**

**ABSTRACT**

Samples of diseased raspberry canes, with symptoms of dark brown lesions, were collected during a four-year period, from 2013 to 2016, in the main growing regions of this berry fruit in Serbia with the aim of identifying pathogen of the causal agent of this disease, optimizing the experimental conditions for testing the susceptibility of *D. applanata* isolates to fungicides with different mechanisms of action *in vitro*, as well as the impact of different temperatures on the toxicity of fungicides *in vitro*. The crucial part of this dissertation was devoted to determining the efficacy of fungicides under field conditions, as well as the role of the total number and schedule of applications in relation to the phenological growth stages.

Based on the pathogenic, morphological, cultural and ecological characteristics, it was found that all investigated isolates were identified as phytopathogenic fungus *Didymella applanata* (Niessl.) Sacc. The identity of the isolates was confirmed by analyzing the sequence of the DNA fragment obtained by universal ITS1/ITS4 a pair of primers.

In order to determine the optimal conditions for development of this pathogen *in vitro*, the influence of five culture media: potato dextrose agar (PDA), oatmeal agar (OA), malt extract agar (MEA), Czapek's agar (CzA), and carrot agar (CA); four temperatures (20°C, 22°C, 24°C, and 26°C), and two light regimens (continuous darkness and 12/12 hrs light/darkness) on *D. applanata* mycelial growth rate were assessed. Obtained results showed that the best medium for mycelial growth of all tested isolates was oatmeal agar (30.4-42.8 mm/7-day). In addition, on this medium the isolates formed round shape colonies with entire margin. For majority of the isolates the highest growth rate was at 22°C (32.5-40.6 mm/7-day), and at 12/12 hrs light/darkness



regimen (30.3-38.4 mm/7-day). Based on the obtained results, conditions for testing the susceptibility of isolates to fungicides were defined.

The sensitivity of isolates to fungicides belonging to different chemical groups and with different mechanisms of action: fungicides of a non-specific modes of action (Cu-hydroxide, mancozeb, captan, chlorothalonil, dithianone), and fungicides of a specific modes of action (fluopiram, boscalide, azoxystrobin, pyraclostrobin, fluazinam, difenoconazole and tebuconazole) under *in vitro* conditions was tested by mycelial growth inhibition method. A fungicide concentration that inhibited mycelial growth 50% compared to control ( $EC_{50}$ ), and regression coefficient (b) were determined. A resistance factor (RF) for each isolate-fungicide combination was calculated by dividing the  $EC_{50}$  value for the isolate by the  $EC_{50}$  value for the most sensitive isolate to the particular fungicide.

Based on determined value of  $EC_{50}$ , mycelial growth of isolates was the most inhibited by difenoconazole with  $EC_{50}$  values ranging from 0.23 to 0.49 mg/L, while the lowest mycelial growth inhibition of isolats was achived by using fungicide Cu-hydroxide ( $EC_{50}$  39.48-51.19 mg/L). All the isolates were classified as Cu-hydroxide, mancozeb, captan, chlorothalonil, dithianone, difenoconazole, and tebuconazole-sensitive (RF<3). However, the presence of highly resistant isolates on azoxystrobin and pyraclostrobin, and moderately resistant to fluazinam, boscalid, and fluopiram were detected. Resistance factors for pyraclostrobin for individual isolates were over 200, and for azoxystrobin over 5000, while RF value for moderate-resistant isolate for fluazinam was 7.4. Four moderately resistant isolates to boscalid with a resistance factor ranging from 6.3 to 11 were found.

Our studies showed that different temperatures statistically significantly influence ( $P < 0.05$ ) the toxicity of all tested fungicides under *in vitro* conditions. It was also found that the toxicity of most fungicides was the highest at the lowest temperature (15°C), and the lowest at the highest investigated temperature (26°C). There are no published data of the effect of different temperatures on the toxicity of fungicides *in vitro* for Eumycota.

The results of the present study show that under conditions of disease intensity in control of 53.7% and 76.3%, the highest efficacy was achieved by tebuconazole, fluopiram and boscalid (94.7-99.3%). The efficacy of fungicides of a non-specific

modes of action (Cu-hydroxide, mancozeb, chlorothalonil, and dithianone) was 64.4-81.7%. Considering high disease severity in the field and preventive mode of action of these fungicides, achieved effectiveness can be considered as satisfactory. However, very poor efficacy of fluazinam (20.2-27.1%) was found, as well as of both fungicides from the strobilurin group (13.7-16.2% for azoxystrobin, and 32.9-37.8% for pyraclostrobin).

It has been determined that critical period of application of tebuconazole was when primocanes were about 25-40 cm. By eliminating the use of tebuconazole in this period, the efficacy was only 73.4%, which statistically significantly differed from the achieved efficacy in other investigated variants.

**Key words:** *Didymella applanata*, fungicides, sensitivity, resistance, efficacy, *Rubus idaeus*

**Scientific field:** Biotechnical Science

**Scientific discipline:** Phytopharmacy

**UDC:** 634.711/248.231:632.934/043.31.

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE .....	3
2.1. <i>Didymella applanata</i> - Taksonomska pripadnost i poreklo.....	3
2.2. Biljke domaćini .....	3
2.3. Rasprostranjenost .....	3
2.4. Simptomi oboljenja .....	4
2.5. Osobine patogena .....	5
2.6. Ciklus razvoja .....	6
2.7. Mogućnosti suzbijanja <i>D. applanata</i> .....	7
2.7.1. Selekcija otpornih sorti .....	7
2.7.2. Agrotehničke mere.....	8
2.7.3. Biološke mere .....	9
2.7.4. Hemijske mere .....	10
2.8. Fungicidi namenjeni za suzbijanje <i>D. applanata</i> .....	12
2.8.1. Neorganska jedinjenja bakra.....	12
2.8.2. Ditiokarbamati .....	13
2.8.3. Ftalimidi.....	14
2.8.4. Hloronitrili .....	15
2.8.5. Hinoni .....	16
2.8.6. 2,6-dinitro-anilini.....	16
2.8.7. SDHI fungicidi.....	17
2.8.8. QoI fungicidi.....	18
2.8.9. DMI fungicidi .....	21
3. MATERIJAL I METODE.....	23
3.1. Uzorkovanje i izolacija patogena .....	23
3.2. Provera patogenosti izolata.....	23
3.3. Identifikacija patogena .....	24
3.3.1. Primena klasičnih metoda.....	24
3.3.2. Primena molekularnih metoda .....	24
3.3.2.1. Priprema izolata.....	25
3.3.2.2. Izolacija DNK .....	25
3.3.2.3. Lančana reakcija polimeraze.....	25
3.3.2.4. Vizuelizacija i analiza produkata PCR reakcije .....	26
3.3.2.5. Prečišćavanje i sekvencioniranje.....	26
3.4. Optimizacija eksperimentalnih uslova za ispitivanje osetljivosti izolata <i>D. applanata</i> na fungicide <i>in vitro</i> .....	27
3.4.1. Uticaj hranljivih podloga .....	27
3.4.2. Uticaj temperature.....	28
3.4.3. Uticaj svetlosnih uslova .....	29

3.5. Utvrđivanje osetljivosti izolata <i>D. applanata</i> na fungicide <i>in vitro</i> .....	29
3.5.1. Izolati .....	29
3.5.2. Fungicidi .....	30
3.5.3. Utvrđivanje osetljivosti izolata <i>D. applanata</i> na fungicide .....	30
3.5.4. Utvrđivanje uticaja različitih temperatura na toksičnost fungicida za izolate <i>D. applanata</i> u <i>in vitro</i> uslovima .....	32
3.5.5. Obrada rezultata .....	33
3.6. Ispitivanje efikasnosti fungicida u zaštiti maline od <i>D. applanata</i> .....	34
3.6.1. Utvrđivanje kritičnog perioda za primenu fungicida .....	36
4. REZULTATI .....	37
4.1. Monohifalni izolati .....	37
4.2. Patogenost izolata .....	37
4.3. Identitet patogena .....	39
4.3.1. Klasične metode .....	39
4.3.2. Molekularne metode .....	41
4.4. Uslovi i osetljivost izolata <i>D. applanata</i> na fungicide <i>in vitro</i> .....	41
4.4.1. Značaj hranljivih podloga .....	41
4.4.2. Značaj temperature .....	42
4.4.3. Značaj svetlosnih uslova .....	43
4.5. Osetljivost izolata <i>D. applanata</i> na fungicide .....	44
4.5.1. Cu-hidroksid .....	44
4.5.2. Mankozeb .....	46
4.5.3. Kaptan .....	47
4.5.4. Hlorotalonil .....	48
4.5.5. Ditianon .....	49
4.5.6. Fluopiram .....	50
4.5.8. Azoksistrobin .....	53
4.5.9. Piraklostrobin .....	54
4.5.10. Fluazinam .....	56
4.5.11. Difenokonazol .....	57
4.5.12. Tebukonazol .....	58
4.5.13. Uticaj različitih temperatura na toksičnost fungicida za izolate <i>D. applanata</i> u <i>in vitro</i> uslovima .....	59
4.6. Efikasnost fungicida u zaštiti maline od <i>D. applanata</i> .....	63
4.6.1. Kritičan period za primenu fungicida .....	64
5. DISKUSIJA .....	66
6. ZAKLJUČAK .....	75
7. LITERATURA .....	77
8. PRILOZI .....	105
9. BIOGRAFIJA .....	109

## 1. UVOD

Zbog izuzetnog hemijskog sastava ploda, crvena malina je veoma cenjeno jagodasto voće koje se proizvodi u više od 40 zemalja sveta. Po obimu i vrednosti proizvodnje, malina se u Srbiji nalazi na prvom mestu u okviru grupe jagodastih voćnih vrsta (Popović et al., 2003). Tokom poslednjih deset godina, Srbija je među vodećim proizvođačima i izvoznicima maline u svetu. Sa proizvedenih 61.715 tona maline u 2014. godini, Srbija je na četvrtom mestu u svetu, iza Ruske Federacije, Poljske i SAD (FAOSTAT, 2017). Prema popisu poljoprivrede u 2012. godini (Anonymous, 2013), malina se gaji na površini od 11.041 ha, uglavnom u zapadnim i jugozapadnim delovima Srbije (Nikolić i Tanović, 2012), dok je prema podacima FAO u istoj godini malina ubrana sa površine od 21.952 ha (Nikolić i Tanović, 2012).

Usled specifičnog habitusa biljaka i intenzivnog vegetativnog porasta, u zasadima maline nastaju mikroklimatski uslovi koji pogoduju razvoju patogena i nastanku infekcija. Gljive predstavljaju veoma brojnu i ekonomski štetnu grupu patogena ove jagodaste voćne vrste. Jedno od najštetnijih i najrasprostranjenijih oboljenja crvene maline je kestenjasta pegavost izdanaka, koju prouzrokuje gljiva *Didymella applanata* (Niessl.) Sacc. (Williamson i Hargreaves, 1981). *D. applanata* je rasprostranjena u svim rejonima gajenja maline u Evropi, Americi, Africi, Aziji, Australiji i Okeaniji (CABI, 1977). Oboljenje se javlja u različitom intenzitetu iz godine u godinu, u zavisnosti od uslova sredine, pre svega od vlage. U kišnim i vlažnim uslovima oboljenje se razvija veoma intenzivno, tako da prinosi mogu biti smanjeni do 60%, uglavnom usled sušenja izdanaka (Williamson i Hargreaves, 1981).

S obzirom na štetu koja može nastati usled razvoja *D. applanata* na malini, neophodna je redovna primena mera suzbijanja ovog patogena. Primena odgovarajućih agrotehničkih mera treba da omogući stvaranje nepovoljnih uslova za razvoj oboljenja. Međutim, uspeh zaštite u najvećoj meri zavisi od pravovremene i kvalitetne primene fungicida, koja treba da obezbedi adekvatnu zaštitu, visok prinos i kvalitetan plod. Kao problem u hemijskoj zaštiti maline navodi se dosta siromašan izbor registrovanih fungicida, usled nezainteresovanosti hemijskih kompanija za registraciju preparata u tzv. "malim usevima". Za suzbijanje prouzrokovala kestenjaste pegavosti izdanaka maline, do devedesetih godina prošlog veka, bila je preporučena primena nekoliko

fungicida kao što su: bordovska čorba, benomil, kaptafol, kaptan, Cu-oksihlorid, dihlofluanid, ditianon, ferbam, mankozeb, tiram i cineb (Anderson, 1920; Perišić 1951; Converse, 1966; Punithalingam 1978). Međutim, od stupanja na snagu nove regulative u Evropskoj Uniji (Direktiva 1107/2009) (od 2009. godine), mnoge od navedenih aktivnih supstanci povučene su iz upotrebe (EU Pesticides Database, 2014). Na tržištu Srbije, prema registru iz 2015. godine, za suzbijanje *D. applanata* registrovane su svega četiri aktivne supstance: Cu-oksihlorid, Cu-hidroksid, azoksistrobin i tebukonazol (Anonymous, 2015). Mali broj registrovanih preparata predstavlja problem za proizvođače i stručnjake na terenu, što rezultira slabom zaštitom maline od ovog patogena. Imajući u vidu da će primena fungicida i dalje biti najvažniji deo programa zaštite maline od prouzrokača kestenjaste pegavosti izdanaka, kao i da se u praksi koriste fungicidi srednjeg i visokog rizika za razvoj rezistentnosti, utvrđivanje i praćenje promene osetljivosti izolata patogena *D. applanata* na fungicide, kao i utvrđivanje kritičnih perioda za njihovu primenu, osnova su dobre prakse zaštite maline od *D. applanata*.

Osnovni ciljevi istraživanja u ovoj disertaciji su:

- Utvrđivanje rasprostranjenosti kestenjaste pegavosti izdanaka u zasadima maline u Srbiji i identifikacija prouzrokača oboljenja do nivoa vrste;
- Utvrđivanje osetljivosti izolata *D. applanata* na fungicide različitih mehanizama delovanja i iz različitih hemijskih grupa;
- Ispitivanje uticaja različitih temperatura na toksičnost fungicida za izolate *D. applanata* u *in vitro* uslovima;
- Utvrđivanje efikasnosti fungicida u uslovima praktične primene u kojima će biti utvrđena kako efikasnost fungicida različitih mehanizama delovanja, tako i uloga ukupnog broja i rasporeda tretiranja u odnosu na fenofazu razvoja maline u postignutom nivou zaštite.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. *Didymella applanata* - Taksonomska pripadnost i poreklo

*Didymella applanata* (Niessl.) Sacc. (anamorf: *Phoma argillacea*) pripada familiji Didymellaceae, redu Pleosporales, potklasi Pleosporomycetidae, klasi Dothideomycetes, razdelu Ascomycota, carstvu Fungi (Kirk et al., 2008). Niessl je vrstu *D. applanata* prvi put opisao 1875. godine u Austriji kao *Didymosphaeria applanata*. Potom, 1892. godine Saccardo svrstava ovog patogena u rod *Didymella* (Koch, 1931). U Severnoj Americi 1894. godine, *D. applanata* opisana je kao prouzrokovač kestenjaste pegavosti izdanaka vrsta roda *Rubus*, posebno crvene maline (*Rubus idaeus* L.). Nakon filogenetske analize sekvenci ITS1 genomnog regiona *Phoma* spp., *D. applanata* svrstana je u *Phoma-Didymella* monofiletičku grupu, zajedno sa još nekim vrstama roda *Phoma* kao što su *P. macrostoma*, *P. nebulosa* i *P. sorghina* (Reddy et al., 1998). Aseksualni stadijum gljive *D. applanata* opisali su Corbaz (1957) i Corlett (1981), da bi ga Gruyter, de. et al. (2002) identifikovali kao *Phoma argillacea*.

### 2.2. Biljke domaćini

Kestenjasta pegavost izdanaka je oboljenje tipično za vrste roda *Rubus*. Osim maline, na kojoj nanosi najveće štete, *D. applanata* parazitira i kupinu kao i hibride koji nastaju njihovim ukrštanjem (Williamson, 1991). Osim iz *R. idaeus*, patogen je u Evropi izolovan i iz *R. arcticus* nothosp. *stellarcticus* (Lindqvist-Kreuze et al., 2003), a u Severnoj Americi iz *R. idaeus*, *R. idaeus* var. *strigosus*, *R. loganobaccus* i *R. parviflorus* (Ginns, 1986; Fernando et al., 1999; Shamoun i Sieber, 2000).

### 2.3. Rasprostranjenost

*D. applanata* je rasprostranjena u svim rejonima gajenja maline u Evropi, Americi, Africi, Aziji, Australiji i Okeaniji (CABI, 1977). U našoj zemlji patogen je prvi put utvrđen 1949. godine u Mionici (okolina Valjeva) (Perišić, 1951). Potom je njegovo prisustvo ustanovljeno i u okolini Čačka, Kragujevca, Beograda i Zagreba, pa

se smatra da je patogen bio raširen u svim područjima gajenja maline u Jugoslaviji (Josifović, 1941; Perišić, 1951).

#### 2.4. Simptomi oboljenja

Prvi simptomi u vidu pega na mladim jednogodišnjim izdancima u osnovi i oko pupoljaka, ispoljavaju se u kasno proleće ili rano leto (Slika 1.). U toku vegetacije, tokom jula i avgusta, pege se povećavaju i postaju mrke prekrivajući često celu površinu izdanka (Converse, 1966; Williamson, 1991; Fox, 2006). Kod sorti maline koje imaju jaču voštanu prevlaku, pege su ljubičaste boje. Kora se suši i puca uzdužno. Pojavu simptoma potpomaže egzocelularni fitotoksični oligosaharid (Lousberg et al., 1973). Broekhoven et al. (1975) su ovaj toksin opisali kao glikopeptid velike molekulske mase sastavljen najvećim delom od glukoze. Tokom septembra na površini pega formiraju se piknidi u obliku sitnih crnih okruglastih struktura. U toku zime, dolazi do nekroze kore, pucanja i njenog odvajanja od drveta, tako da oboleli izdanci dobijaju sivo srebrnu boju (Perišić 1951; Williamson, 1991; Fox, 2006). Većina autora navodi da patogen zaražava samo primarnu koru izdanaka (Koch, 1931; Converse, 1966; Ivanović i Ivanović, 2001), dok su neki utvrdili da gljiva zahvata i unutrašnje delove, drvo i srž (Perišić, 1951; Williamson i Jennings, 1992). Pazušni pupoljci na zaraženim izdancima značajno su manji i ponekad izostaje formiranje rodni grančica (Converse, 1966; Williamson i Dale, 1983).



**Slika 1.** *Didymella applanata*. Simptomi oboljenja na zaraženom izdanku (levo) i lišću maline (desno)



Štete na izdancima mogu biti vrlo različite, od izostanka listanja usled propadanja pupoljaka, do pojave bočnih izbojaka, cvetova i plodova koji nepotpuno sazrevaju i nemaju tipičan sortni ukus. Ponekad, patogen može da prouzrokuje jako grananje izdanaka pri čemu nastaju „veštičije metle“ (Perišić, 1951). Zaraze lišća jednogodišnjih izdanaka započinju na ivici i šire se prema glavnom nervu. Usled infekcije dolazi do nekroze lišća klinastog oblika između nerava sa mrkožutim oreolom oko pege (Slika 1.). Zaražene liske se prevremeno suše i opadaju, dok lisne drške ostaju pričvršćene za izdanak (Converse, 1966; Fox, 2006).

## 2.5. Osobine patogena

Na podlozi od ovsenih pahuljica i agara (OA), *D. applanata* formira žuto belu koloniju, ovalnog oblika, ravnih ivica (Mycobank, 2016). Na podlozi od krompira, dekstroze i agara (KDA), patogen obrazuje pepeljasto sivu koloniju, nepravilnog oblika, režnjevutih ivica uz lučenje žuto narandžastog pigmenta koji difunduje kroz podlogu (Mycobank, 2016). *D. applanata* formira tamnobraon do crne, pojedinačne ili u grupi, ogruglasto spljoštene peritecije, veličine 200-270  $\mu\text{m}$  u prečniku (Punithalingam, 1978; Corlett, 1981). Formiraju se u jesen na srebrnastim delovima i na mrtvim tkivima zaraženih izdanaka, kao i na površini ljuspica pupoljaka. Zrelost dostižu do aprila naredne godine (Blake, 1980). Unutar peritecija nalaze se dvoslojni, cilindrični askusi veličine 60-75 $\times$ 10-15  $\mu\text{m}$  sa blago elipsoidnim dvoćelijskim, hijalinskim askosporama (12-18 $\times$ 5-7  $\mu\text{m}$ ), kod kojih je gornja ćelija nešto šira od donje (Punithalingam, 1978). *P. argillacea* formira tamnobraon do crne piknide, veličine 200-250  $\mu\text{m}$  i hijalinske jednoćelijske konidije veličine 4-7 $\times$ 2-3,5  $\mu\text{m}$  (Punithalingam, 1978). Piknidi su obično nepravilno raspoređeni na nekrotičnim pegama na izdancima i listovima tokom leta i jeseni. Formiranje piknida počinje sredinom novembra, a punu zrelost dostižu između aprila i sredine novembra naredne godine (Blake, 1980).

Na temperaturi od 23-24°C na KDA podlozi konidije klijaju za 18 h, a na temperaturi od 8-9°C za 48 h. *D. applanata* formira peritecije na vodenom agaru koji sadrži 1% dekstroze, celuloze ili hitina. Askospore u kapljici vode klijaju na temperaturama od 21-23°C i 15-17°C, dok na izdancima maline klijanje askospora počinje nakon 2h na temperaturi od 22-23°C (Koch, 1931; Punithalingam, 1978).

## 2.6. Ciklus razvoja

*D. applanata* prezimljava u obliku micelije, peritecija i piknida na zaraženim izdancima. U vlažnim uslovima tokom proleća, gljiva formira askospore i konidije, koje zaražavaju lišće jednogodišnjih izdanaka. Oslobođanje askospora traje dosta dugo, od aprila do avgusta, mada one nemaju značajniju ulogu u infekciji maline (Ivanović i Ivanović, 2001). Piknospore se oslobađaju tokom dužeg perioda, a najveću brojnost imaju u julu i avgustu (Blake, 1980). Smatra se da su konidije najznačajniji izvor inokuluma i imaju primarnu ulogu u infekciji lišća i pupoljaka (Williamson, 1991). Primarno mesto infekcije je list, nakon čega parazit nastavlja razvoj kroz lisnu dršku i kolonizira koru izdanka oko pupoljaka. Zaraze pupoljaka najverovatnije započinju od vršnog dela nakon čega patogen nastavlja razvoj do izdanka (Koch, 1931). Prema Jennings (1962) i Converse (1966), zadržavanje vode oko pupoljaka je najznačajniji faktor za njihovu infekciju. Histološkim ispitivanjima u Škotskoj, utvrđeno je da je infekcija pupoljaka preko lisne drške blokirana zaštitnim slojem od suberizovanih i lignifikovanih ćelija sa adaksijalne strane primarne kore lisne drške. Takav sloj nedostaje na abaksijalnoj strani, usled čega dolazi do brže kolonizacije primarne kore izdanka ispod lista (Williamson, 1984). Parazit može da zarazi biljku domaćina i preko rana na mladim izdancima, koje nastaju prilikom polaganja jaja malinine mušice (*Thomasiniana theobaldi*) (Schuring i Salemink, 1972).

Prve pege na jednogodišnjim izdancima pretežno se javljaju na bazalnim nodusima krajem juna i početkom jula meseca, a kasnije se pege mogu uočiti i na gornjim nodusima. Vlažno i kišovito proleće uslovljava intenzivno širenje bolesti unutar zasada, dok prenošenje patogena iz jednog regiona u drugi omogućava zaraženi sadni materijal (Perišić, 1951). Oboljenje se javlja u različitom intenzitetu u zavisnosti od spoljašnjih uslova, pre svega od vlage. U kišnim i vlažnim uslovima razvija se veoma intenzivno, tako da prinosi u narednoj godini mogu biti smanjeni do 60%, uglavnom usled sušenja izdanaka (Williamson i Hargreaves, 1981). Prema Jennings (1988) izdanci i listovi su tokom perioda rasta različito osetljivi na zarazu. Listovi postaju osetljiviji sa fiziološkim starenjem usled nedostatka svetlosti u osnovi izdanaka, dok su izdanci nakon sazrevanja manje osetljivi. Williamson i Pepin (1987) navode da je osetljivost izdanaka povećana nakon perioda visokih temperatura, što uslovljava intenzivnijoj

pojavi pega duž izdanaka. Takođe, ostvarenje infekcije zavisi i od virulentnosti patogena. U istočnoj Kanadi opisana su dva patotipa *D. applanata* na osnovu virulentnosti i mogućnosti ostvarenja infekcije sorte Newburgh (Bolton i Julien, 1961).

## **2.7. Mogućnosti suzbijanja *D. applanata***

Za efikasno suzbijanje *D. applanata* značajne su kako preventivne, tako i direktne mere suzbijanja, koje zajedno čine celinu integralnog pristupa u zaštiti maline. Ove mere obuhvataju: selekciju otpornih sorti, agrotehničke, biološke i hemijske mere suzbijanja. Primenom svih raspoloživih mera može se uspešno sprečiti pojava ovog oboljenja ili smanjiti štete koje mogu nastati usled njegove pojave.

### **2.7.1. Selekcija otpornih sorti**

Neke sorte crvene maline otpornije su na *D. applanata*, što pre svega zavisi od morfologije izdanka (Knight i Keep, 1958). Maljave sorte maline su otpornije i manje podložne infekcijama ovim patogenom (Knight i Keep, 1958; Jennings, 1988). Smatara se da je major gen koji kontroliše otpornost sorti na *D. applanata* gen H koji je odgovoran za maljavost (Williamson i Jennings, 1992; Sargent et al., 2007). Ovaj gen je detektovan kod veoma otpornih sorti kao što su Leo i Glen Moy (Williamson, 1991). Otpornost na kestenjastu pegavost takođe je utvrđena kod sorti Haida, Viking, Chief, Newman, Ontario, Malling Admiral, Boyne, Carnival, Chilliwak i Festival (Knight i Keep, 1958; Keep et al., 1972; Daubeny i Pepin, 1974; Williamson, 1991). Sorta Willamette, najvažnija i najrasprostranjenija u našoj zemlji, izuzetno je osetljiva na *D. applanata*, dok je sorta Meeker nešto manje osetljiva (Nikolić i Milivojević, 2010). Izvori otpornosti na *D. applanata* identifikovani su kod vrsta *Rubus pileatus*, *R. occidentalis*, *R. coreanus* i hibrida ovih vrsta sa crvenom malinom (Jennings, 1982), što može biti veoma značajno za buduća oplemenjivačka istraživanja.

Osetljivost odnosno otpornost sorti na prirodne infekcije zavisi i od podneblja u kojoj se one gaje, što se može pripisati različitoj virulentnosti populacije (Pepin et al., 1985). Tako je sorta Malling Admiral bila veoma osetljiva na *D. applanata* u

Jugoslaviji, umereno osetljiva u Britanskoj Kolumbiji, a relativno otporna u Velikoj Britaniji (Daubeny i Pepin, 1974; Mišić et al., 1975; Swait, 1980).

### 2.7.2. Agrotehničke mere

Pravilnim agrotehničkim merama pre zasnivanja zasada, odnosno izborom terena, gustom sadnje i uzgojnim oblikom smanjuje se pojava kestenjaste pegavosti izdanaka. Prilikom podizanja zasada treba birati ocedne terene i redove postavljati u pravcu dominantnih vetrova, radi boljeg provetravanja zasada.

Formiranje otvorenog habitusa odgovarajućom rezidbom, omogućava se slobodan protok vazduha i slobodna apsorpcija sunčevih zraka, čime se umanjuje mogućnost pojave oboljenja (Williamson, 1991). U zasadu maline neophodno je redovno suzbijanje korova, jer oni povećavaju vlažnost oko osnove izdanaka što pogoduje razvoju oboljenja. Takođe, preporučuje se uklanjanje divljih biljaka iz roda *Rubus*, ukoliko ih ima u blizini zasada maline, jer mogu poslužiti kao izvor inokuluma (Williamson, 1991; Williamson, 2003).

Jedna od važnijih mera suzbijanja je uklanjanje prvoizniklih izdanaka košenjem, površinskom obradom zemljišta ili na druge načine. Prema Williamson (1991), do smanjenja oboljenja verovatno dolazi jer lišće na novim izdancima ostaje duže u otpornom juvenilnom stadijumu, nego lišće na izdancima koji su prvo nikli. Uklanjanje izdanaka se obavlja u više navrata kada im je visina oko 15 cm. Ukoliko izdanci prerastu, zagušiće donji sprat rodnih izdanaka što pogoduje razvoju *D. applanata* (Veličković, 2007; Faby, 2008). Primena ove mere moguća je samo u bujnim zasadima i na sortama maline koje podnose uklanjanje izdanaka, jer u suprotnom može doći do smanjenja prinosa (Williamson, 1991).

Odmah nakon berbe neophodno je ukloniti biljke koje su donele rod, kako se zaraza sa njih ne bi širila na mlade izdanke (Williamson, 1991; Ivanović i Ivanović, 2001; Phillips, 2011). Ostavljanje orezanih izdanaka u malinjaku do proleća samo će pojačati pojavu oboljenja. Međutim, u istraživanjima Faby (2008), ostavljanje dvogodišnjih izdanaka nakon berbe u zasadu nije uticalo na pojavu kestenjaste pegavosti izdanaka. Ovaj autor smatra da se oni mogu ostaviti u zasadu kao potpora jednogodišnjim izdancima dok sa njih ne opadne lišće.

### 2.7.3. Biološke mere

Istraživanja usmerena u pravcu biološkog suzbijanja patogena *D. applanata* uglavnom se baziraju na primeni bakterija iz različitih rodova i njihovih enzima kao agenasa biološke borbe. Prema Elad (1994), proizvodnja i korišćenje biopreparata previše je skupo da bi bilo isplativo, imajući u vidu znatno niže cene klasičnih fungicida. Međutim, iako biopreparati ne mogu zameniti hemijske preparate, poželjna je primena bioloških mera kao dopuna hemijskim.

Shpatova et al. (2003) proučavali su uticaj bioloških preparata na bazi bakterija iz rodova *Pseudomonas* (Rizofil), *Bacillus* (Fitop-flora C) i *Chaetomium* (Khetomium) za suzbijanje vrste *D. applanata*. Sva tri preparata inhibirala su porast micelije, pri čemu su preparati na bazi bakterija iz rodova *Pseudomonas* i *Chaetomium* bili efikasniji. Rizofil primenjen u koncentraciji od 1% inhibirao je porast micelije 2,2 puta u odnosu na kontrolu nakon četiri dana inkubacije. Primenom preparata Khetomium u koncentraciji od 0,5% fungistatičan efekat se povećavao tokom perioda inkubacije. Prečnik kolonije je bio 2,3 puta manji u odnosu na kontrolu nakon tri dana inkubacije, a skoro pet puta manji nakon sedam dana inkubacije (Shpatova et al., 2003).

U *in vitro* i poljskim uslovima Shternshis et al. (2006) ispitivali su mogućnost upotrebe hitinaza koje proizvode *Streptomyces* sp. (Chi I) i *Serratia marcescens* (Chi II) za suzbijanje *D. applanata*. Chi I pri koncentraciji od 0,4 U/ml značajno je inhibirala porast micelije (1,3 puta u odnosu na kontrolu), dok je inhibitorno dejstvo Chi II bilo neznatno. Međutim, nanošenjem hitinaza (Chi I i Chi II) na izdanke maline pre veštačke inokulacije izdanaka, utvrđen je značajan stepen inhibicije formiranja kestenjastih pega i plodonosnih tela (Shternshis et al., 2006). U poljskim ogledima utvrđena je visoka efikasnost enzima Chi I u suzbijanju *D. applanata*. Takođe, nije bilo značajne razlike u efikasnosti postignute primenom Chi I i hemijskog preparata Topaz (Shternshis et al., 2006). Istraživanja Duzhak et al. (2012), pokazala su da antagonističko dejstvo bakterije *Serratia marcescens* na *D. applanata* zavisi prvenstveno od količine proizvedenog crvenog pigmenta prodigiozina, a ne od proizvodnje enzima hitinaze.

Rekanović et al. (2012) su tokom dvogodišnjeg perioda ispitivali efikasnost bioloških preparata na bazi *Bacillus subtilis* (F-Stop) i *Pythium ohygandrum* (Polyversum) u suzbijanju prouzrokovala kestenjaste pegavosti maline. Oba

biofungicida su ispoljila nisku efikasnost, kako preparat na bazi *B. subtilis* (7,98% i 11,16%), tako i preparat na bazi *P. olygandrum* (14,19% i 16,94%) (Rekanović et al., 2012).

#### 2.7.4. Hemijske mere

Upotreba fungicida predstavlja dominantan način suzbijanja ovog patogena, dok se sve prethodno navedene mere mogu koristiti kao dopunske. Primena hemijskih mera u suzbijanju *D. applanata* veoma je otežana. Problem predstavljaju ostaci pesticida u plodovima, što otežava primenu fungicida. Tokom šestogodišnjeg praćenja ostataka pesticida u različitim plodovima u Poljskoj, istraživanja su pokazala da se ostaci pesticida najčešće javljaju upravo u plodovima maline (u 50,6% uzoraka) (Nowacka, 2003). Kao problem u hemijskoj zaštiti maline navodi se i dosta siromašan izbor fungicida usled nedovoljne zainteresovanosti hemijskih kompanija za registraciju preparata u zasadu maline, jer je tržište previše malo, a registracija preparata skupa (Williamson, 2003). Na osnovu literaturnih podataka (Anderson, 1920; Perišić 1951; Converse, 1966; Punithalingam 1978), za suzbijanje prouzrokovala kestenjaste pegavosti izdanaka maline do devedesetih godina prošlog veka, bila je preporučena primena nekoliko fungicida (bordovska čorba, benomil, kaptafol, kaptan, Cu-oksihlorid, dihlofluanid, ditianon, ferbam, mankozeb, tiram, cineb). Međutim, od stupanja na snagu nove regulative u Evropskoj Uniji (Direktiva 1107/2009) (od 2009. god.), mnoge od navedenih aktivnih materija (benomil, kaptafol, dihlofluanid, ferbam i cineb) nisu odobrene za dalju primenu na prostoru Evropske Unije (EU Pesticides Database, 2014). U Škotskoj se pred berbu maline primenjuje tiofanat-metil i dihlofluanid za suzbijanje *Botrytis cinerea*, što se pozitivno odražava i na suzbijanje *D. applanata* (Williamson, 1991). U našoj zemlji, za suzbijanje ovog patogena, registrovane su četiri aktivne supstance iz različitih hemijskih grupa: bakar-oksihlorid i bakar-hidroksid (bakarna jedinjenja), azoksistrobin (metoksi-akrilati) i tebukonazol (triazoli) (Anonymous, 2015).

O efikasnosti fungicida u suzbijanju prouzrokovala kestenjaste pegavosti izdanaka ima veoma malo podataka kako u našoj zemlji, tako i u svetu. Stevanović et al. (2014) ispitivali su efikasnost azoksistrobina, difenokonazola i izopirazam+difenokonazol u suzbijanju *D. applanata*, kako na listu, tako i na izdancima

maline. Ovi autori ističu da su pri umerenom intenzitetu zaraze u netretiranim (kontrolnim) varijantama (20,8-22,6% na listu i 33,1-34,5% na izdancima), najbolji rezultati utvrđeni u varijanti gde je primenjen izopirazam+difenokonazol u koncentraciji od 0,15% (do 96,3 i 95,8% na listu, odnosno na izdancima). Nešto nižu efikasnost (do 95,9 na listu i do 96,5% na izdancima) ispoljio je azoksistrobin primenjen u koncentraciji od 0,075%. Izopirazam+difenokonazol primenjen u koncentraciji od 0,1 % ispoljio je efikasnost od 94,8-93,2% na listu, odnosno izdancima, što je nešto niže u odnosu na efikasnost u varijanti sa višom koncentracijom. Varijanta u kojoj je primenjen difenokonazol u koncentraciji od 0,05% ispoljila je nižu efikasnost od predhodnih fungicida (do 86,2% na listu odnosno, do 87% na izdancima). Iako su autori utvrdili razlike u efikasnosti, jedino difenokonazol ispoljava statistički značajnu razliku u odnosu na druge ispitivane fungicide (Stevanović et al., 2014).

Rekanović et al. (2012) su tokom dvogodišnjeg perioda ispitivali efikasnost fungicida u suzbijanju prouzrokovača kestenjaste pegavosti na lokalitetu Valjevska Kamenica. Najbolja efikasnost ostvarena je u varijantama gde su primenjeni pikoksistrobin+ciprokonazol (Acanto Plus) (81,29-87,63%) i fludioksonil+ciprodinil (Switch 62,5-WG) (82,28-85,29%). U navedenim istraživanjima, dobra efikasnost ostvarena je i primenom azoksistrobin+ciprokonazol (Amistar Extra) (78,81-85,19%), tolifluanid+tebukonazol (Folicur EM 50-WP) (66,58-70,59%) i boskalid+piraklostrobin (Signum) (73,32-76,88%) (Rekanović et al., 2012).

Faby (2008) je ispitivao efikasnost fungicida tolifluanid+difenokonazol (Folicur M), trifloksistrobin (Flint), tolifluanid (Euparen M WG), fludioksonil+ciprodinil (Switch), difenokonazol (Bardos) i boskalid+piraklostrobin (Signum) u suzbijanju *D. applanata*. Utvrđena je visoka efikasnost u varijantama gde su primenjeni fludioksonil+ciprodinil (Switch), difenokonazol (Bardos) i boskalid+piraklostrobin (Signum). U kontrolnoj parceli broj obolelih izdanaka iznosio je 167, dok u parcelama tretiranim boskalid+piraklostrobin i difenokonazol broj izdanaka sa simptomima kestenjaste pegavosti iznosio je 26, a u parceli tretiranoj fungicidima fludioksonil+ciprodinil bio je 12. Broj obolelih izdanaka u parceli u kojoj je primenjen tolifluanid iznosio je 78, a nešto veći broj izdanaka sa simptomima kestenjaste pegavosti uočen je u parceli u kojoj je premenjen trifloksistrobin (81 izdanak). Najnižu efikasnost ispoljio je tolifluanid+difenokonazol (171 izdanak sa simptomima oboljenja)

(Faby, 2008). U odnosu na vreme pojave infekcije, istraživanja su pokazala da je preparate najbolje koristiti pre berbe kod sorte Glen Ample, odnosno posle berbe kod sorte Tulameen (Faby, 2008).

## **2.8. Fungicidi namenjeni za suzbijanje *D. aprlanta***

### **2.8.1. Neorganska jedinjenja bakra**

Neorganska jedinjenja bakra deluju kao preventivni nesistemični fungicidi. Fungicidno dejstvo bakar-sulfata utvđeno je 1807. godine, međutim razvoj ove grupe fungicida počinje tek uvođenjem bordovske čorbe za suzbijanje patogena 1885. godine. Zahvaljujući dobroj fungicidnoj aktivnosti, bordovska čorba koristi se za suzbijanje velikog broja prouzrokovaca oboljenja gajenih biljaka (Schwinn i Margot, 1991; Mehrotra i Aggarwal, 2013). Međutim, primena bordovske čorbe može imati za posledicu neželjene efekte, pre svega, pojavu fitotoksičnosti (Nene i Thapliyal, 1994). Simptomi fitotoksičnosti mogu se javiti u vidu hloroze praćene braon ili ljubičastom bojom na listovima ili plodovima, zatim nervi listova ponekad dobijaju tamnoljubičastu boju, a neretko je i opadanje listova, itd. (Nene i Thapliyal, 1994). Sa ciljem prevazilaženja ove negativne pojave, nekoliko decenija kasnije sintetisana su i druga jedinjenja na bazi bakra nazvana “nerastvorljiva”, “slabo rastvorljiva” ili “vezana” jedinjenja, kao što su bakar-oksidi, bakar-oksihlorid i bakar-hidroksid (Kushalappa i Eskes, 1989; Nene i Thapliyal, 1994). Usled njihove specifične i postojane hemijske strukture, bakarni jon je stabilniji i teže se oslobađa iz ovih jedinjenja, te su zahvaljujući ovim osobinama, u znatnoj meri smanjeni fitotoksični efekti (Kushalappa i Eskes, 1989; Erwin i Ribeiro, 2005). Bakar prodire u gljive u obliku helatnog kompleksa ili u obliku bakarnog jona (Swingle, 1896; McCallan i Wilcoxon, 1936; Wain i Wilkinson, 1946; Somers, 1963; Somers, 1965). Joni bakra indukuju brojne nespecifične reakcije koje se zasnivaju na precipitaciji ili denaturaciji proteina, delujući prvenstveno na strukturu raznih enzima koji imaju vitalni značaj u metabolizmu ćelije (MacBean, 2012).

Prema FRAC (2018), bakarna jedinjenja kao klasični fungicidi nespecifičnog mehanizma delovanja, svrstavaju se u fungicide niskog rizika za razvoj rezistentnosti. Ova jedinjenja su zadržala široku zastupljenost u poljoprivrednoj praksi. Primenuju se



sa mnogim drugim jedinjenjima sa ciljem proširenja spektra delovanja i sprečavanja pojave rezistentnosti, koja je ključni činilac za smanjenje životnog veka fungicida (Schwinn i Margot, 1991). U našoj zemlji od neorganskih jedinjenja bakra, za suzbijanje prouzrokovala kestenjaste pegavosti izdanaka *D. applanata*, registrovani su bakar-oksiklorid i bakar-hidroksid (Anonymous, 2015).

### 2.8.2. Ditiokarbamati

Sintetisanjem jedinjenja na bazi ditiokarbaminske kiseline 40-ih godina prošlog veka, započeo je period primene organskih fungicida (Stein, 2002). Ditiokarbaminske kiseline su derivati karbaminskih kiselina koje su vrlo nestabilne. Međutim, njihovi kompleksi sa metalima i njihove estri su vrlo postojane, tako da su našli primenu kao fungicidi u poljoprivredi (Marinovich et al., 2002; Halimehjani et al., 2012). Fungicidi koji se svrstavaju u grupu ditiokarbamata odlikuje nespecifičan mehanizam delovanja, koje se uglavnom zasniva na mogućnosti da grade metalne helate unutar ćelija gljiva, te se zbog ove odlike koriste i u analitičkim metodama za određivanje prisustva teških metala (Thorn i Ludwig, 1962; Rath et al., 2011). Oduzimajući esencijalne metale bakar/cink superoksid dismutaza inhibiraju aktivnost ovih enzima koji su esencijalni antioksidanti (Heikkila et al., 1976; Lesko et al., 1984). Narušavaju mehanizme ćelijske detoksikacije i inhibiraju glutathion-S-transferaze (GSTs) (Zemaitis i Greene, 1979; Dierckx, 1984). Takođe, fungicidi ove grupe reaguju sa slobodnim sulfhidrilnim grupama drugih jedinjenja i vrše njihovu inaktivaciju (Thorn i Ludwig, 1962). Milenkovski et al. (2010), navode da tiram inhibira rast denitrifikacionih bakterija, što je verovatno uslovljeno njegovim nespecifičnim delovanjem na komponente koje sadrže tiol (Yang, 2011).

Pripadnike ditiokarbamata, na osnovu različite hemijske strukture njihovih molekula, možemo svrstati u dve grupe: dialkil-ditiokarbamati (ciram, ferbam, tiram) i etilen-bis-ditiokarbamati (mankozeb, maneb, cineb i nabam) (Rath et al., 2011). Predstavnici etilen-bis-ditiokarbamata (EBDC) imaju široku primenu u poljoprivredi, koristeći se za suzbijanje velikog broja patogena. Međutim, EBDC su nestabilna jedinjenja koja se brzo razgrađuju. Kao posledica ovog procesa obrazuju se brojni metaboliti, od kojih pojedini mogu biti toksični, kao što je etilentiourea (ETU), koji

pored toksičnih poseduje i kancerogena svojstva (Sijpesteijn et al., 1957: loc. cit. Corbett et al., 1974). Imajući u vidu navedeno, primena EBDC jedinjenja u budućnosti je veoma neizvesna (Matolcsy et al., 1994).

Prema Yang et al. (2011), mankozeb, pripadnik grupe etilen-bis-ditiokarbamata, stabilan je kompleks maneba sa jonima cinka, koji smanjuju fitotoksičnost maneba i povećavaju mu fungicidnu aktivnost. Ovaj fungicid se odlikuje protektivnim delovanjem i koristi za suzbijanje velikog broja patogenih voćaka, ratarskih i povrtarskih biljaka (Worthing, 1991). Takođe, ima i izvesna baktericidna svojstva, delujući na bakterije uključene u kruženje azota i ugljenika u zemljištu (Černohlávková et al., 2009; Cycoń et al., 2010).

### **2.8.3. Ftalimidi**

Ftalimidi su nesistemični fungicidi, koje karakteriše nespecifičan mehanizam delovanja. Fungicidna svojstva kaptana otkrio je Kittleson (1952), a u primenu je uveden 1951. godine. Kontaktni je fungicid, a odlikuje se protektivnim i kurativnim delovanjem. Nene i Thapliyal (1994), navode da kaptan u izvesnoj meri poseduje i sistemična svojstva, ali još nije razjašnjeno da li se ovo svojstvo može pripisati samom jedinjenju ili produktima koji nastaju njegovim razlaganjem. Inkompatibilan je sa alkalnim jedinjenjima, jer povećana pH vrednost dovodi do njegovog razlaganja (Nene i Thapliyal, 1994). U poljoprivrednoj praksi koristi se za suzbijanje brojnih fitopatogenih gljiva. Takođe, kaptan ima i baktericidna dejstva inhibirajući porast denitrifikacionih bakterija (Milenkovski et al., 2010). Nakon prodora u ćeliju domaćina, razlaže se do vrlo nestabilnog jedinjenja tiofozgen. Tiofozgen se vezuje za slobodne sulfhidrilne grupe, potom za amino, hidroksilne, karboksilne i druge hemijske grupe velikog broja enzima, pri čemu inhibira brojne vitalne procese metabolizma (Dugger et al., 1959). Lukens i Sisler (1958), ističu da kaptan prvenstveno inhibira enzime sa sulfhidrilnim grupama. Rezultati *in vivo* istraživanja koje su sproveli Owens i Novotny (1959) sa konidijama *Neurospora sitophila*, pokazuju da je kaptan primarno delovao na koenzim-A i oksidujući sulfhidrilnu grupu ovog koenzima inhibirao sintezu citrata (Owens i Novotny, 1959). Prema Richmond i Somers (1963), afinitet ovog jedinjenja prema sulfhidrilnim grupama je različit, pri čemu postoje tiol grupe koje su manje značajne i

one koje su ključno mesto vezivanja ovog fungicida. Takođe, ovi autori navode da spore gljiva usvajaju kaptan veoma brzo i da je brzina apsorpcije zavisi od sadržaja tiola u sporama gljiva i količine ovog fungicida (Richmond i Somers, 1963).

Kako u svetu tako i kod nas, velika pažnja se posvećuje kancerogenim i teratogenim efektima hemijskih supstanci. Veliko interesovanje toksikologa privukli su derivati ftalimida, naročito kaptan i folpet. Na osnovu toksikoloških testova izvedenih na pacovima, Američka agencija za zaštitu životne sredine (US EPA, 1975; 1999) prvobitno je klasifikovala ova jedinjenja kao kancerogene supstance za ljude. Međutim, 2004. godine izvršena je reklasifikacija i kaptan je svrstan u nekancerogene supstance uz obrazloženje da su doze kojima su pacovi bili izloženi u eksperimentima daleko veće od onih koje se koriste u praksi i da kaptan nije indukovao pojavu kancera kod pacova, nego proliferaciju tumora koji su pacovi imali i pre izvođenja eksperimenata (US EPA, 2004; Gordon, 2007). U istraživanjima Greenburg et al. (2008), nisu pronađeni pouzdani dokazi kojima se potvrđuje da je učestalost pojave kancera kod radnika posledica izloženosti kaptanu. Cohen et al. (2010), navode da folpet nije kancerogen za ljude. Iako oba fungicida nisu visoko toksična za ljude, kaptan i folpet se svrstavaju u jake iritante kože, očiju i respiratornih puteva (Hayes, 1982; Edwards et al., 1991; Trochimowicz et al., 1991; Costa, 2008). Kod radnika izloženih ovim jedinjenjima zabeležene su promene na koži u vidu dermatitisa i alergijskih reakcija (Burroughs i Hora, 1982; Lisi et al., 1987).

#### **2.8.4. Hloronitrili**

Hlorotalonil je najvažniji predstavnik grupe protektivnih fungicida hloronitrila. Prema Russel (2005), u poljoprivrednu praksu je uveden 1964. godine (Russel, 2005). Nesistemičan je kontaktni fungicid, koji je široko zastupljen u zaštiti biljaka od brojnih fitopatogenih gljiva (Vincent i Sisler, 1968; Vieira et al., 2000). Odlikuje se izraženom perzistentnošću u kišnim uslovima (Fry, 1982). Istraživanjima Chen et al. (2001), utvrđeno je da hlorotalonil utiče na rast zemljišnih bakterija, što može imati ekološke posledice u kruženju azota. Reaguje sa jedinjenjima koje u svom molekulu sadrže sulfhidrilne grupe (SH), pre svega sa glutationom. Takođe, hemijske reakcije nastaju njegovim vezivanjem sa koenzimom A i 2-merkaptoetanolom, pri čemu se formiraju

brojni sumporni derivati (Vincent i Sisler, 1968). Kao posledica ovih reakcija, dolazi do inhibicije tiol-zavisnih enzima, veoma značajnih u metaboličkim procesima.

### **2.8.5. Hinoni**

Fungicid ditianon je najznačajniji predstavnik hemijske grupe hinona. U primenu je uveden 1963. godine kao preventivni fungicid za suzbijanje brojnih gljiva koje pripadaju klasama Ascomycetes i Deuteromycetes. Kasnije je utvrđeno da deluje i na patogene iz klase Oomycetes (Ruberson, 1999). Primarno se koristi za suzbijanje prouzrokovaca folijarnih oboljenja. Mehanizam delovanja ditianona, kao i ostalih predstavnika ove grupe, je nespecifičan. Ima afinitet prema sulfhidrilnim grupama raznih jedinjenja i inaktivira ih. Prema Ruberson (1999), ditianon je fitotoksičan ukoliko se primeni sa mineralnim uljima.

### **2.8.6. 2,6-dinitro-anilini**

Fluazinam pripada hemijskoj grupi 2,6-dinitro-anilina i u primenu je uveden 1987. godine (Ruberson, 1999). Nesistemičan je fungicid sa odličnim protektivnim, a delom i kurativnim delovanjem (Anema et al., 1992; Kapsa et al., 2003). Koristi se u malim količinama primene, od 150 do 750 g/ha (MacBean, 2012) i ima dobru rezidualnu aktivnost (Anema et al., 1992; Tucker et al., 1994; Kimyoji et al., 1995; Schepers, 1996). Inhibira formiranje i klijanje spora, obrazovanje infekcionih struktura, a takođe utiče i na pokretljivost zoospora vrsta roda *Phytophthora* (Tucker et al., 1994; Komyoji et al., 1995; Mitani et al., 1996; Matheron et al., 2000). Fluazinam ima vrlo specifičan mehanizam delovanja koji nije sasvim razjašnjen. Prema navodima brojnih autora (Guo et al., 1991; Tokutake et al., 1991; Brandt et al., 1992), on sprečava korišćenje oslobođene energije za sintezu adenozintrifosfata u procesu oksidativne fosforilacije, inhibirajući transfer protona duž mitohondrijalne membrane kod pravih i pseudogljiva. Akagi et al. (1995), ističu da fluazinam ima izvestan afinitet prema sulfhidrilnim grupama. Širok spektar delovanja ovog fungicida i njegova efikasnost, uslovljena je kombinacijom ovih mehanizama delovanja (Akagi et al., 1995; Akagi et

al., 1996). Veoma je efikasan u suzbijanju *Phytophthora infestans*, *Venturia inaequalis*, *Sclerotium rolfsii*, *Rosellinia necatrix*, *Helikobasidium mompa*, itd. (MacBean, 2012).

Prema FRAC (2018), fluazinam je fungicid sa niskim rizikom za razvoj rezistenosti. O osetljivosti izolata *D. applanata* na ovaj fungicid nema objavljenih literaturnih podataka. Međutim, utvrđeni su visoko rezistentni sojevi *Botrytis cinerea* u usevima pasulja (Tamura, 2000). Biohemijska osnova rezistentnosti na ovaj fungicid nije ustanovljena, ali pojedini autori smatraju da ona nastaje kao posledica procesa detoksikacije, s obzirom na poznat mehanizam detoksikacije fluazinama u mitohondrijama ćelija sisara (Leroux et al., 2002; Leroux, 2004).

### **2.8.7. SDHI fungicidi**

Istraživačke studije u nekoliko hemijskih kompanija dovele su do razvoja veoma važnih jedinjenja za zaštitu biljaka, koja imaju dosta poželjnih osobina uključujući specifičnost, sistemičnost, kurativno i eradikativno delovanje i visoku fungicidnu aktivnost pri malim količinama primene (Russel, 2003). Ova jedinjenja označena su kao inhibitori sukcinat-dehidrogenaze (succinate dehydrogenase inhibitor, SDHI) (kompleks II), koji je značajan funkcionalni deo Krepsovog ciklusa, a povezan je sa elektronskim transportom koji se odvija u procesu mitohondrijalnog disanja (Hägerhäll, 1997). Kompleks SDH se sastoji od flavoproteina (SDH podjedinica A), Fe-S proteina (SDH podjedinica B) i dva proteina vezana za membranu (SDH podjedinice C i D) (Miles et al., 2014). Inhibitori sukcinat-dehidrogenaze se vežu za veoma konzervativna mesta na podjedinicama B, C i D, gde se ubikvinon (koenzim Q<sub>10</sub>) redukuje do ubikvinola (Horsefield et al., 2006). Zahvaljujući veoma specifičnom mehanizmu delovanja nije utvrđena ukrštena rezistentnost fungicida ove grupe sa jedinjenjima drugih hemijskih grupa (strobilurini, benzimidazoli ili anilinopirimidini) (Leroux et al., 2002; Stammler et al., 2007; Avenot et al., 2008). U SDHI grupu svrstavaju se, pored brojnih drugih jedinjenja, fungicid fluopiram koji pripada hemijskoj grupi piridinil-etil-benzamidi i boskalid koji pripada piridin-karboksamidima. Fluopiram i boskalid su fungicidi širokog spektra delovanja i koriste se u zaštiti velikog broja gajenih biljaka (Stammler et al., 2007; Yanase et al., 2007; Avenot i Michailides, 2010).

Prema FRAC (2018) klasifikaciji, SDHI fungicidi su srednjeg do visokog rizika za razvoj rezistentnosti. Rezistentnost na boskalid je utvrđena kod *Alternaria alternata* (Avenot i Michailides, 2007), *A. solani* (Wharton et al., 2012), *B. cinerea* (Veloukas et al., 2011; Yin et al., 2011), *Corynespora cassicola* (Miyamoto et al., 2009; Miyamoto et al., 2010a), *Didymella bryoniae* (Thomas, 2011; Thomas et al., 2010; Avenot et al., 2012), *Monilinia fructicola* (Amiri et al., 2010) i *Podosphaera xanthii* (Miyamoto et al., 2010b). Rezistentnost na fluopiram zabeležena je kod izolata *A. solani*, poreklom iz SAD (Ajdaho) (Miles et al., 2014). Prema Avenot i Michailides (2010), rezistentnost patogena na ovu grupu fungicida se pripisuje tačkastim mutacijama na genima koji kodiraju podjedinice B, C i D SDH kompleksa. Rezistentnost na boskalid kod izolata *B. cinerea* uslovljena je tačkastim mutacijama gena koji kodira sintezu podjedinice B. Mutacijom na poziciji 272 dolazi do zamene histidina sa tirozinom (H272Y) ili argininom (H272R), dok mutacija na poziciji 225 dovodi do zamene prolina aminokiselinom fenilalanin (P225F) (Yin et al., 2011; Veloukas et al., 2011). Takođe, kod rezistentnih izolata vrste *D. bryoniae* rezistentnost je uslovljena mutacijom gena koji kodira sintezu podjedinice B, pri čemu je histidin bio zamenjen aminokiselinom tirozinom na poziciji 277 (Avenot et al., 2012). Mutacije gena koji kodiraju sintezu podjedinica B, C i D uslovile su rezistentnost na boskalid kod izolata *A. alternata* (B-H277Y, B-H277R, C-H134R, D-H133 i D-D123E) (Avenot et al., 2008, 2009) i *Corynespora cassicola* (B-H278Y, B-H278R, C-S73P, D-S89P i D-G109V) (Miyamoto et al., 2010a). Ukrštena rezistentnost na fluopiram i boskalid nije utvrđena (Avenot i Michailides, 2010; Ishii et al., 2011; Avenot et al., 2012). Predpostavlja se da je razlog izostanka ukrštene rezistentnosti na ova dva fungicida razlika u mestu vezivanja ovih fungicida u SDH kompleksu (Avenot i Michailides, 2010; Ishii et al., 2011; Avenot et al., 2012).

### **2.8.8. QoI fungicidi**

Jedinjenja koja se svrstavaju u grupu QoI fungicida, iako raličitih hemijskih struktura molekula, odlikuju se istim mehanizmom delovanja koji se zasniva na inhibiciji ubikvinol oksidaze (Qo). Širok spektar delovanja, male količine primene i mogućnost suzbijanja patogena rezistentnih na druge fungicide odlikuje fungicide ove

grupe (Bartlett, 2002). Prema Vincelli (2002), strobilurini i njima slična jedinjenja, kao što su oksazolidindioni i imidazolinoni, označavaju se kao QoI fungicidi. Prva jedinjenja iz grupe strobilurina koja su našla primenu u zaštiti gajenih biljaka od brojnih prouzrokovaca oboljenja, azoksistrobin i kresoksim-metil, pojavili su se sredinom 90-ih godina prošlog veka (Clough i Godfrey, 1999; Sauter et al., 1999). Osim azoksistrobina, drugo najznačajnije jedinjenje iz ove grupe je piraklostrobin, koji se na tržištu pojavio 2002. godine.

Fungicidi iz grupe strobilurina inhibiraju ćelijsko disanje, tako što se vezuju za proteinske podjedinice citohrom bc1 kompleksa, kompleks III: citohrom c oksidoreduktaza (citohrom bc1), sa unutrašnje strane mitohondrija (Jordan et al., 1999; Tamura i Mizutani, 1999; Fisher i Meunier, 2008). Citohrom bc1 je najvažniji enzim u respiratornom elektron transportnom lancu, koji prenosi elektrone sa ubihinola na citohrom c, omogućavajući prenos protona sa matriksne na međumembransku stranu membrane, čime doprinosi formiranju elektrohemijskog gradijenta (Jordan et al., 1999; Tamura i Mizutani, 1999). Ovaj kompleks je strukturalni i funkcionalni dimer, koji može biti obrazovan od 10 subjedinica kod kvasaca i *Plasmodium*-a, dok je kod sisara utvrđeno prisustvo 11 subjedinica (Vázquez-Acevedo et al., 1993; Zara et al., 2009; Barton et al., 2010). Osnovne subjedinice mitohondrijalnog citohrom bc1 kompleksa su sledeće: citohrom b, u membranu ugrađen Rieske-ov gvožđe-sumporov protein (ISP) i citohrom c1, takođe ugrađen u membranu. Peter Mičel (Mitchell, 1975) je transport elektrona i protona kroz kompleks III nazvao »Q ciklus«, ali detalji ovog procesa i dalje nisu sasvim razjašnjeni. Ovaj kompleks ima dva mesta za koja se vezuje ubihinon. Za prvo se vezuje redukovani kofaktor (Qo mesto ili P centar), dok se za drugo vezuje oksidovani ubihinon (Qi mesto ili N centar).

S obzirom da su strobilurini imali sasvim nov i do tada nepoznat mehanizam delovanja, smatralo se da će pojava rezistentnosti na ove fungicide izostati. Međutim, prema Fernández-Ortuno et al. (2008), upravo je specifičan mehanizam delovanja najveća slabost strobilurina i glavni razlog razvoja rezistentnosti kod gljiva. Rezistentnost patogena na ova jedinjenja utvrđena je kod velikog broja prouzrokovaca raznih mikoza u Evropi, Aziji, Australiji, Severnoj i Južnoj Americi (FRAC, 2004; 2006). Opisana su dva mehanizma razvoja rezistentnosti na QoI fungicide (Sierotzki et al., 2000). Prvi mehanizam uslovljen je genskim mutacijama. Najčešća genska mutacija

kod pravih gljiva je zamena glicina aminokiselinom alaninom u 143. položaju (G143A) (Sierotzki et al., 2000; Gisi et al., 2002). Ova mutacija je utvrđena kod patogena *Mycosphaerella fijensis*, *Erysiphe graminis* i *Plasmopara viticola* (Olaya et al., 1998), rezistentnih na ove fungicide.

Drugi mehanizam rezistentnosti je uslovljen aktivacijom alternativnog oksidativnog puta. Inhibitori ćelijske respiracije i drugi stresni faktori kod nekih gljiva mogu usloviti ekspresiju alternativne oksidaze (Ypema i Gold, 1999). Ovaj mehanizam nastanka rezistentnosti kod patogena utvrđen je samo prilikom laboratorijskih ispitivanja osetljivosti izolata na fungicide koji utiču na ćelijsko disanje. Prema Albury et al. (2009), alternativne oksidaze se svrstavaju u karboksilatne proteine sa dva nehemiska gvožđa u katalitičkom centru, koji obuhvataju  $\Delta 9$  desaturazu, metan monooksigenazu, R2 subjedinicu ribonukleotid reduktaze, hemeritrin, rubreritrin i feritine. Alternativna oksidaza omogućava zaobilazjenje kompleksa III, direktno prenošeci elektrone sa ubihinola na kiseonik redukujući ga do vode, što rezultira smanjenoj produkciji ATP-a, čineći ćelije gljiva manje osetljivim na jedinjenja ove grupe (Ypema i Gold, 1999). Aktivacija alternativne oksidaze može biti konstitutivna i/ili indukovana. Konstitutivna ekspresija je utvrđena kod *Aspergillus niger* i *Gaeumannomyces graminis* (Kirimura et al., 1987; Joseph-Horne et al., 1998). Prema Heldt-Hansen et al. (1983), kod *Allomyces macrogynus* aktivnost alternativne oksidaze povećava se dodatkom cijanida. Sa ciljem sprečavanja patogena da aktiviraju ovu oksidazu, u *in vitro* ogledima primenjuje se hidroksamid salicilne kiseline (SHAM), koji inhibira ekspresiju alternativne oksidaze (Ziogas et al., 1997; Olaya et al., 2001). Prema rezultatima Steinfeld et al. (2002) i Küng-Färber et al. (2002), ekspresija ove oksidaze utvrđena je prilikom ispitivanja toksičnosti QoI fungicida za klijanje spora *Venturia inaequalis*. Wise et al. (2008), navode da je neophodna upotreba SHAM-a u ispitivanjima osetljivosti *Ascochyta rabiei* na presdavnike ove grupe, usled čega se dobijaju niže vrednosti srednjih efektivnih koncentracija, koje inhibiraju porast micelije 50 % u odnosu na kontrolu (EC<sub>50</sub>).



### 2.8.9. DMI fungicidi

Jedinjenja DMI grupe fungicida odlikuje vrlo specifičan mehanizam delovanja koji se zasniva na inhibiciji sinteze ergosterola. Ergosterol, najvažniji sterol kod većine gljiva, vrlo je bitna gradivna komponenta ćelijskih membrana koja utiče na njihovu permeabilnost. Poznate su sledeće grupe inhibitora sinteze ovog sterola: inhibitori skvalen oksidacije, inhibitori sterol  $\Delta^{14}$  redukcije i/ili  $\Delta^8$ - $\Delta^7$  izomerizacije, inhibitori C-4 demetilacije i inhibitori 14  $\alpha$ -demetilacije. Svi fungicidi koji inhibiraju 14  $\alpha$ -demetilaciju u sintezi sterola, svrstana su u istu grupu i označeni su kao inhibitori demetilacije (DeMethylation Inhibitors, DMI). Derivati imidazola, triazola, piridina, pirimidina i piperazina pripadaju DMI grupi fungicida (Scheinpflug, 1994; Kuck et al., 1995). Pripadnici ove grupe inhibiraju demetilaciju prekursora u procesu sinteze ergosterola u položaju C<sub>14</sub>, i to prekursora lanosterol ili 24-metilen dihidrolanosterol (Kato et al., 1974; Buchenauer, 1977; Siegel, 1981; Sisler et al., 1984). Onemogućavanje odvajanja metil grupe na molekulu lanosterola rezultira nakupljanjem metilovanih sterola, kao što su obtusifoliol i 14-metilfekosterol (Nozawa i Morita, 1986).

Prema Kuck et al. (1995), zahvaljujući sistemskim svojstvima, DMI fungicidi imaju izražen kurativni efekat u suzbijanju većeg broja prouzrokovaca oboljenja gajenih biljaka. U ovoj grupi fungicida dominiraju, pre svega, heterociklična jedinjenja sa tri azotova atoma u petočlanom prstenu, triazoli, koja su našla praktičnu primenu u poljoprivredi (Krämer i Schirmer, 2007). Difenokonazol i tebukonazol su derivati ovog heterocikličnog jedinjenja. Difenokonazol je prvi put uveden u primenu 1989. godine u Francuskoj. Odlikuje se sistemskim, protektivnim i kurativnim delovanjem. Koristi se za suzbijanje velikog broja gljiva, folijarnim tretiranjem i tretiranjem semena. Osim za suzbijanje patogena, primenjuje se i kao regulator rasta biljaka (Kuck et al., 1995). Takođe, utvrđeno je da difenokonazol poboljšava klijavost semena pšenice (Allen et al., 2004) i kukuruza (Munkvold i O'Mara, 2002, loc. cit. Allen et al., 2004). Fungicidna aktivnost tebukonazola ustanovljena je 1986. godine (Scheinpflug i Kaspers, 1986: loc. cit. Kuck et al., 1995). Sistemski je fungicid koga karakteriše protektivno, kurativno i eradikativno delovanje (Kundu et al., 2011). Koristi se za suzbijanje fitopatogenih gljiva

brojnih gajenih biljaka (voćaka, vinove loze i žita). Apsorbuje se vegetativnim delovima biljke i transportuje akropetalno (Kundu et al., 2011).

Prema FRAC (2018) klasifikaciji, ova jedinjenja svrstana su u fungicide sa srednjim rizikom za razvoj rezistentnosti, iako je ona utvrđena kod mnogih patogena uključujući *M. fructicola* (Zehr et al., 1999), *V. inaequalis* (Köller et al., 1997; Stević et al., 2010), *Podospaera xanthii* (McGrath i Shishkoff, 2001), *Uncinula necator* (Gubler i Ypema, 1996), *Sclerotinia homoeocarpa* (Golembiewski et al., 1995), *Cercospora beticola* (Karaoglanidis et al., 2000), itd. O osetljivosti izolata *D. applanata* na DMI fungicide nema literaturnih podataka. Rezistentnost srodne vrste *D. bryoniae* na DMI fungicide nije konstatovana (Thomas et al. 2012; Keinath i Hansen; 2013). Rezistentnost patogena na jedinjenja ove grupe, kvantitativnog je karaktera i razvija se postepeno (Georgopoulos i Skylakakis, 1986; Smith et al., 1991). Genetski mehanizmi razvoja rezistentnosti na DMI fungicide su različiti. Najčešći mehanizam nastanka rezistentnosti na ove fungicide predstavljaju genske mutacije u okviru *CYP51* gena (Délye et al., 1997; Cañas-Gutiérrez et al., 2009) i *ERG27* gena (Albertini i Leroux, 2004; Fraaije et al. 2007). Mutacije u okviru *CYP51* gena utvrđene su kod *U. necator* (Délye et al., 1997), *E. graminis* f.sp. *hordei* (Délye et al., 1998), *M. graminicola* (Cools et al. 2006; Leroux et al. 2007), *M. fijiensis* (Cañas-Gutiérrez et al., 2009) i *Tapesia* spp. (Albertini et al., 2003), rezistentnih na DMI fungicide. Mutacije u okviru gena *ERG27* ustanovljene su kod *B. cinerea* i one su uslovile nisku do umerenu rezistentnost izolata na DMI fungicide (Albertini i Leroux, 2004; Leroux et al. 2007).

Drugi mehanizam rezistentnosti na jedinjenja iz ove grupe fungicida uslovljen je promenama u nivou ekspresije *CYP51* gena. Pojačana ekspresija ovog gena utvrđena je kod izolata *Venturia inaequalis* (Schnabel i Jones, 2001), *M. fructicola* (Luo et al., 2008), *Blumeria jaapii* (Ma et al., 2006), *C. beticola* (Bolton et al., 2012), *Penicillium digitatum* (Hamamoto et al., 2001) i *Mycosphaerella graminicola* (Cools et al., 2012), rezistentnih na jedinjenja ove grupe. Takođe, prejaka ekspresija ABC transporter gena može usloviti rezistentnost patogena na DMI fungicide. Ova pojava utvrđena je kod izolata *B. cinerea* (Leroux i Walker 2011), *M. graminicola* (Cools et al. 2007), *P. digitatum* (Nakaune et al. 1998) i *V. inaequalis* (Köller i Wilcox, 2001).

### **3. MATERIJAL I METODE**

#### **3.1. Uzorkovanje i izolacija patogena**

Uzorci obolelih izdanaka maline, sa simptomima kestenjaste pegavosti sakupljeni su tokom četvorogodišnjeg perioda, od 2013. do 2016. godine, sa šest lokaliteta u rejonu gajenja maline u Srbiji (Požega, Prilike, Arilje, Ivanjica, Šabac i Valjevo). Svaki uzorak predstavlja jedan oboleli izdanak. Patogen je iz uzoraka izolovan standardnim fitopatološkim metodama (Dhingra i Sinclair, 1995). Fragmenti delova izdanka isčeni su na prelazu zdravog i obolelog tkiva sterilnim skalpelom i sterilisani u 2% rastvoru natrijum hipohlorita. Sterilni fragmenti su preneti na KDA podlogu i inkubirani na sobnoj temperaturi 7-10 dana do pojave kolonije patogena. Sa ciljem izdavnja čistih kultura, deo podloge sa micelijom presejan je na KDA podlogu. Genetski homogeni izolati dobijeni su prenošenjem fragmenata vrhova hife na KDA podlogu. Za dugotrajno održavanje, izolati su čuvani na temperaturi od -80°C u 20% glicerolu.

#### **3.2. Provera patogenosti izolata**

Provera patogenosti svih izolata gljive obavljena je veštačkom inokulacijom povređenih i nepovređenih izdanaka maline. Izdanci, visine oko 50 cm, uzeti su iz zasada maline i posađeni u plastične saksije dimenzija 11x11x11 cm. U središnjem delu izdanci su povređeni sterilnim skalpelom, nakon čega su inokulisani isečcima KDA podloge, prečnika 3 mm, sa micelijom čiste kulture izolata starosti sedam dana. Isečci su postavljeni tako da micelija bude u direktnom kontaktu sa povređenim epidermisom. Kod inokulacije nepovređenih izdanaka, isečci su nanošeni na nepovređeni epidermis u središnjem delu izdanaka. Sa ciljem obezbeđivanja povišene vlažnosti, inokulisano mesto pokriveno je vlažnom pamučnom vatom i parafilmom u trajanju od 48 h. Na izdanak u kontroli nanošen je fragment sterilne KDA podloge.

Pojava simptoma posmatrana je nakon sedam dana inkubacije na sobnoj temperaturi. Nakon pojave tamnobraon pega oko inokulisanih mesta, urađena je reizolacija patogena na KDA podlogu, korišćenjem istih metoda kao i pri izolaciji.

Reizolati su upoređeni sa izolatima korišćenim za inokulaciju, radi potvrde da su dobijeni simptomi nekroze inokulisanih izdanaka posledica patogene aktivnosti izolata.

### **3.3. Identifikacija patogena**

Patogen je identifikovan do nivoa vrste na osnovu makroskopskih i mikroskopskih morfoloških odlika (klasična identifikacija), kao i primenom lančane reakcije polimeraze (polymerase chain reaction, PCR) (molekularna identifikacija). Iako je identifikacija gljiva na osnovu morfoloških karakteristika znatno unapređena, brojne prepreke se javljaju kod *Didymella* vrsta, kao što su izostanak sporulacije ili nedoslednosti u septaciji, a jedan od većih problema je i taj što veliki broj gljiva ima anamorf *Phoma*. Imajući u vidu navedeno, primena molekularnih metoda je neophodna kako bi se potvrdili rezultati dobijeni klasičnom identifikacijom.

#### **3.3.1. Primena klasičnih metoda**

Makroskopske morfološke karakteristike svih izolata proučavane su na KDA i OA podlozi nakon inkubacije od sedam dana na sobnoj temperaturi. Posmatran je izgled kolonije izolata, ivice kolonije, boja i pigmentacija podloge. Od mikroskopskih odlika izolata posmatran je izgled piknida i piknospora, kao i peritecija i askospora. Za posmatranje piknida i piknospora uzeti su piknidi, formirani na OA podlozi nakon inkubacije od 45 dana. Za posmatranje izgleda askusa i askospora uzete su peritecije sa belih izdanaka. Plodonosne tvorevine gljive su površinski sterilisane u 2% rastvoru natrijum hipohlorita, a zatim su pripremani mikroskopski preparati koji su posmatrani optičkim mikroskopom Olympus CX41 (Tokio, Japan).

#### **3.3.2. Primena molekularnih metoda**

PCR je metoda za selektivno *in vitro* umnožavanje DNK sekvenci i podrazumeva umnožavanje fragmenata DNK kroz ponavljanje ciklusa toplotne denaturacije i sinteze novih lanaca korišćenjem prajmera i termostabilne Taq polimeraze (Stevanović i Arsić, 1997).

Analizirana je sekvenca amplikona unutrašnjeg transkribovanog regiona (Internal transcribed spacer, ITS) ribozomalne dezoksiribonukleinske kiseline (rDNK). Za amplifikaciju ITS regiona korišćene su specifične oligonukleotidne sekvence (prajmeri) ITS1 i ITS4 (White et al., 1990). Odabrano je 10 izolata za molekularnu identifikaciju. Ovi izolati *D. applanata* su kasnije korišćeni za utvrđivanje osetljivosti na fungicide različitih mehanizama delovanja i iz različitih hemijskih grupa *in vitro*.

### **3.3.2.1. Priprema izolata**

Deset izolata je zasejano na KDA podlogu i inkubirano na sobnoj temperaturi u trajanju od 7-15 dana. Nakon inkubacije urađena je izolacija DNK iz razvijene micelije izolata.

### **3.3.2.2. Izolacija DNK**

DNK je izolovana pomoću komercijalnog preparata PrepManX (Applied Biosystems, SAD), po uputstvima proizvođača, metodom koju su opisali Harrington i Wingfield (1995). Micelija je sakupljena sterilnom kopljastom iglom sa kolonija 10 izolata. Postupak je pažljivo izveden, kako bi se izbeglo unošenje podloge u smešu za izolaciju. U ependorf tube uzorci micelije uronjeni su u 50 µl pomenutog preparata i inkubirani 30 minuta na temperaturi od 56°C, a potom 10 minuta na temperaturi od 100°C. Ependorf tube sa izolovanom DNK, čuvane su na temperaturi od -20°C do dalje upotrebe.

### **3.3.2.3. Lančana reakcija polimeraze**

Umnožavanje pet genskih segmenata DNK iz ITS regiona nuklearne rDNK, izvršeno je korišćenjem univerzalnih prajmera ITS1 i ITS4 (White et al., 1990). Sekvenca ITS1 prajmera je 5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3', a ITS4 prajmera je 5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3'. Temperaturni uslovi PCR reakcije bili su sledeći: inicijalna denaturacija na temperaturi od 94°C u toku 90 sekundi; 29 ciklusa koje čine denaturacija na 94°C tokom 30 sekundi, vezivanje prajmera na temperaturi od

55°C u trajanju od 30 sekundi, elongacija na temperaturi 72°C u trajanju od 30 sekundi; završna elongacija na 72°C u trajanju od 540 sekundi.

PCR reakcije, izvedene u Eppendorf Master Cycler-u (Eppendorf, Germany), urađene su u zapremini od 25 µl. Komponente reakcione smeše bile su: 12,5 µl 2xPCR Master mix-a (Fermentas, Lithuania), 9,5 µl RNase-free vode (Molecular Biology Grade Water, Eppendorf), 1 µl oba prajmera (ITS1 i ITS4) i 1 µl izolovane DNK. Reakciona smeša bez DNK korišćena je kao negativna kontrola.

#### **3.3.2.4. Vizuelizacija i analiza produkata PCR reakcije**

Vizuelizacija unmoženih produkata PCR reakcije, urađena je elektroforetskim razdvajanjem nukleinskih kiselina u 1% agaroznom gelu u 1xTBE puferu, u aparatu za elektroforezu (Serva, Nemačka), pri naponu od 100 V. Agarozni gel je pripreman tako što je odrđena količina agaroze dodata u 1xTBE pufer, a zatim zagrejana do tačke ključanja u mikrotalasnoj rerni. Nakon hlađenja do temperature od 50-60°C, zagrejani gel (40 ml) sipan je u kalup. Pre razlivanja gela, u kalup je postavljen češalj tako da zupci češlja ne dodiruju dno kalupa. Nakon očvršćavanja gela na sobnoj temperaturi češalj je izvađen, a gel postavljen u kadicu za horizontalnu elektroforezu (BlueMarine100, Serva) sa 1xTBE puferom. U novim ependorf tubama po 5 µl svakog uzorka (produkta PCR reakcije) pomešano je sa 1 µl boje (Loading Dye, MBI Fermentas, Lithuania), nakon čega su uzorci nasuti u bunarčice. Korišćen je 1 kbp DNK marker (MBI Fermentas, Lithuania), sa veličinama fragmenta u bp od gornjeg ka donjem: 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 i 100. Gel je obojen potapanjem u 0,1 % rastvor etidijum bromida (10 minuta), a vizuelizacija umnoženih produkata u gelu urađena je u UV komori.

Za vizuelizaciju i analizu produkata PCR korišćen je 1 x TBE pufer koji sadrži 90 mM Tris; 90 mM borna kiselina i 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA.

#### **3.3.2.5. Prečišćavanje i sekvencioniranje**

PCR produkti su prečišćeni korišćenjem mi-PCR Purification Kit (Metabion International, Germany). U ependorf tubi jedna zapremina reakcione smeše i PCR

produkta pomešana je sa pet zapremina DNA pufera. Smeša je prenetu u kolonu i centrifugirana (1 minut, brzina 12000 rpm) na sobnoj temperaturi, sa ciljem vezivanja DNK za filter. Tečna faza je odbačena, a u kolonu je dodato 750 µl pufera da bi se isprale nečistoće, zatim je tubica sa uzorkom centrifugirana pri istim uslovima. Nakon centrifugiranja tečna faza je odbačena, a u kolone je dodato još 250 µl pufera za ispiranje i smeša je još jednom centrifugirana (1 minut, brzina 12000 rpm) na sobnoj temperaturi. Kolona je prebačena u novu ependorf tubu u koju je dodato 50 µl destilovane vode. Nakon centrifugiranja (1 minut, 12000 rpm), tečna faza je odbačena i u tubi ostaje filtrat sa DNK. Dobijena DNK čuvana je na temperaturi od 4°C do pripreme za slanje na sekvencioniranje.

Umnoženi fragmenti su sekvencionirani u Macrogen Inc. (Korea). Sekvence su obrađene u programu FinchTV Version 1.4.0. i poređene sa sekvencama, koje su javno dostupne u National Center for Biotechnology Information (NCBI) bazi podataka. Korišćen je BLAST program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) i softverski paket MEGA 5 (Tamura et al., 2011).

### **3.4. Optimizacija eksperimentalnih uslova za ispitivanje osetljivosti izolata *D. applanata* na fungicide *in vitro***

Sa ciljem optimizacije najboljih eksperimentalnih uslova za utvrđivanje osetljivosti izolata *D. applanata* na fungicide *in vitro*, proučen je uticaj hranljive podloge, temperature i svetlosnih uslova na porast micelije pet odabranih izolata (Da4E, Da44A, Da50A, Da64A i Da93A), poreklom sa pet lokaliteta (Šabac, Valjevo, Arilje, Ivanjica i Požega).

#### **3.4.1. Uticaj hranljivih podloga**

Brzina porasta micelije izolata praćena je na sledećim hranljivim podlogama:

- ❖ Krompir-dekstrozni agar (KDA) (potato dextrose agar, PDA): krompir (200 g), dekstroza (20 g), agar (17 g) i destilovana voda (1 l) (Muntañola-Cvetković, 1987).

- ❖ Ovseni agar (oatmeal agar, OA): ovsene pahuljice (33 g), agar (18 g) i destilovana voda (1 l) (Lindqvist-Kreuze et al., 2003).
- ❖ Čapek agar (Czapek agar, CzA):  $\text{NaNO}_3$  (3 g),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (1 g),  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  (0,50 g), KCl (0,50 g),  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  (0,01 g), saharoza (30 g), agar (15 g) i destilovana voda (1 l) (Muntañola-Cvetković, 1987).
- ❖ Malt agar (malt agar, MA): industrijski slad (500 ml), agar (17 g) i destilovana voda (500 ml) (Muntañola-Cvetković, 1987).
- ❖ Agar od šargarepe (carrot agar, CA): šargarepa (50 g), agar (22 g) i destilovana voda (1 l) (Onions, 1971).

Podloge su razlivane u Erlenmajer posude i sterilisane u autoklavu na temperaturi od 120°C, pri pritisku od 0,2 MPa u trajanju od 20 minuta. Nakon sterilizacije, podloge su razlivene u Petri posude, prečnika 60 mm, nakon što su ohlađene do temperature od 55°C. Sterilnim bušačem, prečnika 3 mm, napravljeni su iseći micelije u obliku diska sa ivice kolonije gljive starosti sedam dana gajene na KDA podlozi, koji su zatim sterilnom kopljastom iglom preneti na središnji deo Petri posude. Zasejane Petri posude inkubirane su na temperaturi od 22°C u mraku u trajanju od sedam dana. Brzina porasta micelije izolata utvrđena je merenjem prečnika kolonije u dva pravca pod pravim uglom. Ogled je izveden u dva nezavisna eksperimenta sa po tri ponavljanja, a podaci su statistički obrađeni.

### **3.4.2. Uticaj temperature**

Uticaj temperature na porast micelije izolata praćen je na OA podlozi na temperaturama 20, 22, 24 i 26°C. U Petri posude, prečnika 90 mm, naneti su iseći podloge sa micelijom u obliku diska, prečnika 3 mm, uzetih sa ivice kolonije gljive starosti sedam dana. Brzina porasta micelije izolata utvrđena je po postupku opisanom u



predhodnom potpoglavlju. Ogled je izveden u dva nezavisna eksperimenta sa po tri ponavljanja, a podaci su statistički obrađeni.

### 3.4.3. Uticaj svetlosnih uslova

Porast micelije izolata u različitim uslovima osvetljenja, stalni mrak i 12 h svetlost/12 h mrak, utvrđen je zasejavanjem micelije izolata na OA podlogu. Sterilnim bušačem, prečnika 3 mm, napravljeni su isečci micelije u obliku diska sa ivice kolonije gljive starosti sedam dana, koji su zatim sterilnom kopljastom iglom preneti na središnji deo Petri posude. One su potom inkubirane sedam dana na temperaturi od 22°C u gore navedenim uslovima osvetljenja. Brzina porasta micelije izolata utvrđena je po postupku opisanom u potpoglavlju uticaj hranljivih podloga. Ogled je izveden u dva nezavisna eksperimenta sa po tri ponavljanja, a podaci su statistički obrađeni.

### 3.5. Utvrđivanje osetljivosti izolata *D. applanata* na fungicide *in vitro*

#### 3.5.1. Izolati

Za utvrđivanje osetljivosti izolata *D. applanata* na fungicide, odabrani su izolati sa pet lokaliteta. Njihovo poreklo, veličina parcele, kao i istorija primene fungicida na parcelama sa kojih izolati potiču prikazan je u tabeli 1.

**Tabela 1.** *Didymella applanata*. Izolati, njihovo poreklo, veličina parcele i istorija primene fungicida

Lokalitet	Površina parcele (ha)	Broj izolata	Oznaka izolata	Istorija primene fungicida predhodnih godina
Arilje	0,4	50	Da4E Da17B	Cu preparati, ditianon, triazoli, strobilurini (3-5 puta godišnje)
Valjevo	0,5	65	Da25B Da44A	Cu preparati, ditianon, triazoli, strobilurini (1-3 puta godišnje)
Ivanjica	0,5	24	Da64A Da59A	Cu preparati, ditianon, triazoli, strobilurini (3-5 puta godišnje)
Požega	0,2	25	Da93A Da99A	Cu preparati, ditianon, triazoli, strobilurini (2-3 puta godišnje)
Šabac	0,2	14	Da50A Da58A	Cu preparati, ditiokarbamati

### 3.5.2. Fungicidi

U oglecima su korišćene komercijalne formulacije fungicida iz različitih hemijskih grupa i različitih mehanizama delovanja (Tabela 2).

**Tabela 2.** Pregled fungicida

No.	Aktivna supstanca (a.s.)	Preparat	Proizvođač	Sadržaj a.s. (g /L,kg)
1.	Cu – hidroksid	Kocide-2000	Du Pont	538
2.	mankozeb	Mankogal-80	Galenika -Fitofarmacija	800
3.	kaptan	Metod WG	Galenika -Fitofarmacija	800
4.	hlorotalonil	Dakoflo 720-SC	Galenika-Fitofarmacija	720
5.	ditianon	Delan 700-WG	BASF	700
6.	fluopiram	Luna	Bayer Crop Science	500
7.	boskalid	Cantus	BASF	500
8.	azoksistrobin	Promesa	Galenika-Fitofarmacija	250
9.	piraklostrobin	Retengo	BASF	200
10.	fluazinam	Zignal 500 SC	Cheminova	500
11.	difenokonazol	Sekvenca	Galenika -Fitofarmacija	250
12.	tebukonazol	Akord WG	Galenika -Fitofarmacija	250

### 3.5.3. Utvrđivanje osetljivosti izolata *D. applanata* na fungicide

Parametri osetljivosti izolata *D. applanata* na fungicide utvrđeni su po delimično modifikovanoj metodi Leroux i Gredt (1972) na OA podlozi. Preliminarnim ispitivanjima pet koncentracija svakog fungicida (0,1; 1; 10; 100 i 1000 mg/L) određene su koncentracije kojima se postiže inhibicija porasta micelije izolata u intervalu između 5% i 95%, u poređenju sa kontrolom. Za utvrđivanje parametara osetljivosti korišćena je skala sa simetrično raspoređenim koncentracijama u utvrđenom intervalu, kako bi se dobila što pouzdanija vrednost koncentracije fungicida koja inhibira porast micelije 50% (EC<sub>50</sub>) u odnosu na kontrolu (Robertson et al., 1984). Pregled koncentracija fungicida, koje su inhibirale porast micelije u opsegu 5-95 % za utvrđivanje osetljivosti izolata prikazan je u tabeli 3.

**Tabela 3.** Pregled koncentracija fungicida

Fungicid	Koncentracija (mg/L)
Cu-hidroksid	25; 50; 75 i 100
mankozeb	0,62; 1; 1,25; 2,50; 5 i 10
kaptan	5; 10; 15; 25; 50 i 100
hlorotalonil	0,5; 1; 2,5; 5; 10 i 50
ditianon	5; 10; 15; 25; 50 i 100
fluopiram	0,1; 1; 5 i 10
boskalid	0,1; 1; 10; 100 i 1000
azoksitrobin	0,01; 0,05; 0,1; 1; 10; 25; 50; 100; 1000 i 2000
piraklostrobin	0,01; 0,05; 0,1; 1; 10; 25; 50; 100 i 250
fluazinam	2,5; 5; 10; 25; 50 i 75
difenokonazol	0,08; 0,16; 0,31; 0,62; 1,25 i 2,5
tebukonazol	0,62; 1,25; 2,5; 5 i 7,5

Serije disperzija fungicida odgovarajućih koncentracija napravljene su dispergovanjem fungicida u sterilnoj destilovanoj vodi. Zatim su disperzije fungicida dodavane u otopljenu OA podlogu, ohlađenu do 55°C, u odnosu 1:9 uz neprestano mešanje na magnetnoj mešalici tipa Velp Scientifica. Na ovoj temperaturi (55°C) podloga je i dalje u tečnom stanju što omogućava mešanje sa disperzijom fungicida u sterilnoj destilovanoj vodi, a takođe je i dovoljno hladna kako bi se predupredila degradacija aktivne supstance. Kao kontrola korišćena je OA podloga, u koju je umesto fungicida dodavana ista količina sterilne destilovane vode. Podloga, u koju je prethodno inkorporiran fungicid, u sterilnim uslovima razlivena je u Petri posude prečnika 90 mm. Nakon očvršćavanja podloge na sobnoj temperaturi, Petri posude zasejavane su micelijom izolata uzete sa ivice dobro razvijene kolonije starosti sedam dana gajene na OA podlozi na temperaturi od 22°C u mraku. Pomoću bušaća prečnika 3 mm napravljena su tri isečka micelije u obliku diska, koji su sterilnom kopljastom iglom prenošeni na Petri posude sa OA podlogom u koju je prethodno inkorporiran fungicid, a takođe i u kontrolne podloge. Iseči su pažljivo raspoređeni u obliku trougla. Ogled je izveden u dva ponavljanja po tretmanu, korišćenjem po dve Petri posude i ponovljen je tri puta. Petri posude inkubirane su šest dana na temperaturi od 22°C u mraku. Porast micelije meren je kada micelija izolata ispuni približno 2/3 Petri posude u kontroli. Očitavanje rezultata je vršeno merenjem prečnika kolonije ne računajući prečnik zasejanog isečka i izračunata je njihova srednja vrednost.

Utvrđivanje osetljivosti izolata *D. applanata* na boskalid, azoksistrobin i piraklostrobin urađeno je prmenom metode koja je predhodno opisana. Preliminarnim ispitivanjima utvrđeno je da nijedna koncentracija ovih fungicida ne dovodi do inhibicije porasta micelije u odnosu na kontrolu. Imajući u vidu da pojedine vrste imaju sposobnost aktivacije alternativne oksidaze (Ypema i Gold, 1999) u ispitivanjima osetljivosti izolata patogena na fungicide koji inhibiraju proces disanja, u podlogu je osim fungicida dodavan hidroksamid salicilne kiseline. Sa ciljem utvrđivanja najviše koncentracije koja nije toksična za miceliju izolata *D. applanata*, izvršena je provera toksičnosti hidroksamid salicilne kiseline za svaki izolat. Rastvori hidroksamid salicilne kiseline različitih koncentracija (0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 100 i 1000 mg/L), inkorporirani su u OA podlogu u odnosu 1:9. U kontrolu je u smeši sa SHAM-om umesto fungicida dodata sterilna destilovana voda. Zasejavanje podloga i očitavanje efekata obavljeno je kao i za ostale fungicide.

#### **3.5.4. Utvrđivanje uticaja različitih temperatura na toksičnost fungicida za izolate *D. applanata* u *in vitro* uslovima**

Utvrđivanje toksičnosti fungicida na različitim temperaturama za izolate *D. applanata* u *in vitro* uslovima, urađeno je metodom koja je detaljno opisana u prethodnom potpoglavlju. Za istraživanje su korišćena dva slučajno odabrana izolata (Da50A i Da99A), a toksičnost fungicida je proučavana na dve temperature, jednoj nižoj i jednoj višoj od optimalne (15°C i 26°C).

Za izolat Da50A period inkubacije na temperaturi od 15°C iznosio je 14 dana, a na temperaturi od 26°C u trajanju od 12 dana. Period inkubacije za izolat Da99A na temperaturi od 15°C bio je 10 dana, a na temperaturi od 26°C iznosio je devet dana. Porast micelije izolata meren je kada micelija ispuni približno 2/3 Petri posude u kontroli. Očitavanje efekata obavljeno je kao što je predhodno opisano.

### 3.5.5. Obrada rezultata

Izmerene vrednosti prečnika kolonije svake varijante poređene su sa vrednostima prečnika u kontroli i na taj način su utvrđene vrednosti inhibicije porasta micelije izraženu u procentima za svaki fungicid i izolat. Statistička obrada podataka urađena je metodom probit analize pomoću softvera "LdP Line" (Finney,1964; Lakić i Vukša, 1991; Aucejo et al., 2003; Follett i Neven, 2006). Između koncentracije fungicida i procenta inhibicije postoji krivolinijska zavisnost. Transformacijom koncentracija u logaritme koncentracija i inhibicije u probit vrednosti, između ovih vrednosti uspostavlja se linearna zavisnost koja se izražava jednačinom:  $Y=a + bx$  Imajući u vidu navedeno, za probit analizu korišćeni su rezultati najmanje četiri koncentracije i preračunati na procenat inhibicije u odnosu na kontrolu (Finney,1964). Regresioni koeficijenti "a" i "b" određuju se na osnovu jednačina:

$$ak + b\sum x = y$$

$$a\sum x + b\sum x^2 = \sum xy$$

gde je "k" broj primenjenih koncentracija.

Na osnovu regresionih koeficijenata "a" i "b" i odgovarajuće probit vrednosti (p) određuje se logaritamska vrednost medijalne (m) efektivne koncentracije, po obrascu:  $m = (p-a)/b$  (Finney,1964). Antilogaritmovanjem vrednosti "m" dobija se apsolutni iznos koncentracije fungicida koja inhibira porast micelije 50% u odnosu na kontrolu ( $EC_{50}$ ).

Faktor rezistentnosti (RF), izračunat je po obrascu:  $RF=EC_{50}(x)/EC_{50}(n)$  (Dekker, 1995).  $EC_{50}(x)$  predstavlja vrednost srednje efektivne koncentracije posmatranog izolata, a  $EC_{50}(n)$  vrednost srednje efektivne koncentracije najosetljivijeg izolata u eksperimentu (Dekker, 1995). Nivo rezistentnosti je utvrđen na osnovu skale koju je predložio Gouot (1994), za utvrđivanje nivoa rezistentnosti izolata *B. cinerea* na dikarboksamide:

RF < 3 - osetljivi izolati;

RF = 3-20 - umereno rezistentni;

RF = 20-100 - rezistentni

RF > 100 - visoko rezistentni izolati.

### 3.6. Ispitivanje efikasnosti fungicida u zaštiti maline od *D. applanata*

Ispitivanje efikasnosti fungicida izvedeno je u zasadu maline na lokalitetu Trešnjevica (Arilje) (GPS: N 43 68. 826'; E 20 132. 45'), u toku tri vegetacione sezone (2014., 2015. i 2016. godine). Eksperimenti su se sastojali od 10 fungicidnih varijanti i kontrole (varijanta u kojoj nisu primenjivani fungicide) (Tabela 4). Ogledi su postavljeni u skladu sa EPPO (1997) metodologijom, po tipu potpunog slučajnog blok sistema sa četiri ponavljanja. Tretiranja su vršena preventivno, ukupno pet puta (četiri puta pre i jednom nakon završene berbe). Primena fungicida vršena je pomoću leđnog orošivača (*Solo 423*, Germany), uz utrošak vode od 1000 L/ha. Osnovni podaci o ogledima dati su u tabeli 5.

Ocena intenziteta oboljenja urađena je nakon pojave simptoma u kontroli, odnosno nakon ispoljavanja jasnih razlika između tretiranih varijanti i kontrole. Jednogodišnji izdanci maline klasifikovani su na osnovu intenziteta oboljenja u četiri kategorije: 0 = zdrav izdanak; 1 = jedna pega na izdanku; 2 = dve do tri pege; 3 = više od tri pege (Slika 2). Intenzitet oboljenja izračunat je pomoću Towsen-Hoerberger-ove formule, a efikasnost fungicida po formuli Aboott-a. Značajnost razlika utvrđena je pomoću analize varijanse i Dankanovog višestrukog testa intervala (Duncan, 1975).



**Slika 2.** *Didymella applanata*. Skala korišćena za ocenu intenziteta oboljenja

Townsend-Heuberger-ova formula

$$\text{Intenzitet oboljenja} = \frac{\sum nV}{pN} \times 100$$

V – vrednost kategorije  
 p – najviša vrednost kategorije  
 n – broj izdanaka u svakoj kategoriji  
 N – ukupan broj pregledanih izdanaka

Aboott-ova formula

$$\% \text{ Efikasnost} = \frac{X-Y}{X} \times 100$$

X – int. oboljenja u kontroli  
 Y – int. oboljenja u tretmanu

**Tabela 4.** Pregled fungicida korišćenih u ogledima ispitivanja efikasnosti

No.	Aktivna supstanca	Preparat	Proizvođač	Sadržaj a.s. (g/kg (L))
1.	Cu- hidroksid	Kocide-2000	Du Pont	538
2.	mankozeb	Mankogal-80	Galenika -Fitofarmacija	800
3.	piraklostrobin	Retengo	BASF	200
4.	ditianon	Delan 700-WG	BASF	700
5.	fluazinam	Zignal 500 SC	Cheminova	500
6.	boskalid	Cantus	BASF	500
7.	azoksistrobin	Quadris	Syngenta	250
8.	fluopiram	Luna	Bayer Crop Science	500
9.	hlorotalonil	Dakoflo 720-SC	Galenika-Fitofarmacija	720
10.	tebukonazol	Akord WG	Galenika -Fitofarmacija	250

**Tabela 5.** Osnovni podaci o poljskim ogledima

Godina ispitivanja	2014.	2015.	2016.
Lokalitet	Trešnjevica (Arilje)	Trešnjevica (Arilje)	Trešnjevica (Arilje)
Usev	Malina	Malina	Malina
Sorta	Willamette	Willamette	Willamette
Starost zasada	19 god.	19 god.	19 god.
Uzgojni oblik	Špalir	Špalir	Špalir
Veličina parcele	10 m	10 m	10 m
Broj ponavljanja	4	4	4
Datumi tretiranja i fenofaze	12.04. Izbojci: 5-10 cm 30.04. Izbojci: 15-20 cm 11.05. Izbojci: 25-35 cm 24.05. Otvoreno 30% cvetova 05.08. Berba završena	26.04. Izbojci: 5-8 cm 09.05. Izbojci: 20-30 cm 23.05. Izbojci: 35-40 cm 06.06. Otvoreno 40% cvetova 05.08. Berba završena	29.03. Izbojci: 5-10 cm 14.04. Izbojci: 15-20 cm 05.05. Izbojci: 25-35 cm 23.05. Otvoreno 25% cvetova 05.08. Berba završena
Datum ocene	26.08.2014.	29.08.2015.	27.08.2016.

### 3.6.1. Utvrđivanje kritičnog perioda za primenu fungicida

Eksperiment je izveden 2016. godine, uporedo sa ispitivanjem efikasnosti ostalih fungicida. Ogled se sastojao od sedam varijanti. U prvoj varijanti, fungicid koji je ostvario najveću efikasnost tokom 2014. godine, primenjen je u svih pet tretiranja. U drugoj varijanti, primena fungicida izostavljena je samo u prvom tretiranju, a u trećoj varijanti primena je izostavljena u drugom tretiranju. U četvrtoj varijanti, primena fungicida izostavljena je samo u trećem tretiranju. U petoj varijanti, fungicid nije primenjen u četvrtom tretiranju, a u šestoj varijanti samo u petom tretiranju. Sedma varijanata je ona u kojoj nisu primenjivani fungicidi (kontrola). Šema ogleda prikazana je u tabeli 6.

**Tabela 6.** Šema ogleda za utvrđivanje kritičnog vremena za primenu fungicida

Ispitivane varijante	TRETIRANJA				
	I	II	III	IV	V
1.	+	+	+	+	+
2.	-	+	+	+	+
3.	+	-	+	+	+
4.	+	+	-	+	+
5.	+	+	+	-	+
6.	+	+	+	+	-
7.	-	-	-	-	-



## 4.REZULTATI

### 4.1. Monohifalni izolati

Pregledom šest lokaliteta u regionu Šumadije i zapadne Srbije, sakupljeno je 260 uzoraka obolelih izdanaka. Nakon inkubacije od 7-10 dana na sobnoj temperaturi, oko fragmenata izdanaka na podlozi formirale su se kolonije gljive (Slika 3). Izolovano je ukupnoukupno 178 izolata sa micelijom nalik vrstama roda *Didymella*.



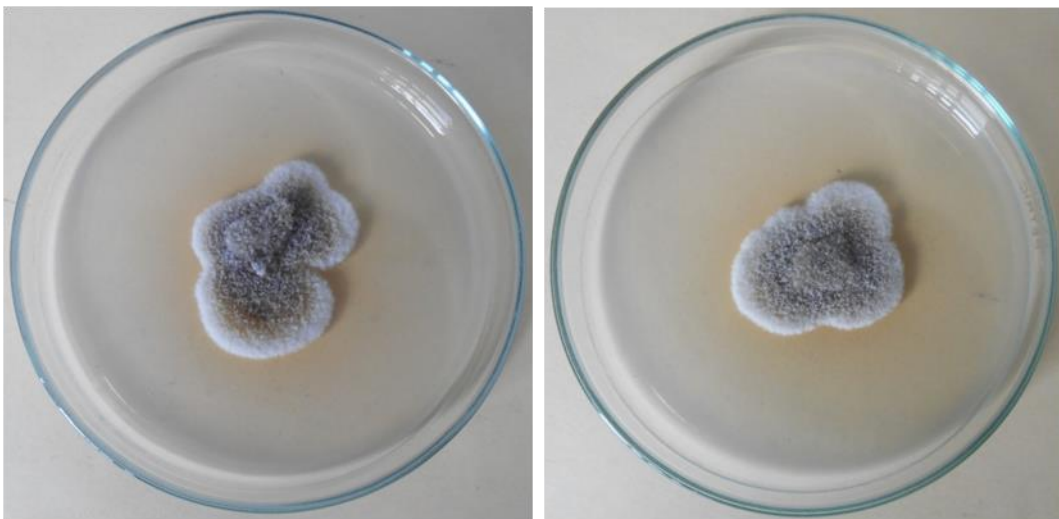
**Slika 3.** *Didymella applanata*. Kolonija gljive oko fragmenata izdanaka na KDA podlozi nakon 10 dana inkubacije na sobnoj temperaturi

### 4.2. Patogenost izolata

Utvrđeno je da su svi izolati *Didymella* spp. nakon sedam dana inkubacije na sobnoj temperaturi prouzrokovali 3 cm duge, nekrotične pege braon boje, tipične za *D. applanata* (Slika 4). Kod negativne kontrole nije došlo do pojave simptoma tipa nekroze, niti bilo kakvih drugih promena (Slika 4). Dobijeni reizolati su po izgledu kolonije i morfologiji reproduktivnih tvorevina u potpunosti odgovarali izvornim izolatima, čime je potvrđena patogenost izolata i ispunjeni Kohovi postulati (Slika 5).



**Slika 4.** *Didymella applanata*. Nekroza na inokulisanom nepovređenom izdanku maline (levo), nekroza na inokulisanom povređenom izdanku (sredina) i kontrola (desno), nakon inkubacije od sedam dana na sobnoj temperaturi



**Slika 5.** *Didymella applanata*. Izolat (levo) i reizolat (desno) Da18B, starosti sedam dana na KDA podlozi

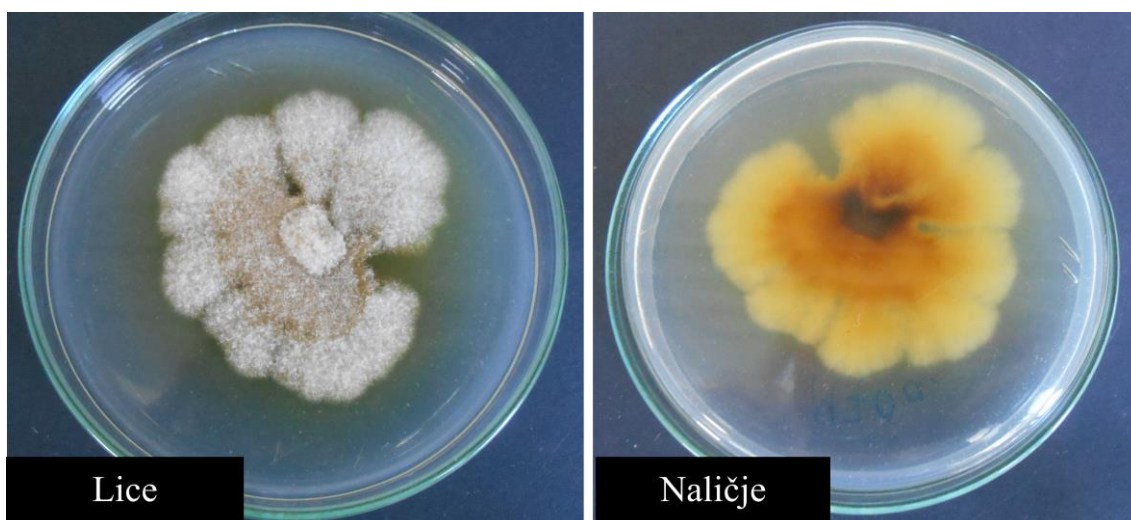
### 4.3. Identitet patogena

#### 4.3.1. Klasične metode

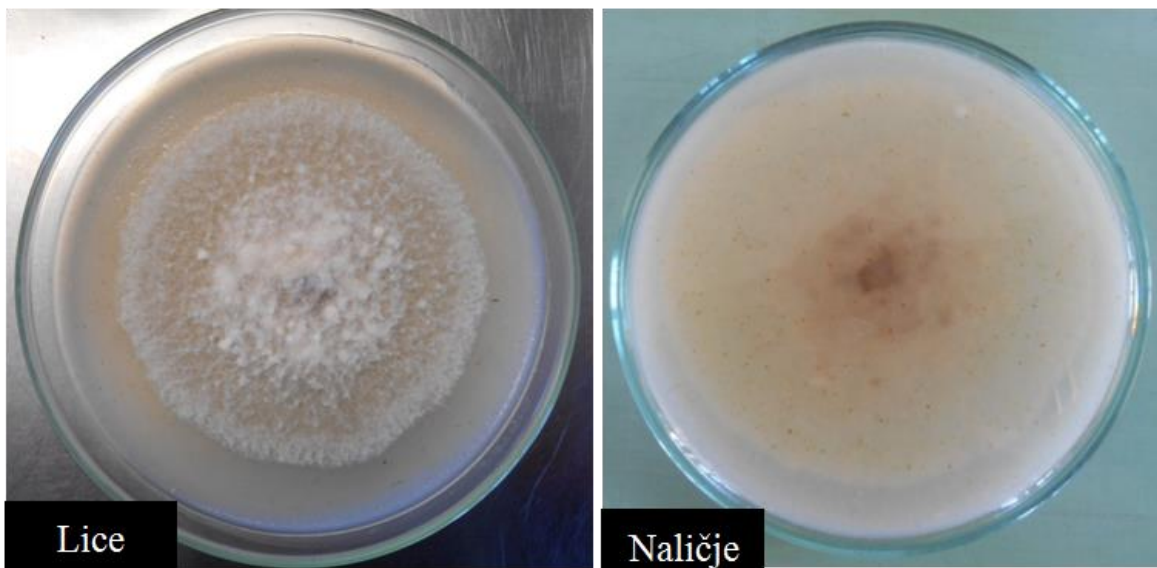
Većina izolata *D. applanata* na KDA podlozi obrazovala je pepeljasto sivu koloniju, nepravilnog oblika, režnjevutih ivica, sa naličja svetlobraon boje na krajevima i tamnobraon do crne boje u središnjem delu kolonije (Slika 6). Nekoliko izolata je formiralo kolonije pravilnog oblika i ravnih ivica. U KDA podlogu, svi izolati su lučili žuto narandžasti pigment. Na ovsenoj podlozi izolati su formirali žuto belu koloniju, ovalnog oblika, ravnih ivica, sa naličja svetlobraon boje (Slika 7).

U kulturi staroj 45 dana, na OA i KDA podlozi, mogli su se zapaziti tamnobraon kruškoliki piknidi, veličine 200-250  $\mu\text{m}$ . Unutar piknida uočavale su se hijalinske, jednoćelijske, cilindrične konidije veličine 4-7,5 $\times$ 2-4  $\mu\text{m}$  (Slika 8).

Na srebrnastim delovima kore obolelih izdanaka formirali su se crne, pojedinačne ili grupisane, ogruglasto spljoštene peritecije veličine 200-270  $\mu\text{m}$  u prečniku (Slika 8). Unutar peritecija nalazili su se dvoslojni, cilindrični askusi veličine 60-80 $\times$ 10-20  $\mu\text{m}$  sa eliptičnim, dvoćelijskim, hijalinskim askosporama (12-20 $\times$ 5-7  $\mu\text{m}$ ).



**Slika 6.** *Didymella applanata*. Izgled kolonije na KDA podlozi nakon inkubacije od 18 dana na sobnoj temperaturi, lice (levo) i naličje (desno)



**Slika 7.** *Didymella applanata*. Izgled kolonije na OA podlozi nakon inkubacije od 18 dana na sobnoj temperaturi, lice (levo) i naličje (desno)



**Slika 8.** *Didymella applanata*. Piknidi na OA podlozi (levo) i peritecije na srebrnastim izdancima maline

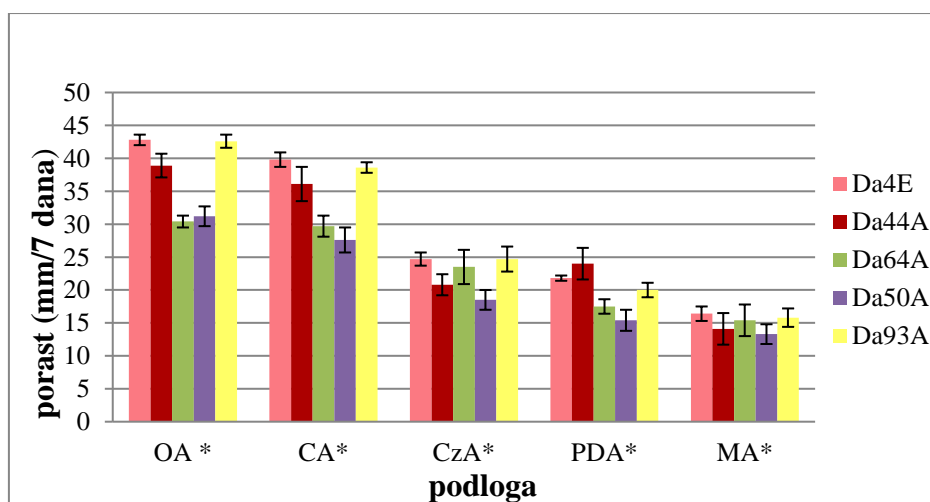
### 4.3.2. Molekularne metode

Kao rezultat lančane reakcije utvrđeno je prisustvo amplifikovanih fragmenata DNK veličine 500-600 bp kod svih izolata. Do amplifikacije nije došlo kod negativne kontrole. Nakon sekvencioniranja amplikona i njihove obrade, utvrđeno je da izolati pripadaju vrsti *D. applanata*.

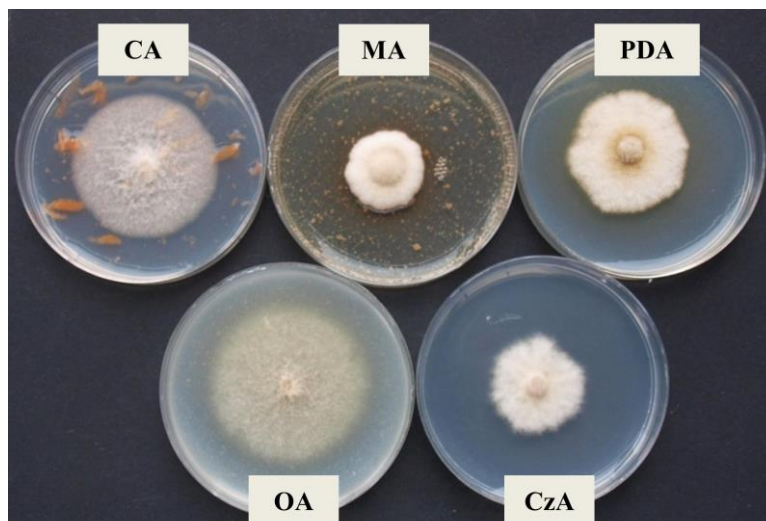
### 4.4. Uslovi i osetljivost izolata *D. applanata* na fungicide *in vitro*

#### 4.4.1. Značaj hranljivih podloga

Hranljive podloge značajno su uticale na porast micelije izolata ( $P < 0,05$ ) (Grafikon 1). Micelija svih izolata najbrže je rasla na OA podlozi. Najveći poarast na ovoj podlozi od 42,8 i 42,6 mm/7 dana, utvrđen je za izolate Da4E i Da93A, dok je porast micelije preostala tri izolata bio 30,4-38,9 mm/7 dana. Najsporiji porast micelije, za sve izolate, bio je na MA podlozi (13,3-16,4 mm/7 dana). Takođe, ispoljene su značajne razlike u morfološkim osobinama kolonija izolata na hranljivim podlogama. Na OA i CA podlozi izolati su formirali kolonije pravilnog oblika sa ravnim ivicama, dok je na ostalim podlogama oblik kolonije nepravilan i režnjevutih ivica (Slika 9).



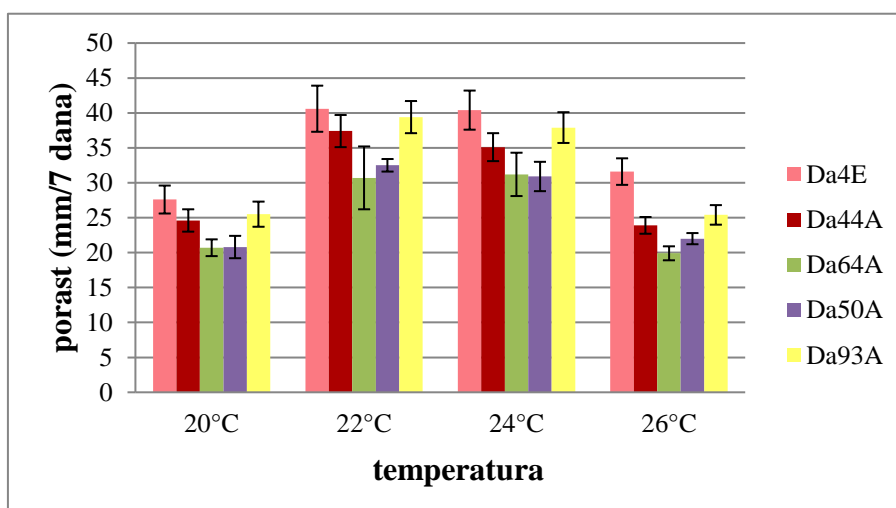
**Grafikon 1.** *Didymella applanata*. Uticaj različitih hranljivih podloga na porast micelije izolata. (\*OA-ovsena podloga; CA-podloga od šargarepe; CzA-Čapekova podloga; PDA-podloga od krompira, dekstroze i agara; MA- malt podloga).



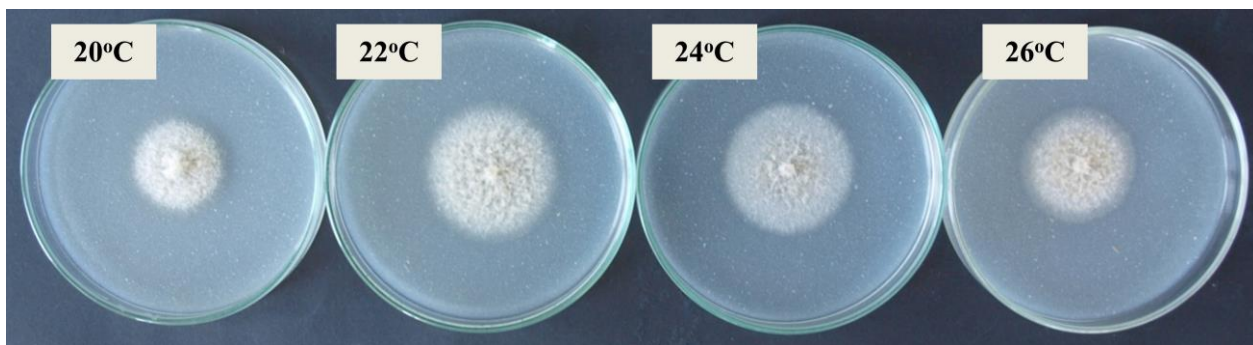
**Slika 9.** *Didymella applanata*. Izolat Da44A na različitim hranjivim podlogama nakon inkubacije od sedam dana na temperaturi 22°C

#### 4.4.2. Značaj temperature

Temperature su značajno uticale na porast micelije izolata *D. applanata* ( $P < 0,05$ ) (Grafikon 2). Četiri od pet izolata, imala su najveći porast na temperaturi od 22°C (32,5-40,6 mm/7 dana). Takođe, razlika u brzini porasta svih izolata na temperaturama 22°C i 24°C nije bila značajna. Različite temperature nisu uticale na morfološke osobine kolonije odabranih izolata (Slika 10).



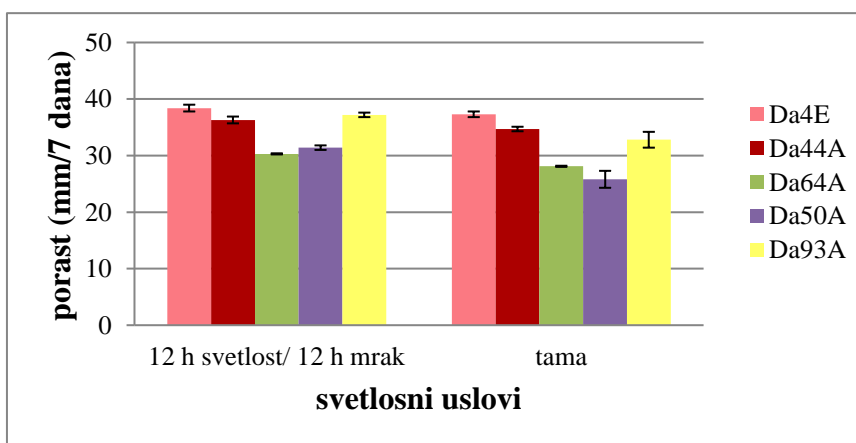
**Grafikon 2.** *Didymella applanata*. Uticaj različitih temperatura na porast micelije izolata.



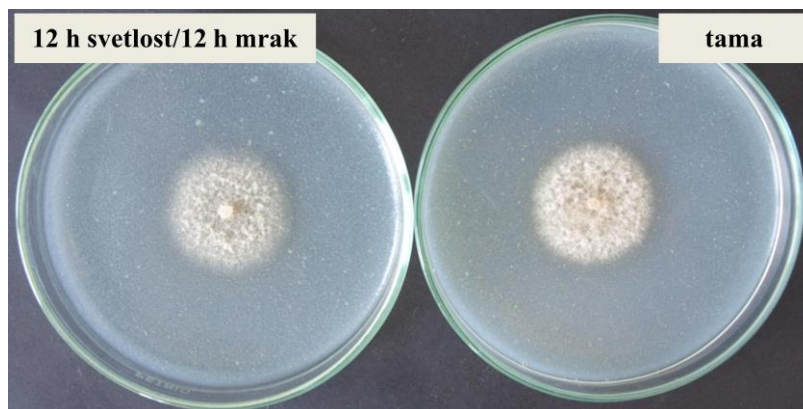
**Slika 10.** *Didymella applanata*. Izolat Da4E na ovsenoj podlozi nakon sedam dana inkubacije na temperaturama 20, 22, 24 i 26°C

#### 4.4.3. Značaj svetlosnih uslova

Utvrđena je statistički značajna razlika u prosečnom porastu micelije izolata u mraku i 12 h svetlost/12 h mrak, na nivou značajnosti 0,05 (Grafikon 3). Svi izolati *D. applanata*, nakon inkubacije od sedam dana, imali su brži prosečan porast u svetlosnom uslovu 12 h svetlost/12 h mrak (30,3-38,4 mm/7 dana), nego u mraku (25,8-37,3 mm/7 dana). Svetlosni uslovi nisu uticali na morfološke osobine kolonije izolata (Slika 11).



**Grafikon 3.** *Didymella applanata*. Uticaj različitih svetlosnih uslova na porast micelije izolata.



**Slika 11.** *Didymella applanata*. Izolat Da50A na ovsenoj podlozi nakon sedam dana inkubacije na sobnoj temperaturi

Imajući u vidu da je najbrži porast micelije izolata utvrđen na OA podlozi i da su na njoj svi izolati formirali kolonije ovalnog oblika, ravnih ivica, OA podloga i temperatura od 22°C su odabrane za utvrđivanje osetljivosti izolata na fungicide *in vitro*. Iako je utvrđen brži prosečan porast micelije izolata *D. applanata* u svetlosnom uslovu 12 h svetlost/12 h mrak, za ispitivanje osetljivosti izolata na fungicide odabran je stalni mrak, kao pogodniji za eksperiment.

#### **4.5. Osetljivost izolata *D. applanata* na fungicide**

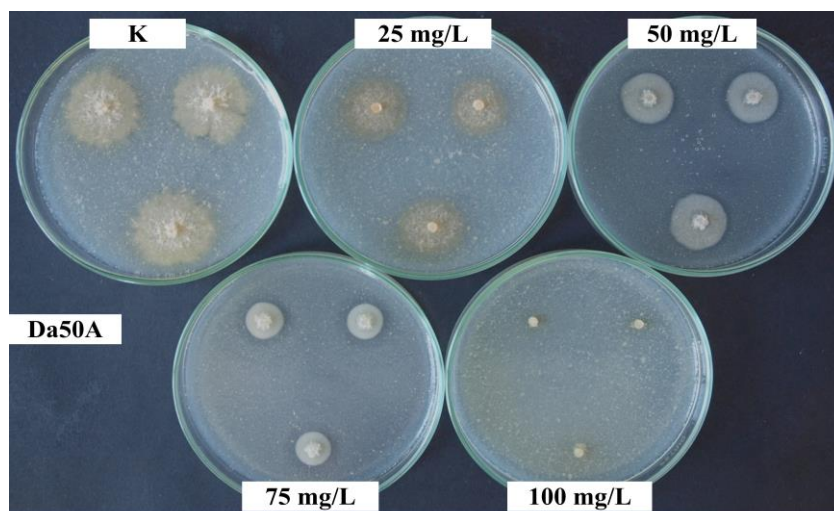
Gajenjem izolata *D. applanata* na hranljivoj podlozi sa inkorporisanim fungicidima utvrđene su značajne razlike u porastu micelije, kako između različitih izolata, tako i u pogledu fungicida (Slike 12-23; Tabele 7-18).

##### **4.5.1. Cu-hidroksid**

Cu-hidroksid je ujednačeno uticao na porast micelije svih izolata *D. applanata*. U intervalu koncentracija fungicida od 25 do 100 mg/L, utvrđena je inhibicija porasta micelije izolata u rasponu 17,33-89,17% u odnosu na kontrolu. Pri koncentraciji od 50 mg/L utvrđena je inhibicija porasta micelije u intervalu od 44,84% (Da93A) do 60,09% (Da25B). Pri najvišoj koncentraciji od 100 mg/L, inhibicija je bila preko 80% u odnosu na kontrolu za sve izolate (Slika 12).



Od 10 izolata *D. applanata*, izolat Da25B bio je najosetljiviji na ovaj fungicid. EC<sub>50</sub> vrednost Cu-hidroksida za ovaj izolat iznosila je 39,48 mg/L. Najniža osetljivost utvrđena je kod izolata Da99A (EC<sub>50</sub> 51,19 mg/L). EC<sub>50</sub> vrednosti preostalih osam izolata bile su između 41,46 i 48,69 mg/L (Tabela 7). Svi izolati su imali vrednost faktora rezistentnosti manju od 1,3. Regresioni koeficijent b, koji izražava relativnu osetljivost izolata, bio je u intervalu od 2,48 za izolat Da59A do 3,19 za izolat Da99A (Tabela 7).



**Slika 12.** *Didymella applanata*. Porast micelije izolata na podlozi sa Cu- hidroksidom

**Tabela 7.** *D. applanata*. Osetljivost izolata na Cu-hidroksid.

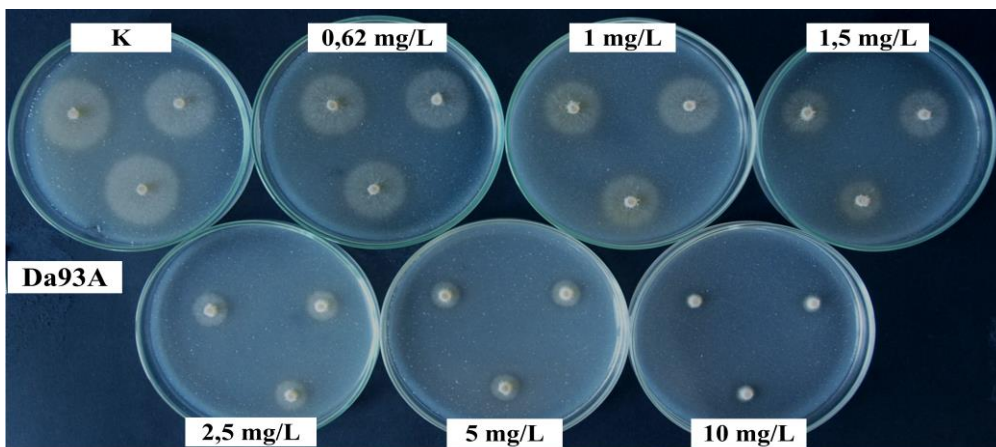
Izolat	Cu - hidroksid		
	EC <sub>50</sub> (mg/L)*	b**	RF***
Da4E	43,36 (37,67-48,75)	2,66 (2,35-2,96)	1,1
Da17B	48,69 (43,09-54,32)	2,79 (2,48-3,10)	1,2
Da25B	39,48 (34,16-44,37)	2,81 (2,49-3,12)	1,0
Da44A	44,44 (39,04-49,63)	2,82 (2,51-3,14)	1,1
Da64A	44,79 (39,27-50,12)	2,76 (2,45-3,07)	1,1
Da59A	45,79 (39,66-51,74)	2,48 (2,18-2,79)	1,2
Da93A	47,10 (41,30-52,83)	2,66 (2,35-2,96)	1,2
Da99A	51,19 (46,08-56,43)	3,19 (2,87-3,52)	1,3
Da50A	41,46 (35,81-46,72)	2,65 (2,35-2,96)	1,1
Da58A	41,98 (36,60-47,05)	2,80 (2,48-3,11)	1,1

\* interval poverenja 95 % ( $P=0,05$ ); \*\* koeficijent regresije; \*\*\* faktor rezistentnosti

#### 4.5.2. Mankozeb

Mankozeb je ujednačeno uticao na porast micelije izolata. Za ispitivanje osetljivosti izolata na ovaj fungicid korišćena je skala od 0,62 do 10 mg/L. Najniža koncentracija (0,62 mg/L) inhibirala je porast micelije izolata u intervalu od 13,37% (Da99A) do 34,55% (Da58A). Koncentracija od 2,5 mg/L inhibirala je porast micelije izolata preko 48% u odnosu na kontrolu, dok je najviša koncentracija (10 mg/L) inhibirala porast micelije u rasponu 78,03-90,08% (Slika 13).

Vrednosti parametara osetljivosti izolata *D. applanata* na mankozeb prikazane su u tabeli 8.  $EC_{50}$  vrednosti bile su u intervalu od 1,33 do 2,88 mg/L. Izolat Da58A bio je najosetljiviji ( $EC_{50}$  1,33 mg/L), dok je najmanju inhibiciju porasta micelije mankozeb ispoljio za izolate Da44A (2,83 mg/L) i Da17B (2,88 mg/L). Vrednosti faktora rezistentnosti za sve izolate bile su ispod 2,2. Vrednosti regresionog koeficijenta bile su u rasponu od 1,29 do 1,89 (Tabela 8).



Slika 13. *Didymella applanata*. Porast micelije izolata na podlozi sa mankozebom

**Tabela 8.** *D. applanata*. Osetljivost izolata na mankozeb.

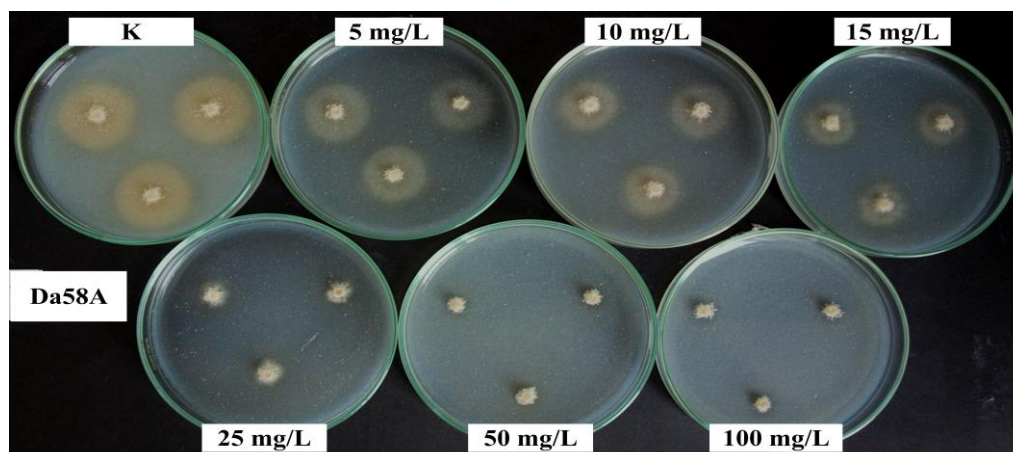
Izolat	Mankozeb		
	EC <sub>50</sub> (mg/L)*	b**	RF***
Da4E	2,79 (2,37-3,34)	1,53 (1,39-1,67)	2,1
Da17B	2,88 (2,47-3,42)	1,64 (1,50-1,78)	2,2
Da25B	1,65 (1,41-1,92)	1,66 (1,51-1,81)	1,2
Da44A	2,83 (2,40-3,78)	1,55 (1,41-1,69)	2,1
Da64A	1,75 (1,43-2,12)	1,29 (1,15-1,43)	1,3
Da59A	2,00 (1,74-2,29)	1,89 (1,74-2,04)	1,5
Da93A	2,37 (2,04-2,76)	1,71 (1,57-1,85)	1,8
Da99A	2,81 (1,89-4,20)	1,61 (1,37-1,85)	2,1
Da50A	1,68 (1,14-2,47)	1,67 (1,41-1,94)	1,3
Da58A	1,33 (0,98-1,79)	1,56 (1,37-1,74)	1,0

\* interval poverenja 95% ( $P=0,05$ ); \*\* koeficijent regresije; \*\*\* faktor rezistentnosti

#### 4.5.3. Kaptan

Kaptan je ujednačeno uticao na porast micelije izolata *D. applanata*. Za ispitivanje osetljivosti izolata na ovaj fungicid korišćena je skala od 5 do 100 mg/L. Najniže koncentracije kaptana (5 i 10 mg/L) inhibirale su porast micelije do 35,22% u odnosu na kontrolu, dok je porast većine izolata bio manji za polovinu od porasta u kontroli pri koncentraciji od 25 mg/L. Najviša koncentracija kaptana (100 mg/L), ispoljila je najslabije inhibitorno dejstvo na izolat Da25B (84,63%), a najjače na izolat Da44A (94,17%) (Slika 14).

Najveću inhibiciju porasta micelije, ovaj fungicid je ispoljio za izolat Da50A (EC<sub>50</sub> 15,75 mg/L), dok su najviše EC<sub>50</sub> vrednosti zabeležene za izolate Da4E (24,29 mg/L) i Da59A (24,69 mg/L). Vrednosti faktora rezistentnosti bile su niže od 1,6 kod svih izolata. Vrednosti koeficijenta b su bile u intervalu od 1,74 do 2,13 (Tabela 9).



Slika 14. *Didymella applanata*. Porast micelije izolata na podlozi sa kaptanom

Tabela 9. *D. applanata*. Osetljivost izolata na kaptan.

Izolot	Kaptan		
	EC <sub>50</sub> (mg/L)*	b**	RF***
Da4E	24,29 (21,26-27,89)	1,96 (1,81-2,11)	1,5
Da17B	17,26 (15,11-19,65)	2,04 (1,88-2,19)	1,1
Da25B	22,02 (19,00-25,57)	1,74 (1,60-1,88)	1,4
Da44A	19,17 (16,56-22,14)	1,79 (1,64-1,93)	1,2
Da64A	16,54 (14,29-19,00)	1,86 (1,71-2,00)	1,1
Da59A	24,69 (21,49-28,53)	1,86 (1,72-2,00)	1,6
Da93A	17,68 (15,23-20,42)	1,78 (1,63-1,93)	1,1
Da99A	23,08 (20,14-26,54)	1,91 (1,76-2,06)	1,5
Da50A	15,75 (13,74-17,94)	2,03 (1,87-2,10)	1,0
Da58A	20,58 (18,15-23,35)	2,13 (1,97-2,29)	1,3

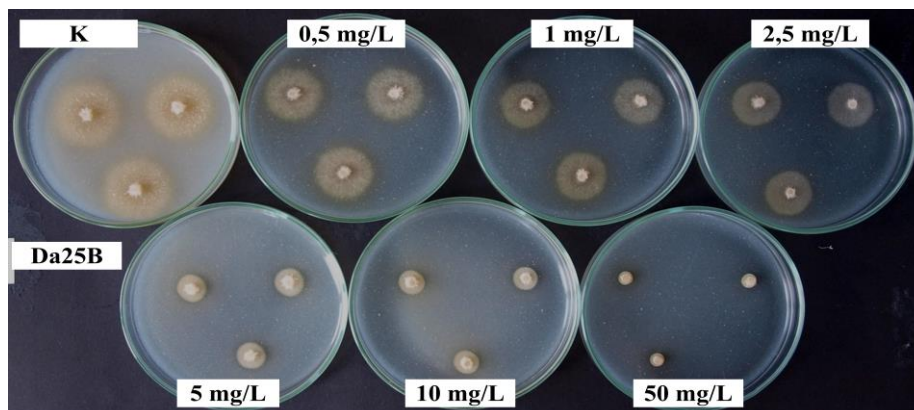
\* interval poverenja 95% ( $P=0,05$ ); \*\* koeficijent regresije; \*\*\* faktor rezistentnosti

#### 4.5.4. Hlorotalonil

Hlorotalonil je ispoljio ujednačen uticaj na porast micelije izolata. Pri koncentracijama fungicida u intervalu od 0,5 do 50 mg/L, utvrđena je inhibicija porasta micelije izolata *D. applanata* u rasponu 9,44-86,79% u odnosu na kontrolu. Najniže koncentracije hlorotalonila (0,5 i 1 mg/L) inhibirale su porast micelije između 9,44% (Da99A) i 28,58% (Da50A). Pri koncentraciji od 5 mg/L porast micelije izolata bio je inhibiran preko 47,25%, a pri najvišoj koncentraciji (50 mg/L) preko 82,61% u odnosu na kontrolu (Slika 15).

Vrednosti parametara osetljivosti izolata *D. applanata* na hlorotalonil prikazane su u tabeli 10. Utvrđene EC<sub>50</sub> vrednosti bile su u rasponu od 3,18 mg/L (Da50A) do

6,65 mg/L (Da99A). Vrednosti faktora rezistentnosti za sve izolate bile su niže od 2,1, a vrednosti koeficijenta regresije bile su niže od 1,25.



**Slika 15.** *Didymella applanata*. Porast micelije izolata na podlozi sa hlorotalonilom

**Tabela 10.** *D. applanata*. Osetljivost izolata na hlorotalonil.

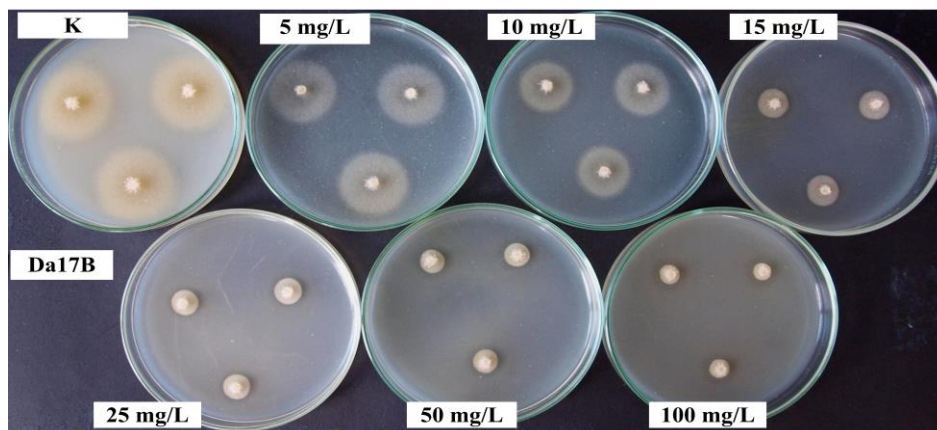
Izolot	Hlorotalonil		
	EC <sub>50</sub> (mg/L)*	b**	RF***
Da4E	3,90 (2,34-6,51)	1,18 (1,02-1,34)	1,2
Da17B	4,89 (3,83-6,26)	1,06 (0,96-1,15)	1,5
Da25B	4,79 (3,78-6,16)	1,06 (0,97-1,15)	1,5
Da44A	4,69 (2,84-7,82)	1,16 (1,00-1,31)	1,5
Da64A	4,09 (3,22-5,22)	1,06 (0,97-1,15)	1,3
Da59A	6,55 (3,35-12,92)	1,11 (0,91-1,30)	2,1
Da93A	4,08 (2,29-7,30)	1,25 (1,05-1,44)	1,3
Da99A	6,65 (5,31-8,54)	1,16 (1,06-1,25)	2,1
Da50A	3,18 (2,49-4,04)	1,06 (0,96-1,15)	1,0
Da58A	5,15 (4,05-6,65)	1,05 (0,96-1,15)	1,6

\* interval poverenja 95% ( $P=0,05$ ); \*\* koeficijent regresije; \*\*\* faktor rezistentnosti

#### 4.5.5. Ditianon

Ditianon je ujednačeno uticao na porast micelije izolata. Za utvrđivanje osetljivosti izolata na fungicid korišćena je skala od 5 do 100 mg/L. Najniže koncentracije ditianona (5 i 10 mg/L) inhibirale su porast micelije izolata u intervalu od 12,11% (Da17B) do 35,79% (Da64A). Pri koncentraciji od 15 mg/L, porast micelije bio je inhibiran preko 49,44% u odnosu na kontrolu. Najviša koncentracija od 100 mg/L, inhibirala je porast micelije izolata u rasponu 80,31-83,19% (Slika 16).

Osetljivost izolata *D. applanata* na ditianon prikazana je u tabeli 11. EC<sub>50</sub> vrednosti su bile u rasponu od 12,12 do 18,73 mg/L. Ditianon je ispoljio najveću inhibiciju porasta micelije za izolate Da58A (EC<sub>50</sub> 12,12 mg/L) i DA64A (EC<sub>50</sub> 12,74 mg/L). Najviša EC<sub>50</sub> vrednost utvrđena je za izolat Da59A (18,73 mg/L). Svi izolati imali su slične vrednosti faktora rezistentnosti (RF<1,5), a vrednosti koeficijenta regresije bile su niže od 2 za sve izolate.



Slika 16. *Didymella applanata*. Porast micelije izolata na podlozi sa ditianonom

Tabela 11. *D. applanata*. Osetljivost izolata na ditianon.

Izolat	Ditianon		
	EC <sub>50</sub> (mg/L)*	b**	RF***
Da4E	14,47 (8,64-24,18)	1,95 (1,52-2,38)	1,2
Da17B	16,94 (11,37-25,36)	1,96 (1,63-2,30)	1,4
Da25B	15,00 (9,28-24,13)	1,56 (1,26-1,87)	1,2
Da44A	16,81(9,23-30,68)	1,97 (1,47-2,48)	1,4
Da64A	12,74 (7,67-20,91)	1,70 (1,35-2,04)	1,1
Da59A	18,73 (16,24-21,83)	1,92 (1,73-2,11)	1,5
Da93A	15,52 (9,59-25,12)	2,00 (1,59-2,42)	1,3
Da99A	16,93 (10,55-27,26)	1,87 (1,49-2,24)	1,4
Da50A	15,76 (9,97-24,91)	1,93 (1,56-2,31)	1,3
Da58A	12,12 (6,95-20,77)	1,54 (1,2-1,87)	1,0

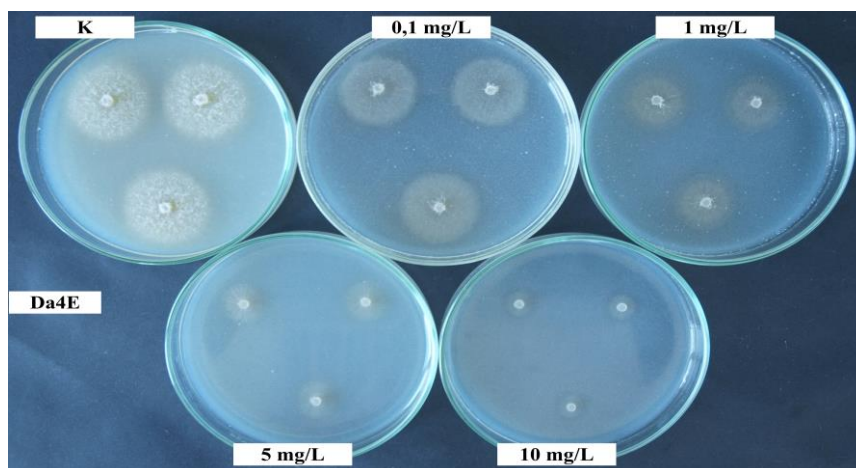
\* interval poverenja 95% ( $P=0,05$ ); \*\* koeficijent regresije; \*\*\* faktor rezistentnosti

#### 4.5.6. Fluopiram

Fluopiram je ujednačeno uticao na porast micelije izolata. Za ispitivanje osetljivosti izolata na ovaj fungicid korišćena je skala od 0,1 do 10 mg/L. Najniža koncentracija fluopirama (0,1 mg/L) inhibirala je porast micelije izolata u intervalu od 11,07% (Da25B) do 25,41% (Da99A). Pri koncentraciji od 5 mg/L, porast micelije bio

je inhibiran preko 43,67% u odnosu na kontrolu. Najviša koncentracija fluopirama (10 mg/L) ispoljila je najj slabiji inhibitorni efekat na izolat Da17B (56,90%), a najjači na izolat Da93A (73,60 %) (Slika 17).

Vrednosti parametara osetljivosti izolata *D. applanata* na fluopiram prikazane su u tabeli 12. Ovaj fungicid je najviše inhibirao porast micelije izolata Da93A ( $EC_{50}$  1,80 mg/L), a najmanje izolata Da17B ( $EC_{50}$  8,20 mg/L).  $EC_{50}$  vrednosti ostalih izolata bile su u rasponu od 1,93 do 6,33 mg/L. Vrednosti RF faktora bile su niže od 2,2 za sedam izolata, dok su za preostala tri izolata vrednosti bile u intervalu od 3,2 do 4,6. Svi izolati imali su vrednosti koeficijenta regresije niže od 0,74.



**Slika 17.** *Didymella applanata*. Porast micelije izolata na podlozi sa fluopiramom

**Tabela 12.** *D. applanata*. Osetljivost izolata na fluopiram.

Izolat	Fluopiram		
	$EC_{50}$ (mg/L)*	b**	RF***
Da4E	2,47 (1,61-3,95)	0,70 (0,61-0,79)	1,4
Da17B	8,20 (4,37-22,45)	0,53 (0,44-0,62)	4,6
Da25B	5,67 (3,50-10,99)	0,66 (0,56-0,75)	3,2
Da44A	4,05 (2,30-8,70)	0,53 (0,44-0,62)	2,2
Da64A	1,93 (1,28-2,95)	0,74 (0,65-0,83)	1,1
Da59A	6,33 (2,99-23,00)	0,41 (0,32-0,50)	3,5
Da93A	1,80 (1,18-2,78)	0,72 (0,63-0,81)	1,0
Da99A	2,23 (1,24-4,34)	0,50 (0,42-0,59)	1,2
Da50A	2,40 (1,57-3,81)	0,71 (0,62-0,80)	1,3
Da58A	3,62 (2,08-7,43)	0,54 (0,45-0,62)	2,0

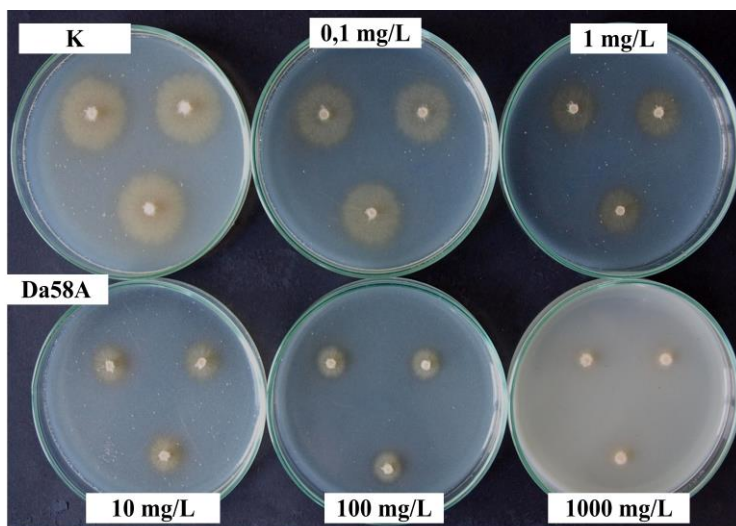
\* interval poverenja 95% ( $P=0,05$ ); \*\* koeficijent regresije; \*\*\* faktor rezistentnosti

#### 4.5.7. Boskalid

Utvrđeno je da koncentracija SHAM-a od 1 mg/L ne utiče na porast micelije izolata, pa je ova koncentracija odabrana za korišćenje u testu toksičnosti boskalida za *D. applanata in vitro*.

Boskalid je neujednačeno uticao na porast izolata. U intervalu koncentracija ovog fungicida od 0,1 do 1000 mg/L, utvrđena je inhibicija porasta micelije izolata u rasponu 10,08-85,58%. Inhibicija porasta pri najnižim koncentracijama (0,1 i 1 mg/L) bila je između 10,08% (Da25B) i 41,78% (Da99A) u odnosu na kontrolu. Primenom koncentracije od 100 mg/L porast svih izolata inhibiran je preko 56,38% (Slika 18).

Vrednosti parametara osetljivosti izolata *D. applanata* na boskalid prikazane su u tabeli 13. Najniže EC<sub>50</sub> vrednosti utvrđene su za izolate Da64A (4,49 mg/L) i Da44A (4,52 mg/L), dok je najviša vrednost utvrđena za izolat Da17B (49,25 mg/L). Za šest izolata vrednosti faktora rezistentnosti bile su niže od 2,3, dok su vrednosti za četiri izolata bile u intervalu od 6,3 do 11. Vrednosti koeficijenta regresije bile su u rasponu od 0,25 do 0,48.



**Slika 18.** *Didymella applanata*. Porast micelije izolata na podlozi sa boskalidom



**Tabela 13.** *D. applanata*. Osetljivost izolata na boskalid.

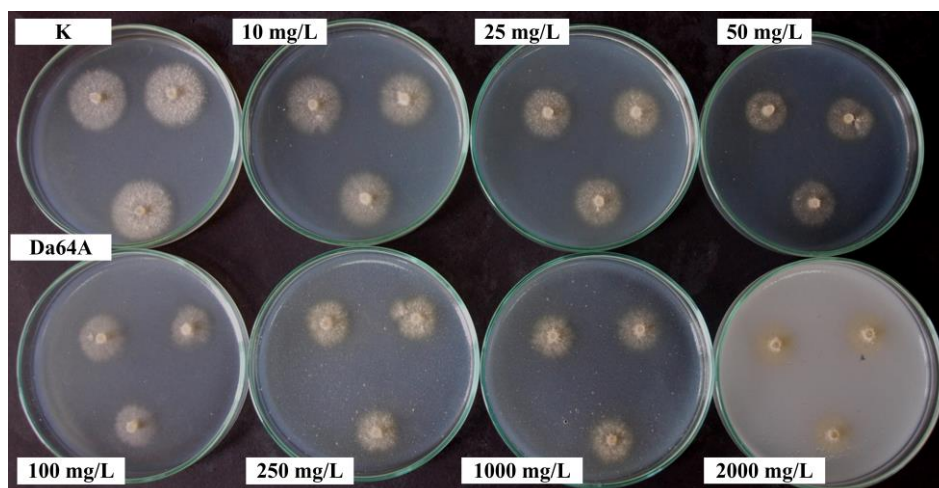
Izolat	Boskalid		
	EC <sub>50</sub> (mg/L)*	b**	RF***
Da4E	5,43 (2,91-9,81)	0,46 (0,42-0,51)	1,2
Da17B	49,25 (22,07-131,58)	0,34 (0,29-0,38)	11
Da25B	34,58 (18,25-71,15)	0,43 (0,38-0,47)	7,7
Da44A	4,52 (1,36-12,70)	0,25 (0,24-0,29)	1,0
Da64A	4,49 (1,64-10,94)	0,29 (0,25-0,33)	1,0
Da59A	31,84 (14,51-79,48)	0,34 (0,29-0,38)	7,1
Da93A	6,49 (3,58-11,54)	0,48 (0,43-0,53)	1,4
Da99A	8,77 (3,59-21,08)	0,31 (0,27-0,35)	2,0
Da50A	10,50 (5,82-18,99)	0,47 (0,43-0,52)	2,3
Da58A	28,13 (14,36-59,63)	0,40 (0,36-0,45)	6,3

\* interval poverenja 95% ( $P=0,05$ ); \*\* koeficijent regresije; \*\*\* faktor rezistentnosti

#### 4.5.8. Azoksistrobin

Radna kocentracija SHAM-a korišćena za mešanje sa azoksistrobinom za sve izolate iznosila je 1 mg/L. Azoksistrobin je vrlo neujednačeno uticao na porast micelije izolata. Pri ispitivanju osetljivosti korišćen je interval koncentracija fungicida od 0,01 do 2000 mg/L. Najniža koncentracija od 0,01 mg/L, inhibirala je porast micelije izolata *D. applanata* u rasponu od 16,57% (Da50A) do 36,61% (Da58A). Koncentracija azoksistrobina od 2000 mg/L, najviše je inhibirala porast micelije izolata Da44A (73,62%) (Slika 19).

Ovaj fungicid je najviše inhibirao porast micelije izolata Da25B (EC<sub>50</sub> 0,01 mg/L), a najmanje izolata Da64A (EC<sub>50</sub> 405,25 mg/L). Najniže vrednosti faktora rezistentnosti utvrđene su za izolate Da25B (RF=1) i Da50A (RF=12), dok su vrednosti RF faktora za sedam izolata bile iznad 5919. Vrednosti koeficijnta regresije bile su u rasponu od 0,13 do 1,46 (Tabela 14).



**Slika 19.** *Didymella applanata*. Porast micelije izolata na podlozi sa azoksistrobinom

**Tabela 14.** *D. applanata*. Osetljivost izolata na azoksistrobin.

Izolat	Azoksistrobin		
	EC <sub>50</sub> (mg/L)*	b**	RF***
Da4E	107, 51 (74,28-208,13)	1,06 (0,87-1,25)	10751
Da17B	133,42 (94,37-241,04)	1,35 (1,13-1,56)	13342
Da25B	0,01 (0,001-0,04)	0,29 (0,25-0,33)	1
Da44A	59,19 (28,02-117,79)	0,39 (0,31-0,46)	5919
Da64A	405,25 (210,02-1571,70)	0,65 (0,52-0,77)	40525
Da59A	165,89 (111,32-342,25)	1,32 (1,10-1,54)	16589
Da93A	380,40 (183,02-2283,47)	1,00 (0,78-1,23)	38040
Da99A	112,27 (83,63-179,52)	1,46 (1,24-1,67)	11227
Da50A	0,12 (0,03-0,29)	0,35 (0,28-0,42)	12
Da58A	ND****	0,13 (0,1-0,2)	-

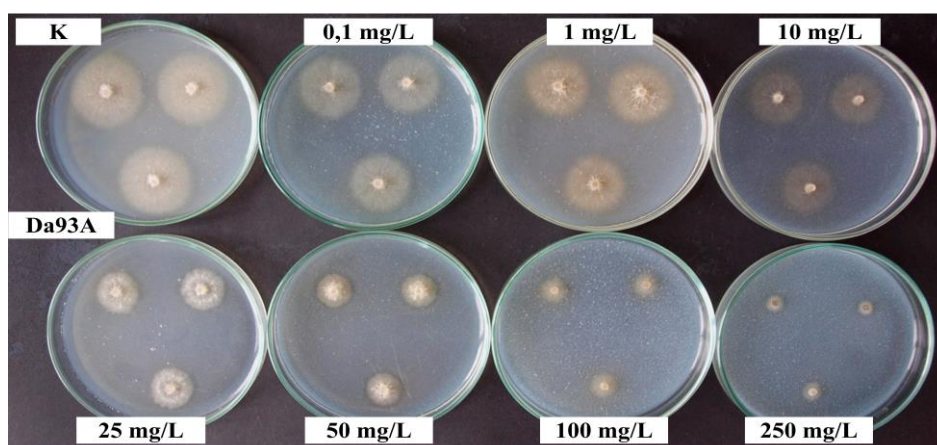
\* interval poverenja 95% ( $P=0,05$ ); \*\* koeficijent regresije; \*\*\* faktor rezistentnosti;

\*\*\*\* nije determinisan

#### 4.5.9. Piraklostrobin

Koncentracija SHAM-a od 1 mg/L korišćena je za mešanje sa piraklostrobinom za sve izolate. Piraklostrobin je vrlo neujednačeno uticao na porast micelije izolata. Pri ispitivanju osetljivosti izolata na fungicid korišćen je interval koncentracija od 0,01 do 250 mg/L. Najniža koncentracija od 0,01 mg/L inhibirala je porast micelije izolata u rasponu od 11,79% (Da50A) do 21,24% (Da25B). Najviša koncentracija piraklostrobina (250 mg/L) ispoljila je najslabije inhibitorno delovanje na miceliju izolata Da99A (81,13%), a najjače na izolat Da64A (90,36%) (Slika 20).

Izolat Da25B je bio najosetljiviji na ovaj fungicid ( $EC_{50}$  0,17 mg/L), a najviša  $EC_{50}$  vrednost utvrđena je za izolat Da17B ( $EC_{50}$  55,33 mg/L) (Tabela 15). Vrednosti faktora rezistentnosti za tri izolata bile su niže od 1,9, dok su za šest izolata vrednosti bile u intervalu od 207,1 do 325,5. Za jedan izolat vrednost ovog faktora bila je 7,6. Vrednosti koeficijenta regresije bile su između 0,56 i 1,31.



**Slika 20.** *Didymella applanata*. Porast micelije izolata na podlozi sa piraklostrobinom

**Tabela 15.** *D. applanata*. Osetljivost izolata na piraklostrobin.

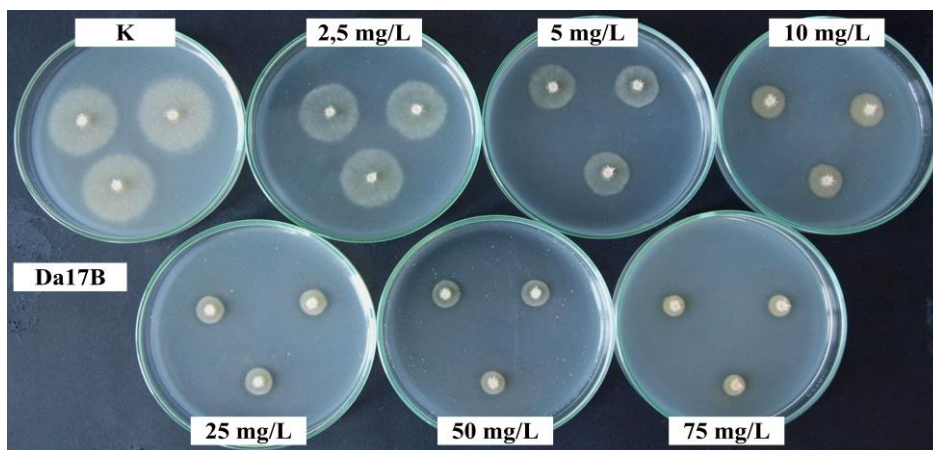
Izolat	Piraklostrobin		
	$EC_{50}$ (mg/L)*	b**	RF***
Da4E	49,44 (39,08-26,50)	1,17 (1,04-1,3)	290,8
Da17B	55,33 (44,54-69,19)	1,26 (1,13-1,39)	325,5
Da25B	0,17 (0,10-0,29)	0,53 (0,47-0,59)	1,0
Da44A	1,30 (0,72-2,12)	0,57 (0,51-0,63)	7,6
Da64A	35,20 (27,86-43,49)	1,29 (1,16-1,42)	207,1
Da59A	49,27 (39,85-60,86)	1,31 (1,17-1,44)	289,8
Da93A	44,88 (35,47-56,35)	1,19 (1,06-1,32)	264,0
Da99A	47,91 (38,60-59,30)	1,29 (1,16-1,42)	281,8
Da50A	0,32 (0,21-0,53)	0,60 (0,54-0,66)	1,9
Da58A	0,24 (0,15-0,39)	0,56 (0,51-0,63)	1,4

\* interval poverenja 95% ( $P=0,05$ ); \*\* koeficijent regresije; \*\*\* faktor rezistentnosti

#### 4.5.10. Fluazinam

Fluazinam je ujednačeno uticao na porast micelije izolata. Korišćen je interval koncentracija od 2,5 do 75 mg/L. Dve najniže koncentracije (2,5 i 5 mg/L) inhibirale su porast micelije u intervalu između 6,73% i 44,93% u odnosu na kontrolu. Najviša koncentracija od 75 mg/L imala je najslabiji inhibitorski efekat na izolat Da50A (58,55%), a najjači na izolat Da64A (90,9%) (Slika 21).

Utvrđene EC<sub>50</sub> vrednosti bile su u rasponu od 5,72 mg/L (Da64A) do 42,56 mg/L (Da50A) (Tabela 16). Za ostale izolate EC<sub>50</sub> vrednosti bile su između 8,63 i 17,01 mg/L. Vrednosti faktora rezistentnosti za devet izolata bile su manje od 3, dok je za izolat Da50A vrednost ovog faktora iznosila 7,4.



**Slika 21.** *Didymella applanata*. Porast micelije izolata na podlozi sa fluazinamom

**Tabela 16.** *D. applanata*. Osetljivost izolata na fluazinam.

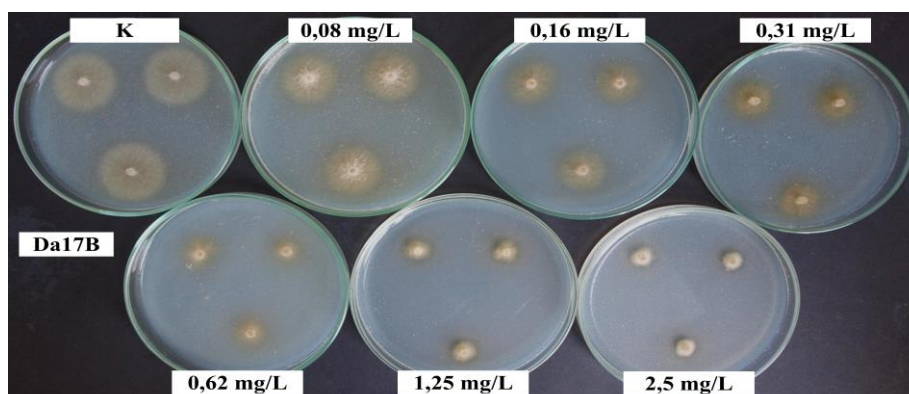
Izolat	Fluazinam		
	EC <sub>50</sub> (mg/L)*	b**	RF***
Da4E	9,53 (7,92-11,4)	1,56 (1,42-1,70)	1,7
Da17B	11,45 (8,93-14,78)	1,08 (0,95-1,21)	2,0
Da25B	13,08 (10,4-16,72)	1,17 (1,04-1,3)	2,3
Da44A	17,01 (13,18-23)	1,05 (0,92-1,18)	3,0
Da64A	5,72 (4,61-6,9)	1,56 (1,41-1,71)	1,0
Da59A	15,51 (13,01-18,75)	1,61 (1,47-1,75)	2,7
Da93A	12,09 (10,14-14,49)	1,59 (1,45-1,73)	2,1
Da99A	8,63 (7,04-10,46)	1,43 (1,29-1,57)	1,5
Da50A	42,56 (30,12-71,37)	1,02 (0,88-1,16)	7,4
Da58A	9,17 (7,28-11,41)	1,24 (1,10-1,37)	1,6

\* interval poverenja 95% ( $P=0,05$ ); \*\* koeficijent regresije; \*\*\* faktor rezistentnosti

#### 4.5.11. Difenokonazol

Difenokonazol je ujednačeno uticao na porast micelije izolata. Pri koncentracijama u intervalu od 0,08 do 2,5 mg/L, utvrđena je inhibicija porasta micelije izolata 16,16-98,73% u odnosu na kontrolu. Dve najniže koncentracije difenokonazola inhibirale su porast micelije izolata u intervalu 16,16-38,46%. Koncentracija od 0,62 mg/L, inhibirala je porast micelije izolata preko 53,94% u odnosu na kontrolu. Pri dejstvu najviše koncentracije od 2,5 mg/L, procenat inhibicije porasta micelije izolata bio je u intervalu od 87,18% (Da44A) do 98,73% (Da64A) (Slika 22).

Najniža  $EC_{50}$  vrednost za ovaj fungicid utvrđena je za izolat Da64A (0,23 mg/L), dok je izolat Da25B bio najmanje osetljiv ( $EC_{50}$  0,49 mg/L). Vrednosti faktora rezistentnosti bile su niže od 2,1 za sve izolate, a vrednosti koeficijenta regresije su bile niže od 1,73 (Tabela 17).



Slika 22. *Didymella applanata*. Porast micelije izolata na podlozi sa difenokonazolom

Tabela 17. *D. applanata*. Osetljivost izolata na difenokonazol.

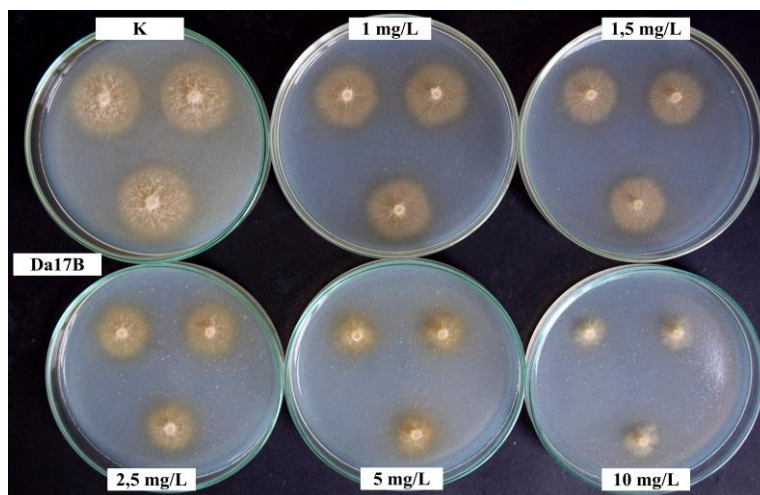
Izolat	Difenokonazol		
	$EC_{50}$ (mg/ L)*	b**	RF***
Da4E	0,27 (0,21-0,34)	1,13 (1,01-1,24)	1,2
Da17B	0,33 (0,26-0,42)	1,11 (1,00-1,22)	1,4
Da25B	0,49 (0,41-0,59)	1,38 (1,27-1,50)	2,1
Da44A	0,30 (0,24-0,38)	1,11 (1,0-1,22)	1,3
Da64A	0,23 (0,19-0,27)	1,73 (1,60-1,87)	1,0
Da59A	0,32 (0,25-0,40)	1,05 (0,94-1,16)	1,4
Da93A	0,35 (0,28-0,43)	1,27 (1,16-1,38)	1,5
Da99A	0,40 (0,33-0,48)	1,37 (1,26-1,49)	1,7
Da50A	0,36 (0,29-0,44)	1,24 (1,12-1,36)	1,6
Da58A	0,32 (0,26-0,40)	1,21 (1,10-1,32)	1,4

\* interval poverenja 95% ( $P=0,05$ ); \*\* koeficijent regresije; \*\*\* faktor rezistentnosti

#### 4.5.12. Tebukonazol

Tebukonazol je ujednačeno uticao na porast micelije izolata. Fungicid je korišćen u intervalu koncentracija od 0,62 do 7,5 mg/L. Pri dejstvu najniže koncentracije (0,625 mg/L), porast micelije izolata inhibiran je u intervalu od 24,72% do 36,69% u odnosu na kontrolu. Koncentracija od 2,5 mg/L inhibirala je porast micelije izolata preko 44,29% u odnosu na kontrolu. Najviša koncentracija od 7,5 mg/L, inhibirala je porast micelije izolata u intervalu od 62,95% (Da17B) do 78,16% (Da4E) (Slika 23).

EC<sub>50</sub> vrednosti bile su u rasponu od 1,42 mg/L do 2,66 mg/L. Svi izolati su imali slične vrednosti RF faktora (<1,9). Vrednosti koeficijenta b bile su u intervalu od 0,77 do 1,67 (Tabela 18).



**Slika 23.** *Didymella applanata*. Porast micelije izolata na podlozi sa tebukonazolom

**Tabela 18.** *D. applanata*. Osetljivost izolata na tebukonazol.

Izolat	Tebukonazol		
	EC <sub>50</sub> (mg/ L)*	b**	RF***
Da4E	1,62 (1,20-2,07)	1,09 (0,94-1,24)	1,1
Da17B	2,66 (1,88-3,89)	0,77 (0,63-0,92)	1,9
Da25B	2,24 (1,78-2,80)	1,2(1,05-1,35)	1,6
Da44A	1,70 (1,21-2,25)	0,94 (0,79-1,9)	1,2
Da64A	1,42 (1,16-1,69)	1,67 (1,51-1,84)	1,0
Da59A	2,61 (2,08-3,32)	1,16 (1,01-1,32)	1,8
Da93A	2,34 (1,77-3,08)	0,99 (0,84-1,14)	1,6
Da99A	2,53(2,02-3,20)	1,18 (1,03-1,33)	1,8
Da50A	2,63 (1,97-3,59)	0,91 (0,76-1,06)	1,9
Da58A	2,10 (1,56-2,77)	0,95 (0,80-1,1)	1,5

\* interval poverenja 95% ( $P=0,05$ ); \*\* koeficijent regresije; \*\*\* faktor rezistentnosti

#### **4.5.13. Uticaj različitih temperatura na toksičnost fungicida za izolate *D. applanata* u *in vitro* uslovima**

Svi fungicidi ispoljili su statistički značajnu razliku ( $P < 0,05$ ) u pogledu toksičnosti na različitim temperaturama za izolat Da50A (Tabela 19). Ustanovljeno je da fungicidi nespecifičnih mehanizama delovanja (kaptan, hlorotalonil i ditianon), kao i fungicid specifičnog mehanizma delovanja difenoknazol, ispoljavaju različitu toksičnost za pomenuti izolat na sve tri temperature (15, 22 i 26°C) ( $P < 0,05$ ). Kod fungicida mankozeb, fluopiram, boskalid i piraklostrobin, ustanovljena je statistički značajna razlika u toksičnosti na temperaturi od 26°C i preostale dve temperature (15 i 22°C). Toksičnost fungicida Cu-hidroksida statistički je bila značajna na temperaturama 22°C i 26°C. Kod predstavnika grupe 2,6-dinitro-anilina, fluazinam, utvrđena je statistički značajna razlika u toksičnosti na 22°C i preostale dve temperature. Temperatura je uticala i na toksičnost fungicida tebukonazola, pri čemu je bilo značajne razlike na najnižoj i najvišoj temperaturi ( $P < 0,05$ ).

Svi fungicidi ispoljili su statistički značajnu razliku ( $P < 0,05$ ) u pogledu toksičnosti za izolat Da99A na različitim temperaturama (Tabela 20; Slike 24-26). Fungicidi kaptan, hlorotalonil, boskalid i difenokonazol ispoljavaju različitu toksičnost na sve tri temperature (15, 22 i 26°C) ( $P < 0,05$ ). Ispoljena je statistički značajna razlika u pogledu toksičnosti mankozeba i fluazinama na temperaturi od 26°C i preostale dve temperature. Fungicid nespecifičnog mehanizma delovanja Cu-hidroksid i QoI fungicid, specifičnog mehanizma delovanja, piraklostrobin nisu ispoljili značajnu razliku u toksičnosti na najvišoj i najnižoj temperaturi za izolat Da99A. Fungicidi ditianon i tebukonazol ispoljili su najveću toksičnost na najnižoj ispitivanoj temperaturi (15°C), a toksičnost ovih fungicida na višim temperaturama se nije statistički značajno razlikovala. Toksičnost fungicida specifičnog mehanizma delovanja fluopirama statistički je bila značajna na temperaturama 22 i 26°C.

**Tabela 19.** *Didymella applanata*. Toksičnost fungicida na različitim temperaturama za izolat Da50A

Fungicid	Temperatura (°C)	Izolat Da50A	
		EC <sub>50</sub> (mg/L)*	b**
Cu - hidroksid	15	52,40 (46,52-58,54) ab	2,72±0,31
	22	41,46 (35,81-46,71)a	2,65±0,31
	26	59,70 (53,54-66,72)b	2,83±0,32
Mankozeb	15	1,60 (1,31-1,93)a	1,33±0,14
	22	1,49 (1,20-1,79)a	1,53±0,15
	26	8,93 (7,27-11,41)b	1,34±0,11
Kaptan	15	6,73 (4,20-9,00)a	1,65±0,23
	22	15,53 (13,61-17,72)b	2,13±0,20
	26	43,56 (37,46-51,86)c	1,89±0,15
Hlorotalonil	15	0,85 (0,36-1,32)a	0,97±0,19
	22	3,18 (2,49-4,04)b	1,05±0,09
	26	19,01 (12,80-33,03)c	0,76±0,09
Ditianon	15	3,82 (1,15-6,29)a	0,75±0,13
	22	17,55 (14,95-20,70)b	1,96±0,15
	26	38,18 (33,13-44,78)c	1,95±0,19
Fluopiram	15	2,02 (1,35-3,09)a	0,75 ±0,09
	22	2,40 (1,58-3,81)a	0,71 ±0,09
	26	8,36 (7,32-9,48)b	2,44±0,29
Boskalid	15	6,88 (2,14-20,33)a	0,25 ±0,04
	22	10,50 (5,82-18,99)a	0,47 ±0,05
	26	108,43(71,28-167,81)b	0,66 ±0,05
Piraklostrobin	15	0,89 (0,48-1,95)a	0,45 ±0,06
	22	0,32 (0,21-0,53)a	0,60 ±0,06
	26	4,06 (2,32-7,58)b	0,54±0,04
Fluazinam	15	9,45 (7,46-11,83)a	1,20 ±0,13
	22	42,56 (30,12-71,37)b	1,02±0,14
	26	16,87 (11,50-23,04)a	0,80 ±0,10
Difenokonazol	15	0,21(0,16-0,26)a	1,20±0,12
	22	0,36 (0,29-0,44)b	1,24±0,11
	26	0,82 (0,68-1,01)c	1,38±0,12
Tebukonazol	15	2,49 (2,20-2,81)a	2,47±0,19
	22	2,63 (1,97-3,59)ab	0,91±0,15
	26	3,65 (2,99-4,64)b	1,35±0,16

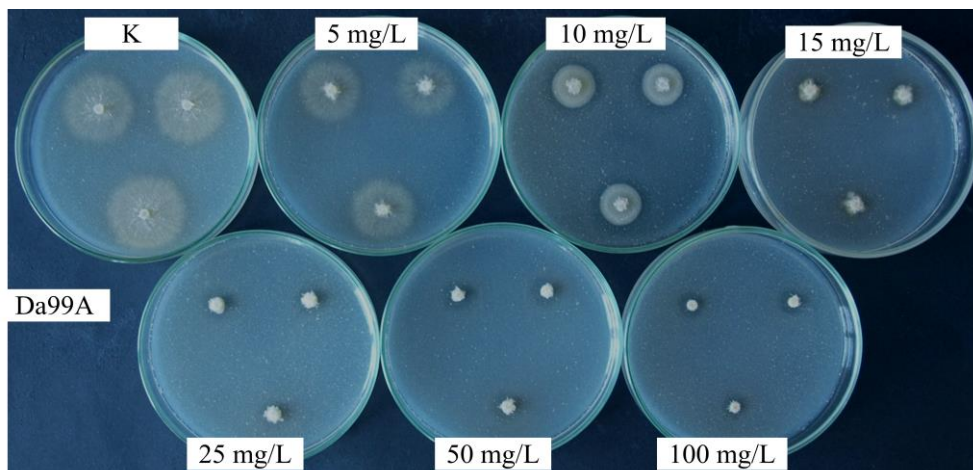
\* interval poverenja 95% ( $P=0,05$ ); \*\* koeficijent regresije



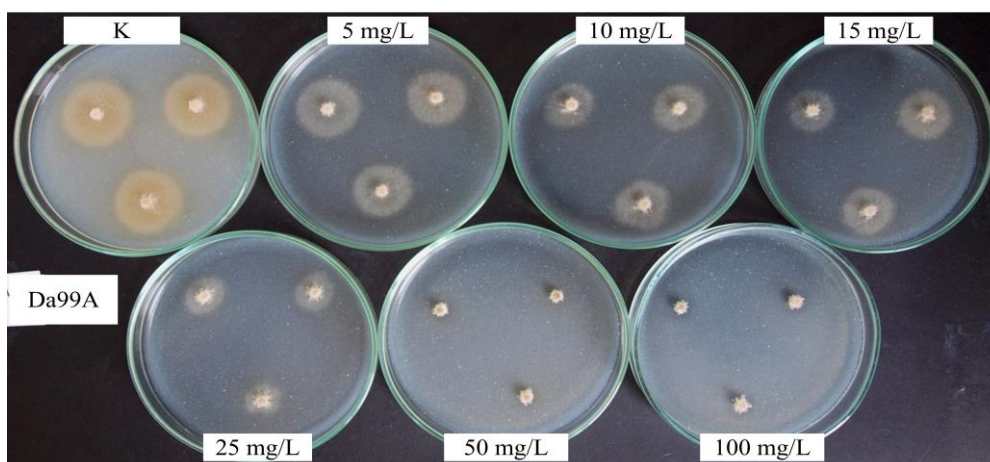
**Tabela 20.** *Didymella applanata*. Toksičnost fungicida na različitim temperaturama za izolat Da99A

Fungicid	Temperatura (°C)	Izolat Da99A	
		EC <sub>50</sub> (mg/L)*	b**
Cu - hidroksid	15	64,24 (58,09-70,38)b	4,35±0,45
	22	51,20 (46,09-56,43)a	3,19 ±0,33
	26	66,58 (60,86-71,98)b	4,44±0,64
Mankozeb	15	2,15 (1,83-2,54)a	1,54±0,14
	22	2,60 (2,15-3,14)a	1,47±0,15
	26	4,14 (3,48-5,08)b	1,59 ±0,14
Kaptan	15	10,59 (9,18-12,03)a	2,25 ±0,18
	22	23,08 (20,14-26,54)b	1,91 ±0,15
	26	67,31 (48,74-114,35)c	1,47±0,21
Hlorotalonil	15	2,13 (1,65-2,69)a	1,08 ±0,10
	22	6,65 (5,31-8,54)b	1,16 ±0,10
	26	14,53 (9,60-25,73)c	0,67±0,08
Ditianon	15	8,37 (5,48-11,23)a	0,94 ±0,13
	22	23,93 (19,49-29,45)b	1,57±0,14
	26	17,34 (13,26-21,41)b	1,30 ±0,17
Fluopiram	15	2,41 (1,26-5,23)ab	0,45±0,09
	22	2,24 (1,24-4,34)a	0,50 ±0,09
	26	7,52 (4,75-14,21)b	0,62±0,09
Boskalid	15	0,83 (0,19-2,33)a	0,27 ±0,04
	22	8,78 (3,59-21,10)b	0,31±0,04
	26	219,76 (111,24-494,02)c	0,38±0,04
Piraklostrobin	15	76,95 (58,55-107,42)b	1,14±0,14
	22	44,50 (34,80-57,47)a	1,04±0,09
	26	89,55 (76,88-103,81)b	1,92±0,16
Fluazinam	15	7,10 (5,30-9,10)a	1,08±0,13
	22	8,63 (7,04-10,46)a	1,43±0,14
	26	36,70 (28,42-48,60)b	1,00±0,08
Difenokonazol	15	0,19 (0,16-0,25)a	1,18±0,12
	22	0,34 (0,28-0,48)b	1,23±0,10
	26	0,86 (0,68-1,01)c	1,35±0,12
Tebukonazol	15	1,62 (1,38-1,89)a	2,22±0,18
	22	2,53 (2,02-3,20)b	1,80±0,15
	26	3,23 (2,70-3,92)b	1,54±0,16

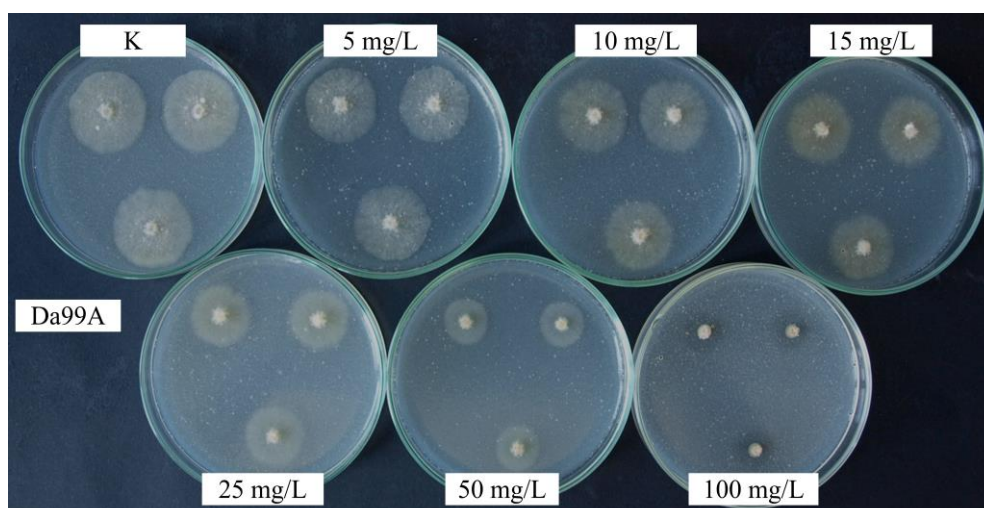
\* interval poverenja 95% ( $P=0,05$ ); \*\* koeficijent regresije



**Slika 24.** Uticaj temperature od 15°C na toksičnost kaptana nakon 10 dana inkubacije



**Slika 25.** Uticaj temperature od 22°C na toksičnost kaptana nakon šest dana inkubacije



**Slika 26.** Uticaj temperature od 26°C na toksičnost kaptana nakon devet dana inkubacije

#### 4.6. Efikasnost fungicida u zaštiti maline od *D. applanata*

U eksperimentima izvedenim u toku 2014. godine, intenzitet oboljenja *D. applanata* u kontroli iznosio je 53,7% (Slika 27). Najveću efikasnost ispoljili su tebukonazol, fluopiram i boskalid (94,7-96,3%), dok je najslabija efikasnost ostvarena primenom azoksistrobina (13,7%). Efikasnost ostalih fungicida, bila je u rasponu od 20,2% do 78% (Tabela 21).



**Slika 27.** *Didymella applanata*. Simptomi oboljenja na izdancima i listovima maline u kontrolnim parcelama

U toku eksperimentalne 2015. godine, visoke temperature i izrazita suša rezultirali su veoma slabim intenzitetom oboljenja u kontrolnim parcelama (<5%). Rezultati efikasnosti u ovakvim uslovima ne mogu se smatrati pouzdanim, pa je eksperiment ponovljen u toku vegetacione sezone 2016. godine.

Rezultati ispitivanja efikasnosti fungicida tokom 2016. godine prikazani su u tabeli 22. Intenzitet oboljenja u kontrolnim parcelama iznosio je 76,3%. Najveća efikasnost postignuta je primenom fluopirama (99,6%), tebukonazola (99,3%) i boskalida (95,9%). Najslabija efikasnost ostvarena je primenom azoksistrobina (16,2%), dok je efikasnost ostalih fungicida bila u intervalu 27,1-81,7%.

Prikaz meteoroloških podataka (minimalne, maksimalne, srednje dnevne temperature i padavine), za lokalitet Arilje, za vreme trajanja ogleda prikazan je poglavljju Prilozi.

**Tabela 21.** Intenzitet oboljenja i efikasnost fungicida za suzbijanje *D. applanata*. Lok. Trešnjevica (Arilje), 2014. godina.

Aktivna materija	Preparat	Koncentracija primene preparata (%)	Intenzitet oboljenja <sup>1</sup> (%)	Efikasnost (%)
Cu- hidroksid	Kocide-2000	<b>0,2</b>	<b>11,8 b</b>	<b>78,0</b>
mankozeb	Mankogal-80	<b>0,25</b>	<b>17,7 b</b>	<b>67,1</b>
piraklostrobin	Retengo	<b>0,1</b>	<b>36,0 c</b>	<b>32,9</b>
ditianon	Delan 700-WG	<b>0,1</b>	<b>11,3 b</b>	<b>78,9</b>
fluazinam	Zignal 500 SC	<b>0,1</b>	<b>42,9 c</b>	<b>20,2</b>
boskalid	Cantus	<b>0,12</b>	<b>2,8 a</b>	<b>94,7</b>
azoksistrobin	Quadris	<b>0,075</b>	<b>46,3 d</b>	<b>13,7</b>
fluopiram	Luna	<b>0,075</b>	<b>2,3 a</b>	<b>95,7</b>
hlorotalonil	Dakoflo 720-SC	<b>0,2</b>	<b>15,8 b</b>	<b>70,5</b>
tebukonazol	Akord WG	<b>0,075</b>	<b>2,0 a</b>	<b>96,3</b>
-	Kontrola	-	<b>53,7 d</b>	-

<sup>1</sup>Ista slova u koloni označavaju da razlika nije statistički značajna ( $P < 0,05$ ) (Duncan-ov test grupnog poređenja)

**Tabela 22.** Intenzitet oboljenja i efikasnost fungicida za suzbijanje *D. applanata*. Lok. Trešnjevica (Arilje), 2016. godina.

Aktivna materija	Preparat	Koncentracija primene preparata (%)	Intenzitet oboljenja <sup>1</sup> (%)	Efikasnost (%)
Cu- hidroksid	Kocide-2000	<b>0,2</b>	<b>14,0 b</b>	<b>81,7</b>
mankozeb	Mankogal-80	<b>0,25</b>	<b>27,2 b</b>	<b>64,4</b>
piraklostrobin	Retengo	<b>0,1</b>	<b>47,5 c</b>	<b>37,8</b>
ditianon	Delan 700-WG	<b>0,1</b>	<b>14,7 b</b>	<b>80,8</b>
fluazinam	Zignal 500 SC	<b>0,1</b>	<b>55,7 c</b>	<b>27,1</b>
boskalid	Cantus	<b>0,12</b>	<b>3,2 a</b>	<b>95,9</b>
azoksistrobin	Quadris	<b>0,075</b>	<b>64,0 d</b>	<b>16,2</b>
fluopiram	Luna	<b>0,075</b>	<b>0,3 a</b>	<b>99,6</b>
hlorotalonil	Dakoflo 720-SC	<b>0,2</b>	<b>21,6 c</b>	<b>71,7</b>
tebukonazol	Akord WG	<b>0,075</b>	<b>0,5 a</b>	<b>99,3</b>
-	Kontrola	-	<b>76,3 d</b>	-

<sup>1</sup>Ista slova u koloni označavaju da razlika nije statistički značajna ( $P < 0,05$ ) (Duncan-ov test grupnog poređenja)

#### 4.6.1. Kritičan period za primenu fungicida

Ostvarena efikasnost tebukonazola u prvoj testiranoj varijanti kada je pomenuti fungicid primenjen tokom svih pet tretiranja iznosila je 99,6%, dok je efikasnost u četvrtoj varijanti, u kojoj ovaj fungicid nije primenjen samo tokom trećeg tretiranja, iznosila 73,4%. Raspon ostvarene efikasnosti u ostalim testiranim varijantama bio je između 82,5% i 96,1% (Tabela 23).

**Tabela 23.** Intenzitet oboljenja i efikasnost tebukonazola za suzbijanje *D. applanata* tokom 2016. godine. Lok. Trešnjevica (Arilje).

Fungicide	Koncentracija primene (%)	Intenzitet oboljenja <sup>1</sup> (%)	Efikasnost (%)
Akord WG	<b>0,075</b>	<b>0,3 a</b>	<b>99,6</b>
Akord WG -1.	<b>0,075</b>	<b>11,3 b</b>	<b>85,2</b>
Akord WG -2.	<b>0,075</b>	<b>13,3 c</b>	<b>82,5</b>
Akord WG -3.	<b>0,075</b>	<b>20,3 d</b>	<b>73,4</b>
Akord WG -4.	<b>0,075</b>	<b>3,3 e</b>	<b>95,6</b>
Akord WG -5.	<b>0,075</b>	<b>3,0 f</b>	<b>96,1</b>
Kontrola	-	<b>76,3 g</b>	-

<sup>1</sup>Ista slova u koloni označavaju da razlika nije statistički značajna (P<0,05) (Duncan-ov test grupnog poređenja)

## 5. DISKUSIJA

Kestenjasta pegavost izdanaka maline, koju prozrokuje gljiva *D. applanata*, javlja se u različitom intenzitetu iz godine u godinu u zavisnosti, pre svega, od vremenskih uslova. Tokom pregleda zasada maline u vodećim rejonima gajenja ove jagodaste voćne vrste u Srbiji tokom 2013., 2014. i 2016. godine, ustanovljena je pojava intenzivnih simptoma ovog oboljenja. Međutim, 2015. godine, usled visokih temperatura i izrazite suše, nije došlo do značajnijeg ostvarenja infekcije i razvoja oboljenja. U toku prve eksperimentalne godine na lokalitetu Trešnjevica (2014), intenzitet oboljenja u kontrolnim parcelama iznosio je 53,7%, dok je 2016. godine, intenzitet oboljenja bio nešto veći (76,3%).

Prvi simptomi, u vidu kestenjastih pega na jednogodišnjim izdancima u osnovi i oko pupoljaka, uočeni su u kasno proleće ili rano leto u svim pregledanim zasadima tokom 2013., 2014. i 2016. godine. U toku vegetacije pege su se povećavale, postajale mrke i često pokrivale celu površinu izdanaka, kao što opisuju brojni autori (Anderson, 1920; Converse, 1966; Williamson, 1991; Fox, 2006). Na uzdužnom preseku zaraženih izdanaka nije utvrđena nekroza sudovnog tkiva, što je u skladu sa navodima Koch (1931) i Ivanović i Ivanović (2001). Na listovima su uočene tipične nekrotične pege klinastog oblika između nerava sa mrkožutim oreolom, koje su se širile prema lisnoj dršci. Kroz lisnu dršku patogen je dospevao do izdanaka. Tokom septembra na površini obolelih delova mogli su se videti piknidi i peritecije. U toku zime, izdanci su dobili sivo srebrnu boju usled nekroze kore, njenog pucanja i odvajanja od drveta.

Iz obolelih izdanaka izolovano je 178 izolata patogena, koji su na ovsenoj podlozi formirali žuto belu do braon boje koloniju, ovalnog oblika i ravnih ivica, bez lučenja pigmenta. Većina izolata na KDA podlozi obrazovala je pepeljasto sivu koloniju, nepravilnog oblika i režnjovitih ivica, dok je veoma mali broj izolata na ovoj podlozi formirao koloniju ovalnog oblika i ravnih ivica. Nakon razvoja od 7-10 dana na KDA podlozi na sobnoj temperaturi, izolati su počeli da luče žuto narandžasti pigment. U kulturi staroj 45 dana, na OA i KDA podlozi, mogli su se uočiti kruškoliki tamnobraon piknidi prečnika 200-250  $\mu\text{m}$ . Unutar piknida uočene su hijalinske, jednoćelijske, cilindrične konidije veličine 4-7,5 $\times$ 2-4  $\mu\text{m}$ . Na srebrnastim delovima kore prezimelih izdanaka uočene su crne peritecije, veličine 200-270  $\mu\text{m}$  u prečniku. Unutar

peritecija nalazili su se cilindrični askusi veličine 60-80×10-20 μm sa eliptičnim, dvoćelijskim, hijalinskim askosporama (12-20×5-7 μm). Imajući u vidu da opis morfoloških, kako makroskopskih, tako i mikroskopskih odlika izolata, u svemu odgovara navodima drugih autora Punithalingam (1978), Blake (1980) i Williamson (1991), utvrđeno je da izolati pripadaju vrsti *Didymella applanata* (familija Didymellaceae, red Pleosporales, potklasa Pleosporomycetidae, klasa Dothideomycetes, razdeo Ascomycota i carstvo Fungi). Identitet izolata utvrđen na osnovu morfoloških odlika, potvrđen je analizom sekvence amplikona ITS genomnog regiona.

Ustanovljeno je da hranljiva podloga, temperatura i svetlosni uslovi značajno utiču na brzinu porasta micelije izolata. Osim na brzinu rasta, vrsta hranljive podloge je uticala i na oblik kolonije i izgled margine. Najveći porast za sve izolate utvrđen je na ovsenoj podlozi (30,4-42,8 mm/7 dana). Na ovoj podlozi izolati su formirali kolonije pravilnog oblika sa ravnim ivicama. Većina izolata *D. applanata* na KDA podlozi formirala je spororastuću koloniju nepravilnog oblika i režnjevitih ivica. Najveći prosečan porast kod većine izolata bio je na temperaturi od 22°C (32,5-40,6 mm/7 dana) i u svetlosnom uslovu 12 h svetlost/12 h mrak (30,3-38,4 mm/7 dana). Na osnovu ekoloških i odgajivačkih odlika, za proveru osetljivosti 10 odabranih izolata *D. applanata* na fungicide različitih mehanizama delovanja, odabrana je OA podloga, temperatura od 22°C i stalni mrak. Iako su svi izolati imali veći porast u uslovima 12 h svetlost/12 h mrak, za pomenuta ispitivanja odabran je stalni mrak kao pogodniji za eksperiment.

Većina izolata *D. applanata* sakupljenih sa šest lokaliteta u Srbiji bila je osetljiva na fungicide. Na osnovu ispoljene osetljivosti i izračunatog faktora rezistentnosti (RF), svi izolati su bili podjednako osetljivi na Cu-hidroksid, mankozeb, hlorotalonil, kaptan, ditianon, tebukonazol i difenokonazol, dok je osetljivost izolata na boskalid, fluopiram, fluazinam, azoksistrobin i piraklostrobin bila heterogena.

Prema kriterijumu koji je predložio Gouot (1994), za utvrđivanje nivoa rezistentnosti izolata *B. cinerea* na dikarboksamide, svi izolati *D. applanata* bili su osetljivi na fungicide nespecifičnih mehanizama delovanja Cu-hidroksid, mankozeb, hlorotalonil, kaptan i ditianon. Izolati *D. applanata* imali su faktor rezistentnosti za pomenute fungicide manji od 2,2. Ovaj nalaz je u skladu sa tvrdnjama da postoji veoma mali rizik za razvoj rezistentnosti na ova jedinjenja, koja se odlikuju nespecifičnim

mehanizmima delovanja (FRAC, 2018). Takođe, efikasnost Cu-hidroksida, mankozeba, ditianona i hlorotalonila, tokom dvogodišnjeg perioda istraživanja, bila je u intervalu 64,4-81,7%, što se s obzirom na visok nivo oboljenja u kontrolnim parcelama (53,7-76,3%) i preventivno delovanje pomenutih fungicida, može smatrati dobrom. Na osnovu *in vitro* i *in vivo* analiza, možemo reći da je primena fungicida širokog spektra delovanja (Cu-hidroksid, mankozeb, ditianon, kaptan i hlorotalonil) za suzbijanje prouzrokovala kestenjaste pegavosti poželjna, ne samo zbog njihove ostvarene efikasnosti, već i zbog smanjenja rizika razvoja rezistentnosti na neke efektivne fungicide specifičnih mehanizama delovanja, kao što su SDHI fungicidi.

MacBean (2012) navodi da je ditianon jedini preporučeni fungicid za suzbijanje *D. applanata* u zasadima maline. Na osnovu rezultata *in vitro* ispitivanja i kriterijuma koji je predložio Gouot (1994), izolati ovog patogena bili su osetljivi na ditianon, pri čemu su faktori rezistentnosti bili manji od 1,5. Svi izolati *D. applanata* bili su osetljivi na ovaj fungicid sa EC<sub>50</sub> vrednostima u intervalu od 12,12 do 18,73 mg/L. Do sličnih rezultata došli su i Everett et al. (2007), koji su utvrdili EC<sub>50</sub> vrednost od 17,2 mg/L za izolat *Phomopsis* sp. Ditianon je ispoljio visoku efikasnost tokom obe eksperimentalne godine, 78,9% (2014. godine) i 80,8% (2016. godine). Imajući u vidu rezultate naših *in vitro* i *in vivo* ogleda, kao i rezultate drugih autora (Everett et al., 2007), možemo doći do sličnih stavova kao i MacBean (2012) za upotrebu ovog fungicida za suzbijanje prouzrokovala kestenjaste pegavosti izdanaka maline.

Kod fungicida sistemskih mehanizama delovanja, najuži raspon srednjih efektivnih koncentracija (EC<sub>50</sub>) utvrđen je za dva DMI fungicida, difenokonazol i tebukonazol. Difenokonazol je više inhibirao porast micelije izolata, pri čemu su EC<sub>50</sub> vrednosti bile u intervalu 0,23-0,49 mg/L, dok su EC<sub>50</sub> vrednosti za tebukonazol bile u rasponu 1,42-2,66 mg/L. Vrednosti faktora rezistentnosti za difenokonazol bile su manje od 2,1, a za tebukonazol manje od 1,9. Keinath i Hansen (2013) su takođe utvrdili homogenu osetljivost 147 izolata srodne vrste *Didymella bryoniae*, poreklom iz Južne Karoline, na DMI fungicide, pri čemu su EC<sub>50</sub> vrednosti za difenokonazol bile u intervalu 0,012-0,17 mg/L, a za tebukonazol 0,21-1,78 mg/L. Thomas et al. (2012) su ustanovili EC<sub>50</sub> vrednosti za tebukonazol u intervalu 0,062-0,385 mg/L za izolate *D. bryoniae* poreklom iz Džordžije. Poznavanje osetljivosti patogena na fungicide je od izuzetnog značaja, jer pruža neophodne informacije o očekivanoj efikasnosti fungicida.



Našim istraživanjima je utvrđeno da je upravo predstavnik DMI grupe tebukonazol, na koji su izolati *D. applanata* ispoljili neznatne razlike u osetljivosti ( $EC_{50}$  1,42-2,66 mg/L), ispoljio najveću efikasnost tokom obe eksperimentalne godine, 96,3-99,3%.

Prema FRAC (2018), DMI jedinjenja svrstavaju se u grupu fungicida umerenog do visokog rizika za razvoj rezistentnosti. Rezistentnost na ove fungicide utvrđena je kod velikog broja patogena, kao što su *Sclerotinia homoeocarpa* (Golembiewski et al., 1995), *Uncinula necator* (Gubler i Ypema, 1996), *Venturia inaequalis* (Koller et al., 1997), *Monilinia fructicola* (Zehr et al., 1999), *Cercospora beticola* (Karaoglanidis et al., 2000), *Podosphaera xanthii* (McGrath i Shishkoff, 2001), itd. Stević et al. (2010) utvrdili su pojavu rezistentnosti na difenokonazol kod izolata *V. inaequalis* poreklom iz Srbije. Devet izolata *V. inaequalis* bilo je umereno rezistentno na ovaj fungicid (RF = 5,1–16,1), dok je jedan izolat bio rezistentan sa RF faktorom od 22,6 (Stević et al., 2010).  $EC_{50}$  vrednosti ovog fungicida za izolate *V. inaequalis* bile su u rasponu 0,016-0,362 mg/L (Stević et al., 2010). Za inhibiciju porasta micelije izolata *Fusarium graminearum*, Rekanović et al. (2010) utvrdili su  $EC_{50}$  vrednosti za difenokonazol u intervalu od 1,69 do 19,16 mg/L. Ovi autori su ustanovili prisustvo rezistentnih izolata *F. graminearum*, pri čemu su RF vrednosti bile između 5,08 i 11,34 (Rekanović et al., 2010). Iako u našim istraživanjima nisu pronađeni rezistentni izolati *D. applanata* na jedinjenja iz DMI grupe, povećana učestalost rezistentnosti kod drugih patogena na DMI fungicide i zbog velikih posledica koje izaziva pojava rezistentnosti, ukazuje na neophodnost preduzimanja različitih mera radi sprečavanja ove pojave (antirezistentna strategija), kao i utvrđivanja programa za ranu detekciju rezistentnosti u populaciji gljive *D. applanata*.

Utvrdili smo da je kritičan period za primenu DMI fungicida tebukonzola, kada su izbojci maline oko 25-40 cm. Kada tebukonazol nije primenjen u ovom periodu, njegova efikasnost iznosila je samo 73,4%. Najveća postignuta efikasnost ovog fungicida (99,6%) ustanovljena je u prvoj testiranoj varijanti, kada je pomenuti fungicid primenjen tokom svih pet tretiranja. U drugoj varijanti, primena fungicida izostavljena je samo u prvom tretiranju i ostvarena efikasnost tebukonzola iznosila je 85,2%. U trećoj varijanti, primena je izostavljena samo tokom drugog tretiranja, pri čemu je efikasnost pomenutog fungicida iznosila 82,5%. U četvrtoj varijanti, primena je izostavljena samo tokom trećeg tretiranja i efikasnost DMI fungicida tebukonzola

iznosila je 73,4%. U petoj ispitivanoj varijanti, primena fungicida izostavljena je samo tokom četvrtog tretiranja, pri čemu je ispoljena efikasnost iznosila 95,6%, dok je u šestoj varijanti, kada je primena tebukonazola izostavljena prilikom petog tretiranja, efikasnost iznosila 96,1%. Dakle, izostavljena primena tebukonazola kada su izbojci maline dužine 25-40 cm (treće tretiranje), ostvarena efikasnost ovog fungicida (73,4%) statistički se značajno razlikovala od ostvarene efikasnosti fungicida u ostalim ispitivanim varijantama. Kvalitetna primena fungicida je od izuzetnog značaja u zaštiti biljaka od fitopatogenih gljiva, ali najbolje vreme jeste prilagoditi primenu fungicida fenofazi gajene biljke i biologiji patogena. Utvrđivanje uloge ukupnog broja i rasporeda tretiranja u odnosu na fenofazu razvoja maline u postignutom nivou zaštite, doprineće unapređenju zaštite maline u našoj zemlji.

Najširi raspon srednjih efektivnih koncentracija za izolate utvrđen je za QoI fungicide. QoI fungicidi su jedna od najznačajnijih grupa fungicida, pre svega zbog njihovog delovanja na veliki broj fitopatogenih gljiva, kao i usled malih količina primene (Bartlett et al., 2002). Na osnovu utvrđene osetljivosti izolata na azoksistrobin, izolati se mogu svrstati u tri grupe. Izolat Da25B iz Valjeva svrstan je u prvu grupu sa  $EC_{50}$  0,01 mg/L. U drugu grupu, svrstan je izolat Da50A iz Šapca, sa  $EC_{50}$  vrednošću od 0,12 mg/L, a vrednost RF je bila 12. Sedam izolata iz Arilja, Valjeva, Ivanjice i Požege, svrstani su u treću grupu sa  $EC_{50}$  vrednostima u rasponu od 112,27 do 405,25 mg/L, dok su vrednosti RF bile u intervalu 5919-40525. Prema skali Gout (1994) i na osnovu vrednosti RF, sedam izolata *D. applanata* poreklom sa četiri lokaliteta (Valjevo, Požega, Arilje i Ivanjica) bili su visoko rezistentni na azoksistrobin. Izolat Da50A iz Valjeva bio je umereno rezistentan (RF 12), dok je izolat iz Valjeva (Da25B) bio osetljiv na ovaj fungicid (RF 1).

Veoma širok interval  $EC_{50}$  vrednosti utvrđen je i za drugo jedinjenje iz grupe QoI fungicida, piraklostrobin. Na osnovu kvalitativnog testa osetljivosti na ovaj fungicid, izolate možemo svrstati u tri grupe. U prvu grupu svrstani su izolati Da58A, Da50A i DA25B sa  $EC_{50}$  vrednostima u rasponu od 0,17 do 0,32 mg/L. RF vrednosti za izolate prve grupe bile su niže od 1,9. Izolat Da44A svrstan je u drugu grupu.  $EC_{50}$  za ovaj izolat iznosila je 1,3 mg/L, dok je vrednost RF bila 7,6. Šest izolata sa znatno višim  $EC_{50}$  vrednostima (35,2-55,33 mg/L), svrstani su u treću grupu. RF vrednosti za ove izolate bile su između 207,1 i 325,5. Vrednosti regresionog koeficijenta za izolate prve i

druge grupe bile su slične (0,53-0,60). Međutim, vrednosti ovog parametra za izolate treće grupe bile su u intervalu od 1,17 do 1,31. Na osnovu ustanovljenih RF vrednosti za piraklostrobin i prema skali Gout (1994), šest izolata *D. applanata* poreklom sa tri lokaliteta (Požega, Arilje i Ivanjica), bili su visoko rezistentni sa RF vrednostima većim od 100. Izolat Da44A, poreklom iz Valjeva bio je umereno rezistentan (RF 7,6), dok su tri izolata, poreklom iz Šapca (Da58A, Da50A) i Valjeva (Da25B), bili osetljivi sa RF vrednostima manjim od 1,9.

Vrlo širok raspon srednjih efektivnih koncentracija izolata za QoI fungicide azoksistrobin i piraklostrobin, kao i ostvarena veoma niska efikasnost ovih fungicida (13,7-16,2% za azoksistrobin, odnosno 32,9-37,8% za piraklostrobin) tokom obe godine, ukazuje na razvoj rezistentnosti fitopatogene gljive *D. applanata* na jedinjenja QoI grupe. Za razliku od naših rezultata, Stevanović et al. (2014), utvrdili su visoku efikasnost azoksistrobina za suzbijanje *D. applanata*. Pomenuti autori izveli su ogled tokom 2013. godine na dva lokaliteta, Donja Kamenica (Valjevo) i Divljaka (Arilje), u zasadima maline sorte Willamette. Intenzitet oboljenja u netretiranim kontrolnim varijantama na oba lokaliteta iznosio je 20,8-22,6% na listu i 33,1-34,5% na izdancima. Ostvarena efikasnost azoksistrobina iznosila je 95,5% na listu i 96,5% na izdancima. Postignuta visoka efikasnost pomenutog QoI fungicida može se pripisati niskom intenzitetu zaraze u kontrolnim parcelama na oba lokaliteta. Veoma specifičan mehanizam delovanja fungicida koji pripadaju ovoj grupi smatra se njihovim najvećim nedostatkom, s obzirom da je veliki broj fitopatogenih gljiva već razvio rezistentnost na njih (Bartlett et al., 2002; Fernández-Ortuno et al., 2008). Razvoj rezistentnosti gljive *D. applanata* na QoI fungicide, nastala je, pre svega, kao posledica neracionalne i intezivne primene, ali i mehanizma njihovog delovanja i prirode ovih jedinjenja. Rezistentost patogena na ove fungicide je multigena. Mutacijom većeg broja gena dolazi do postepene i sporije pojave rezistentnosti u toku dužeg vremenskog perioda (Gallion et al., 2004). Molekularne metode otvorile su niz mogućnosti za brzu detekciju genotipova patogena rezistentnih na fungicide, što će biti od velikog značaja sa ciljem dobijanja jasnije slike o rezistentnim izolatima *D. applanata* na fungicide, čime će se znatno poboljšati hemijske metode suzbijanja ovog patogena.

Inhibitori sukcinat dehidrogenaze (SDHI) definišu se kao fungicidi širokog spektra delovanja, koji se mogu koristiti za suzbijanje velikog broja prouzrokovala

oboljenja (Stammler et al., 2007; Yanase et al., 2007). Osetljivost izolata *D. applanata* na dva SDHI fungicida, fluopiram i boskalid, bila je neujednačena. Najniža EC<sub>50</sub> vrednost za fluopiram utvrđena je za izolat Da93A (EC<sub>50</sub> 1,80 mg/L), a najviša za izolat Da17B (EC<sub>50</sub> 8,20 mg/L). Dobijene EC<sub>50</sub> vrednosti za boskalid bile su u intervalu od 4,49 mg/L do 49,25 mg/L. Našim ispitivanjima je utvrđeno da su tri izolata bila umereno rezistentna na fluopiram (RF 3,2-4,6), a četiri umereno rezistentna na boskalid (RF 6,3-11), dok visoko rezistentni izolati na ove fungicide nisu pronađeni. Od četiri umereno rezistentna izolata na boskalid, tri su takođe bila umereno rezistentna i na fluopiram, što je ukazalo na potencijalnu pojavu ukrštene rezistentnosti na fluopiram i boskalid. Brojni autori (Ishii et al., 2011; Avenot et al., 2012; Miles et al., 2014; Veloukas et al., 2013) nisu utvrdili pojavu ukrštene rezistentnosti na ova dva SDHI fungicida kod patogena *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, *Corynespora cassiicola*, *Podosphaera xanthii* i *D. bryoniae*. Imajući u vidu dvogodišnja istraživanja efikasnosti, oba SDHI fungicida ispoljila su veoma visoku efikasnost za suzbijanje prouzrokovala kestenjaste pegavosti izdanaka maline (fluopiram 95,7-99,6%; boskalid 94,7-95,9%), tako da se može konstatovati izostanak pojave ukrštene rezistentnosti između ova dva fungicida kod patogena *D. applanata*.

Različiti nivoi osetljivosti na fluopiram i boskalid, utvrđeni su kod srodne vrste *D. bryoniae* (Thomas et al., 2010; Thomas, 2011; Avenot et al., 2012; Stevenson et al., 2012). EC<sub>50</sub> vrednosti za fluopiram koje su utvrdili Avenot et al. (2012), bile su ujednačene i dosta niže (0,020-0,189 mg/L) od EC<sub>50</sub> vrednosti dobijenih u našim istraživanjima. U pogledu osetljivosti na boskalid, Tomas (2011) i Thomas et al. (2010), pronašli su 82 veoma visoko rezistentna izolata i sedam visoko rezistentnih izolata *D. bryoniae*, upotrebom diskriminatorne koncentracije od 3 mg/L. Takođe, primenom iste diskriminatorne koncentracije, Stevenson et al. (2012) utvrdili su prisustvo 11 rezistentnih izolata *D. bryoniae* na boskalid poreklom sa Floride (EC<sub>50</sub> ≥ 9,68 mg/L). Utvrđeno prisustvo visoko rezistentnih izolata *D. bryoniae* i brojnih drugih patogena na boskalid (Thomas et al., 2010; Thomas, 2011; Ishii et al., 2011; Avenot et al., 2012; Miles et al., 2014; Veloukas et al., 2013), kao i detekcija rezistentnosti na fluopiram kod izolata vrste *Alternaria solani*, poreklom iz Sjedinjenih Država (Ajdoho) (Miles et al., 2014), ukazuje na neophodnost stalnog praćenja rezistentnosti na SDHI fungicide unutar populacija *D. applanata*. Imajući u vidu činjenicu da je fenomen rezistentnosti na

fungicide, široko prihvaćen kao ključni faktor za smanjenje efikasnosti i životnog veka fungicida, antirezistentna strategija se oslanja na blagovremene informacije o poreklu, razvoju i širenju rezistentnih sojeva patogena. Stoga, neophodno je kako redovno praćenje osetljivosti izolata *D. applanata* na fungicide ove grupe, tako i ispitivanje njihove efikasnosti u poljskim ogledima. S obzirom da na SDHI fungicide i QoI fungicide ne postoji unakrsna rezistentnost (Stammler et al., 2007; Avenot et al., 2008), SDHI fungicidi predstavljaju odličan izbor za prevazilaženje problema koji je nastao razvojem rezistentnosti na QoI fungicide, azoksistrobin i piraklostrobin, utvrđenoj u populaciji *D. applanata* u Srbiji.

Raznolikost fungicida u pogledu mehanizama delovanja značajna je da bi se obezbedila kontinuirana i povećana proizvodnja maline, kao i da bi se poboljšala antirezistentna strategija. Kao što je napomenuto, razvoj rezistentnosti na fungicide specifičnih mehanizama delovanja, predstavlja glavnu smetnju u efikasnoj hemijskoj zaštiti. Ovo se, takođe, može odnositi i na protektivni fungicid fluazinam (Guo et al., 1991). Većina ispitivanih izolata *D. applanata* bila je osetljiva na ovaj fungicid ( $EC_{50}$  5,72-15,51 mg/L). Međutim, jedan izolat (Da50A) je bio umereno rezistentan na fluazinam sa vrednošću faktora rezistentnosti 7,4, uprkos činjenici da ovaj izolat potiče sa parcele gde fluazinam nikada nije primenjivan. Različiti nivoi osetljivosti na fluazinam utvrđeni su kod izolata *Phytophthora infestans* poreklom iz Srbije (Rekanović et al., 2011).  $EC_{50}$  vrednosti za ovaj fungicid, koje su utvrdili Rekanović et al. (2011), bile su ujednačene i dosta niže (0,14-0,27 mg/L) od  $EC_{50}$  vrednosti dobijenih u našim istraživanjima. Svi izolati *P. infestans*, bili su osetljivi na fluazinam, a faktori rezistentnosti su bili manji od 1,9. Utvrđeno je da je ovaj fungicid ispoljio veoma nisku efikasnost u suzbijanju gljive *D. applanata* u toku obe godine istraživanja (20,2% i 27,1%). S obzirom na činjenicu da su izolati, poreklom sa parcele gde su ogledi postavljeni, označeni kao osetljivi na ovo jedinjenje, mala je verovatnoća da je niska efikasnost fluazinama posledica razvoja rezistentnosti. Imajući u vidu navedno, možemo zaključiti da ovaj predstavnik 2,6-dinitro-anilina nije pogodan za suzbijanje prouzrokovala kestenjaste pegavosti izdanaka maline *D. applanata*.

Našim istraživanjima je utvrđeno da različite temperature statistički značajno utiču ( $P < 0,05$ ) na toksičnost svih ispitivanih fungicida. Fungicidi koji su ispoljili statistički značajnu razliku ( $P < 0,05$ ) u pogledu toksičnosti na sve tri ispitivane

temperature su kaptan, hlorotalonil, ditianon i difenokonazol za izolat Da50A i kaptan, hlorotalonil, boskalid i difenokonazol za izolat Da99A. Utvrđeno je da je toksičnost većine fungicida bila najveća na najnižoj temperturi (15°C), a najmanja na najvišoj temperatiri (26°C). Matthiesen et al. (2016) su ukazali da temperatura ima značajan uticaj ( $P < 0,0001$ ) na toksičnost fungicida (metalaksil, etaboksam, kaptan, tiram, azoksitrobin, piraklostrobin i trifloksistrobin) za izolate pseudogljiva *Pythium sylvaticum* i *P. torulosum*. Za izolate patogena *P. oopapillum* temperatura je uticala na toksičnost kaptana i QoI fungicide, dok je za izolate *P. lutarium* temperatura uticala na toksičnost dva QoI fungicida, azoksistrobin i piraklostrobin (Matthiesen et al., 2016). Ovi autori su utvrdili, što je u skladu sa rezultatima naših istraživanja, da su svi fungicidi ispoljili najveću toksičnost na najnižoj temperturi (13°C), a najmanju na najvišoj temperaturi (23°C), za izolate patogena *P. sylvaticum*. Takođe, izolati *P. lutarium* su ispoljili dva puta veću osetljivost na azoksistrobin na temperaturi od 13°C, nego na 18 i 23°C (Matthiesen et al., 2016). Sa druge strane, potpuno suprotan rezultat dobili su za izolate *P. torulosum* i *P. oopapillum*, pri čemu su fungicidi bili najmanje toksični na 13°C, a najviše na 23°C (Matthiesen et al., 2016). Dva fungicida, ditianon i fluazinam, su ispoljili najmanju toksičnost na temperaturi od 22°C, koja je optimalna za porast oba izolata *D. applanata* (Da50A i Da99A). Matthiesen et al. (2016) su utvrdili da su svi fungicidi ispoljili najmanju toksičnost na temperaturama koje su optimalne za razvoj izolata *P. torulosum* (13°C) i *P. sylvaticum* (23°C).

Smanjena osetljivost patogena na fungicide na temperaruri koja je optimalna za razvoj patogena, mogla bi nastati usled sposobnosti patogena da metaboliše i detoksuje pesticid pre njegovog vezivanja za mesto delovanja (Matthiesen et al., 2016). Imajući u vidu da temperaturne promene utiču na fluidnost membrana, dovodeći do njihove povećane propustljivosti (Los i Murata, 2004), mogu nastati i promene u pogledu propustljivosti membrana za fungicide. Dalje, temperaturne promene utiču i na aktivnost mambranskih proteina koji transportuju različite materije kroz membrane uključujući i fungicide (Matthiesen et al., 2016). Nekoliko istraživanja je pokazalo da fungicidi utiču na aktivnost ATP-vezujućih transportera (ATP transporteri) (Judelson i Senthil, 2006; de Ward et al., 2006; Coleman i Mylonakis, 2009), što može dovesti do promene usvajanja fungicida i pre njihovog dospevanja do mesta delovanja.

## 6. ZAKLJUČAK

Na osnovu utvrđenih rezultata i njihovog razmatranja u ovom radu, kako u laboratorijskim ''*in vitro*'' testovima, tako i u eksperimentima u polju mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Izolacijom patogena iz uzoraka obolelih izdanaka maline i proučavanjem njihovih patogenih i morfoloških (makroskopskih i mikroskopskih) odlika, utvrđeno je da pripadaju vrsti *Didymella applanata* (Niessl.) Sacc. (anamorf: *Phoma argillacea*), (familija Didymellaceae, red Pleosporales, potklasa Pleosporomycetidae, klasa Dothideomycetes, razdeo Ascomycota i carstvo Fungi). Identitet izolata potvrđen je na molekularnom nivou analizom sekvenci DNK fragmenata.
- Većina izolata na podlozi od krompira, dekstroze i agara (KDA) obrazovala je pepeljasto sivu koloniju, nepravilnog oblika i režnjevutih ivica. Nakon razvoja od 7-10 dana na KDA podlozi na sobnoj temperaturi, patogen počinje da luči žuto narandžasti pigment. Na ovsenoj podlozi (OA), izolati su formirali žuto belu koloniju, pravilnog oblika, ravnih ivica, bez lučenja pigmenta.
- Na osnovu utvrđenih rezultata, možemo zaključiti da hranljiva podloga, temperatura i svetlosni uslovi značajno utiču na brzinu porasta micelije izolata. Osim na brzinu rasta, vrsta hranljive podloge uticala je i na oblik kolonije i izgled margine. Najveći porast za sve izolate ustanovljen je na ovsenoj podlozi (30,4-42,8 mm/7 dana). Takođe, na ovoj podlozi izolati su formirali kolonije pravilnog oblika sa ravnim ivicama. Najveći prosečan porast za većinu izolata bio je na temperaturi 22°C (32,5-40,6 mm/7 dana) i u svetlosnom uslovu 12 h svetlost/12 h mrak.
- Na osnovu vrednosti srednje efektivne koncentracije (EC<sub>50</sub>), zaključujemo da je difenokonazol najviše inhibirao porast micelije izolata (0,23-0,49 mg/L), dok je porast micelije najmanje inhibiran Cu-hidroksidom (EC<sub>50</sub> 39,48-51,19 mg/L). Svi izolati su svrstani u kategoriju osetljivih na Cu-hidroksid, mankozeb, kaptan, hlorotalonil, ditianon, difenokonazol i tebukonazol (RF<3). Sa druge strane, izolati su ispoljili

razlike u osetljivosti na azoksistrobin, piraklostrobin, fluazinam, boskalid i fluopiram. Utvrđeno je prisustvo visoko rezistentnih izolata na azoksistrobin i piraklostrobin, i umereno rezistentnih na fluazinam, boskalid i fluopiram. Vrednosti faktora rezistentnosti za piraklostrobin za pojedine izolate bile su preko 200, a za azoksistrobin preko 5000, dok je RF vrednost za umereno rezistentan izolat na fluazinam iznosila 7,4. Pronađena su četiri umereno rezistentna izolata na boskalid sa faktorom rezistentnosti u rasponu 6,3-11.

- U našim istraživanjima utvrđeno je da različite temperature statistički značajno utiču ( $P < 0,05$ ) na toksičnost svih fungicida. Fungicidi koji su ispoljili statistički značajnu razliku ( $P < 0,05$ ) u pogledu toksičnosti na sve tri ispitivane temperature su kaptan, hlorotalonil, ditianon i difenokonazol za izolat Da50A i kaptan, hlorotalonil, boskalid i difenokonazol za izolat Da99A. Takođe, utvrđeno je da je toksičnost većine fungicida bila najveća na najnižoj temperaturi ( $15^{\circ}\text{C}$ ), a najmanja na najvišoj temperaturi ( $26^{\circ}\text{C}$ ).
- Na osnovu rezultata dvogodišnjih ispitivanja efikasnosti fungicida, utvrdili smo da je u uslovima intenziteta oboljenja u kontroli od 53,7% i 76,3%, najveća efikasnost ostvarena primenom tebukonazola, fluopirama i boskalida (94,7-99,3%). Efikasnost fungicida nespecifičnih mehanizama delovanja (Cu-hidroksid, mankozeb, hlorotalonil i ditianon), bila je u intervalu 64,4-81,7%, što se s obzirom na jak intenzitet oboljenja u kontroli može smatrati dobrom. Međutim, ustanovljena je veoma slaba efikasnost fluazinama (20,2-27,1%), kao i oba fungicida iz grupe strobilurina (13,7-16,2% za azoksistrobin, odnosno 32,9-37,8% za piraklostrobin).
- Utvrđivanjem kritičnog perioda za primenu fungicida, sa ciljem suzbijanja *D. applanata*, ustanovljeno je da je kritičan period za primenu DMI fungicida tebukonazol kada su izbojci maline dužine oko 25-40 cm. Kada tebukonazol nije primenjen u ovom periodu, njegova efikasnost iznosila je samo 73,4%, u poređenju sa najvećom ostvarenom efikasnošću od 99,6% kada je primenjen u svim tretiranjima.



## 7. LITERATURA

- Akagi, T., Mitani, S., Komyoji, T., & Nagatani, K. (1995). Quantitative structure-activity relationships of fluazinam and related fungicidal N-phenylpyridiamines: preventive activity against *Botrytis cinerea*. *Journal of Pesticide Science*, 20, 279-290.
- Akagi, T., Mitani, S., Komyoji, T., & Nagatani, K. (1996). Quantitative structure-activity relationships of fluazinam and related fungicidal N-phenylpyridinamines: preventive activity against *Sphaerotheca fuliginea*, *Pyricularia oryzae* and *Rhizoctonia solani*. *Journal of Pesticide Science*, 21, 23-29.
- Albertini, C., Gredt, M., & Leroux, P. (2003). Polymorphism of 14 alpha-demethylase gene (CYP51) in the cereal eyespot fungi *Tapesia acuformis* and *Tapesia yallundae*. *The European Journal of Plant Pathology*, 109, 117-128
- Albertini, C., & Leroux, P. (2004). A *Botrytis cinerea* putative 3-keto reductase gene (ERG27) that is homologous to the mammalian 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 7 gene (17beta-HSD7). *European Journal of Plant Pathology*, 110, 723-733.
- Albury, M. S., Elliott, C., & Moore, A. L. (2009). Towards a structural elucidation of the alternative oxidase in plants. *Physiologia Plantarum*, 137, 316-327.
- Allen, T. W., Enebak, S. A., & Carey, W. A. (2004). Evaluation of fungicides for control of species of *Fusarium* on longleaf pine seed. *Crop Protection*, 23, 979-982.
- Amiri, A., Brannen, P. M., & Schnabel, G. (2010). Reduced sensitivity in *Monilinia fructicola* field isolates from South Carolina and Georgia to respiration inhibitor fungicides. *Plant Disease*, 94, 737-743.

- Anderson, H. W. (1920). *Diseases of Illinois fruits*. Urbana, Illinois: University of Illinois Agricultural Experiment Station.
- Anema, B. P., Bouwman, J. J., Komyoji, T., & Suzuki, K. (1992). Fluazinam: a novel fungicide for use for *Phytophthora infestans* in potatoes. In *Proceedings Brighton crop protection conference-pest and diseases*, (pp. 663-668). Brighton, UK.
- Anonymous (2013). *Census of Agriculture 2012-Agriculture in the Republic of Serbia I*. Beograd, Serbia: Statistical Office of the Republic of Serbia.
- Anonymous (2015). Sredstva za zaštitu bilja u prometu u Srbiji. *Biljni lekar*, 43(1-2), 193-194.
- Aucejo, S., Foó, M., Ramis, M., Troncho, P., Gomez-Cadenas, A., & Jacas, J. A. (2003). Evaluación de la eficacia de algunos acaricidas contra la araña roja, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae), en clementino. *Boletín de sanidad vegetal Plagas*, 29, 453-459.
- Avenot, H. F., & Michailides, T. J. (2007). Resistance to boscalid fungicide in *Alternaria alternata* isolates from pistachio in California. *Plant Disease*, 91, 1345-1350.
- Avenot, H. F., Sellam, A., Karaoglanidis, G., & Michailides, T. J. (2008). Characterization of mutations in the iron-sulphur subunit of succinate dehydrogenase correlating with boscalid resistance in *Alternaria alternata* from California pistachio. *Plant Disease*, 98, 736-742.
- Avenot, H. F., Sellam, A., & Michailides, T. (2009). Characterization of mutations in the membrane-anchored subunits AaSDHC and AaSDHD of succinate dehydrogenase from *Alternaria alternate* isolates conferring field resistance to the fungicide boscalid. *Plant Pathology*, 58, 1134-1143.
- Avenot, H. F., & Michailides, T. J. (2010). Progress in understanding molecular mechanisms and evolution of resistance to succinate dehydrogenase

inhibiting (SDHI) fungicides in phytopathogenic fungi. *Crop Protection*, 29, 643-651.

Avenot, H. F., Thomas, A., Gitaitis, R. D., Langston, D. B., & Stevenson, K. L. (2012). Molecular characterization of boscalid and penthiopyrad-resistant isolates of *Didymella bryoniae* and assessment of their sensitivity to fluopyram. *Pest Management Science*, 68, 645-651.

Bartlett, D. W., Clough, J. M., Godwin, J. R., Hall, A. A., Hamer, M., & Parr-Dobrzanski, B. (2002). Review the strobilurin fungicides. *Pest Management Science*, 58, 649-662.

Barton, V., Fisher, N., Biagini, G. A., Ward, S. A., & O'Neill P. M. (2010). Inhibiting *Plasmodium* cytochrome bc1: a complex issue. *Current Opinion in Chemical Biology*, 14, 440-446.

Blake, C. M. (1980). Development of perithecia and pycnidia of *Didymella applanata* (causing spur blight) on raspberry canes. *Transactions of the British Mycological Society*, 74 (1), 101-105.

Bolton, A. T., & Julien, J. B. (1961). Variation in isolates of *Didymella applanata*. *Canadian Plant Disease*, 41 (4), 261-264.

Bolton, M. D., Birla, K., Rivera-Varas, V., Rudolph, K. D., & Secor, G. A. (2012). Characterization of CbCyp51 from field isolates of *Cercospora beticola*. *Phytopathology*, 102, 298-305.

Brandt, U., Schubert, J., Ceck, P., von Jagov, G. (1992). Uncoupling activity and physicochemical properties of derivatives of fluazinam. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1101, 41-47.

Broekhoven, L. W., Minderhoud, L., Holland, G. J. J., Tonsk, R. J. M., & Lousberg, R. C. (1975). Purification and properties of a phytotoxic glycopeptide from *Didymella applanata*. *Phytopathologische Zeitschrift*, 83, 49-56.

- Buchenauer, H. (1977). Mode of action and selectivity of fungicides which interfere with ergosterol biosynthesis. *British Crop Production Council*, 699-711.
- Burroughs, G. E., & Hora, J. (1982). *HETA-80-147-1076. Health hazard evaluation*. National Institute for occupational safety and health, Cincinnati.
- CABI (1977). *Distribution Maps of Plant Diseases No. 72* (edition 3). Wallingford, UK: CAB International.
- Cañas-Gutiérrez, G. P., Angarita-Velásquez, M. J., Restrepo-Flórez, J. M., Rodríguez, P., Moreno, C. X., & Arango, R. (2009). Analysis of the CYP51 gene and encoded protein in propiconazole-resistant isolates of *Mycosphaerella fijiensis*. *Pest Management Science*, 65, 892-899.
- Černohlávková, J., Jarkovský, J., & Hofman, J. (2009). Effects of fungicides mancozeb and dinocap on carbon and nitrogen mineralization in soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72 (1), 80-85.
- Chen, S. K., Edwards, C. A., & Subler, S. (2001). Effects of the fungicides benomyl, captan and chlorothalonil on soil microbial activity and nitrogen dynamics in laboratory incubations. *Soil Biology and Biochemistry*, 33, 1971-1980.
- Clough, J. M., & Godfrey, C. R. A. (1999). Azoxystrobin, a novel broad-spectrum systemic fungicide. *Journal of Synthetic Organic Chemistry*, 4, 346-350.
- Cohen, S. M., Gordon, E. B., Singh, P., Arce, G. T., & Nyska, A. (2010). Carcinogenic mode of action of folpet in mice and evaluation of its relevance to humans. *Critical Reviews in Toxicology*, 40, 531-545.
- Coleman, J. J., & Mylonakis, E. (2009). *Efflux in fungi: la pièce de résistance*. *PLoS Pathology*, 5:e1000486.
- Converse, R. H. (1966). *Diseases of raspberries and erect and trailing blackberries*. Washington, USA: Department of Agriculture.

- Cools, H. J., Fraaije, B. A., Kim, S. H., & Lucas, J. A. (2006). Impact of changes in the target P450 CYP51 enzyme associated with altered triazole-sensitivity in fungal pathogens of cereal crops. *Biochemical Society Transactions*, *34*, 1219-1222.
- Cools, H. J., Fraaije, B. A., Bean, T. P., Antoniw, J., & Lucas, J. A. (2007). Transcriptome profiling of the response of *Mycosphaerella graminicola* isolates to an azole fungicide using cDNA microarrays. *Molecular Plant Pathology*, *8*, 639-651.
- Cools, H. J., Bayon, C., Atkins, S., Lucas, J. A., & Fraaije, B. A. (2012). Over-expression of the sterol 14 $\alpha$ -demethylase gene (MgCYP51) in *Mycosphaerella graminicola* isolates confers a novel azole fungicide sensitivity phenotype. *Pest Management Science*, *68*, 1034-1040.
- Corbaz, R. (1957). Recherches sur le genre *Didymella* Sacc. *Phytopathologische Zeitschrift*, *28*, 275-414.
- Corbett, J. R., Wright, K., & Baillie, A. C. (1974). *The biochemical mode of action of pesticides*. London, UK: Academic Press.
- Corlett, M. (1981). A taxonomic survey of some species of *Didymella* and *Didymella*-like species. *Canadian Journal of Botany*, *59*, 2016-2042.
- Costa, L. G. (2008). Toxic effects of pesticides. In C. D. Klaassen (Ed.), *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons, 76 Edition*. (pp. 883-933). New York: The McGraw-Hill.
- Cycoń, M., Piotrowska-Seget, Z., & Kozdrój, J. (2010). Responses of indigenous microorganisms to a fungicidal mixture of mancozeb and dimethomorph added to sandy soils. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *64* (4), 316-323.

- Daubeny, H. A., & Pepin, H. S (1974). Susceptibility to spur blight (*Didymella applanata*) among red raspberry cultivars and selections. *Plant Disease Reporter*, 58 (11), 1024-1027.
- Dekker, J. (1995). Development of resistance to modern fungicides and strategies for its avoidance. In H., Lyr ( Ed.), *Modern selective fungicides-properties, applications, mechanisms of action*. (pp. 23-38). Jena, Germany: Gustav Fischer Verlag.
- Délye, C., Laigret, F., & Corio-Costet, M. F. (1997). A mutation in the 14 $\alpha$ -demethylase gene of *Uncinula necator* that correlates with resistance to a sterol biosynthesis inhibitor. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 2966-2970.
- Délye, C., Bousset, L. & Corio-Costet, M. F. (1998). PCR cloning and detection of point mutations in the eburicol 14 $\alpha$ -demethylase (*CYP51*) gene from *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*, a “recalcitrant” fungus. *Current Genetics*, 34, 399-403.
- Dhingra, O. D., & Sinclair, J. B. (1995). *Basic plant pathology methods*. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press.
- Dierckx, P. J. (1984). *In vitro* interaction of dithiocarb with rat liver glutathione S-transferases. *Pharmacological Research Communications*, 16, 135-143.
- Dugger, W. M., Jr, Humphreys, T. E., & Calhoun, B. (1959). Influence of N-(Trichloromethylthio)-4-Cyclohexene-1,2-Dicarboximide (Captan) on Higher Plants. II. Effect on Specific Enzyme Systems. *American Journal of Botany*, 46 (3), 151-156.
- Duncan, D. B. (1975). T tests and intervals for comparisons suggested by the data. *Biometrics*, 31, 339-359.
- Duzhak, A. B, Panfilova, Z. I, Duzhak, T. G, Vasyunina, E. A, & Shternshis, M. V. (2012). Role of prodigiosin and chitinases in antagonistic activity of the

bacterium *Serratia marcescens* against the fungus *Didymella applanata*. *Biochemistry (Moscow)*, 77, 910-916.

Edginton, R. A. (1981). Structural requirements of systemic fungicides. *Annual Review Phytopathology*, 19, 107-124.

Edwards, R., Ferry, D. G., & Templ, W. A. (1991). Fungicides and related compounds. In W. J. Hayes & E. R. Laws (Eds.), *Handbook of pesticide toxicology*. (pp. 1409-1470). San Diego: Academic Press.

Elad, Y. (1994). Biological control of grape grey mould by *Trichoderma harzianum*. *Crop Protection*, 13, 35-38.

Erwin, D. C., & Ribeiro, O. K. (2005). *Phytophthora diseases worldwide*. St. Paul, Minnesota, USA: APS Press.

EU Pesticides Database. (2014). Active substances. Regulation (EC) No 1107/2009. [http://ec.europa.eu/sanco\\_pesticides/public/](http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/). Datum pristupa: 23.10.2017.

Everett, K. R., Timudo-Torrevilla, O. E. (2007). *In vitro* fungicide testing for control of avocado fruit rots. *New Zealand Plant Protection*, 60, 99-103.

Faby, R. (2008). Control of cane diseases in raspberries. *Acta Horticulturae*, 777, 323-326.

FAOSTAT. (2017). Food and Agriculture Organisation of the United Nations, <http://www.fao.org/faostat/en/#home>. Datum pristupa: 20.09.2017.

Fernández-Ortuno, D., Torés, J. A., de Vicente, A., & Pérez-García, A. (2008). Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi. *International Microbiology*, 11 (1), 1-9.

Fernando, A., Ring, F., Lowe, D., & Callan, B. (1999). *Index of plant pathogens, plant-associated microorganisms, and forest fungi of British Columbia*. British Columbia, Canada: Canadian forest service publications, information report BL-X-385.

- Finney, M. A. (1964). Probit analysis - A statistical treatment of the sigmoid response curve. Cambridge, UK: University Press.
- Fisher, N., & Meunier, B. (2008). Molecular basis of resistance to cytochrome bc<sub>1</sub> inhibitors. *FEMS Yeast Research*, 8, 183-192.
- Follett, P. A., & Neven, L. G. (2006). Current trends in quarantine entomology. *Annual Review of Entomology*, 51, 359-385.
- Fox, R. T. V. (2006). Spur blight of raspberry. *Mycologist*, 20 (2), 77.
- Fraaije, B. A., Cools, H. J., Kim, S. H, Motteram, J., Clark, W. S., & Lucas, J. A. (2007). A novel substitution I381V in the sterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51) of *Mycosphaerella graminicola* is differentially selected by azole fungicides. *Molecular Plant Pathology*, 8, 245-254.
- FRAC (2004). QoI working group report. Pristup: [www.frac.info](http://www.frac.info).
- FRAC (2006). Pathogen risk list. Pristup: [www.frac.info](http://www.frac.info).
- FRAC (2018). FRAC code list 2018-final. [http://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac\\_code\\_list\\_2018-final.pdf?sfvrsn=6144b9a\\_2](http://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac_code_list_2018-final.pdf?sfvrsn=6144b9a_2). Datum pristupa: 28.02.2018.
- Fry, W. E (1982). *Principles of disease management*. New York: Academic Press.
- Gallion, J. J., Nolte, P., Miller, J. S. (2004). Managing fungicide resistance. Twin falls research and extension center-University of Idaho.
- Georgopoulos, S. G., & Skylakakis, G. (1986). Genetic variability in the fungi and the problem of fungicide resistance. *Crop Protection*, 5, 299-305.
- Ginns, J. H. (1986). *Compendium of plant diseases and decay fungi in Canada*. Ottawa, Canada: Canadian Government Publishing Center.



- Gisi, U., Sierotzki, H., Cook, A., & McCaffery, A. (2002). Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *Pest Management Science*, 58 (9), 859-867.
- Golembiewski, R. C., Vargas, J. M., Jones, A. L., Jr., & Detweiler, A. R. (1995). Detection of demethylation inhibitor (DMI) resistance in *Sclerotinia homoeocarpa* population. *Plant Disease*, 79, 491-493.
- Gordon, E. (2007). Captan: transition from 'B2' to 'not likely'. How pesticide registrants affected the EPA cancer classification update. *Journal of Applied Toxicology*, 27, 519-526.
- Gouot, J. M. (1994). Characteristics and population dynamics of *Botrytis cinerea* and other pathogens resistant to dicarboximides. In C. J. Delp (Ed.), *Fungicide resistant in North America*. (pp. 53-55). St. Paul, Minnesota, USA: The American Phytopathological Society.
- Greenburg, D. L., Rusiecki, J., Koutros, S., Dosemeci, M., Patel, R., Hines, C., Hopin, J. A., & Alavanja, M. C. (2008). Cancer incidence among pesticide applicators exposed to captan in the agricultural health study. *Cancer Causes and Control*, 19, 1401-1407.
- Gruyter, J. de., Boerema, G. H., Aa, H. A. van der. (2002). Contributions towards a monograph of *Phoma* (Coelomycetes) VI-2. Section Phyllosticoideis: outlines of its taxa. *Persoonia*, 18, 1-53.
- Gubler, W. D., & Ypema, H. L. (1996). Occurrence of resistance in *Uncinula necator* to triadimefon, myclobutanil, and fenarimol in California grapevines. *Plant Disease*, 80, 902-909.
- Guo, Z., Miyoshi, H., Komyoji, T., Haga, T., & Fujita, T. (1991). Uncoupling activity of a newly developed fungicide, fluazinam [3-chloro-N-(3-chloro-2,6-dinitro-4-trifluoromethylphenyl)-5-trifluoromethyl-2-pyridinamine]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1056, 89-92.

- Hägerhäll, C. (1997). Succinate: quinone oxidoreductases. Variations on a conserved theme. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1320, 107-141.
- Halimehjani, A. Z., Shayegan, M. H., Hashemi, M. M., & Notash, B. (2012). Investigation of the reaction of dithiocarbamic acid salts with aromatic aldehydes. *Organic Letter*, 14 (15), 3838-3841.
- Hamamoto, H., Hasegawa, K., Nakune, R., Lee, Y. J., Akutsu, K., & Hibi, T. (2001). PCR-based detection of sterol demethylation inhibitor-resistant strains of *Penicillium digitatum*. *Pest Management Science*, 57, 839-843.
- Harrington, T. C., & Wingfield, B. D. (1995). A PCR-based identification method for species of *Armillaria*. *Mycologia*, 280-288.
- Hayes, W. J. (1982). Fungicides and related compounds. In W. J. Hayes (Ed.), *Pesticides studied in man*. (pp. 578-622). Baltimore, MD: Williams and Wilkins.
- Heikkila, R. E., Cabbat, F. S., & Cohen, G. (1976). *Journal of Biological Chemistry*, 251, 2182-2185.
- Heldt-Hansen, H. P., Grant, N. G., & Olson, L. W. (1983). The respiratory system of the aquatic Phycomycete *Allomyces macrogynus* wild-type and sexual mutants, *Experimental Microbiology*, 3, 253-265.
- Horsefield, R., Yankovskaya, V., Sexton, G., Whittingham, W., Shiomi, K., Omura, S., Byrne, B., Cecchini, G., & Iwata, S. (2006). Structural and computational analysis of the quinone-binding site of complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase): a mechanism of electron transfer and proton conduction during ubiquinone reduction. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 7309-7316.
- Ishii, H., Miyamoto, T., Ushio, S., & Kakishima, M. (2011). Lack of crossresistance to a novel succinate dehydrogenase inhibitor, fluopyram, in highly boscalid-

resistant isolates of *Corynespora cassiicola* and *Podosphaera xanthii*. *Pest Management Science*, 67, 474-482.

Ivanović, M., & Ivanović, D. (2001). *Pseudomikoze i mikoze bilja*. Beograd, Srbija: De-eM-Ve.

Jennings, D. L. (1962). *Some evidence on the influence of the morphology of raspberry canes upon their liability to be attacked by certain fungi*. *Horticulture Research*, 1, 100-111

Jennings, D. L. (1982). Resistance to *Didymella applanata* in red raspberry and some related species. *Annals of Applied Biology*, 101, 331-337.

Jennings, D. J. (1988). *Raspberries and blackberries: their breeding, diseases and growth*. London, United Kingdom: Academic Press.

Jordan, D. B., Livingston, R. S., Bisaha, J. J., Duncan, K. E., Pember, S. O., Piccollelli, M. A., Schwartz, R. S., Sternberg, J. A., & Tang, X. S. (1999). Mode of action of Famoxadone. *Pesticide Sciences*, 55, 105-118.

Joseph-Horne, T., Wood, P. M., Wood, C. K., Moore, A. L., Headrick, J., & Hollomon, D. (1998). Characterization of a split respiratory pathway in the wheat "Take-all" fungus, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 11127-11133.

Josifović, M. (1941). *Bolesti voćaka*. Beograd, Srbija: Srpska kraljevska akademija.

Judelson, H. S., & Senthil, G. (2006). Investigating the role of ABC transporters in multifungicide insensitivity in *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant Pathology*, 7, 17-29.

Kapsa, J. (2003). Usefulness of fungicides with various modes of actions in the protection of potato crops. *Journal of Plant Protection Research*, 43 (2), 191-198.

- Karaoglanidis, G. S., Ioannidis, P. M., & Thanassoulopoulos, C. C. (2000). Reduced sensitivity of *Cercospora beticola* isolates to sterol demethylation-inhibiting fungicides. *Plant Pathology*, *49* (5), 567-572.
- Kato, T., Tanaka, S., Ueda, M., & Kawase, Y. (1974). Effects of the fungicide S-1358 on general metabolism and lipid biosynthesis in *Monilinia fructigena*. *Agricultural and Biological Chemistry*, *38*, 2377-2384.
- Keep, E., Knight, R. L., & Parker, J. H. (1972). *Two new raspberry varieties, Malling Orion and Malling Admiral*. Report of East Malling Research Station for 1971 (pp.147-148). Kent, United Kingdom.
- Keinath, A. P., & Hansen, Z. R. (2013). Isolates of *Didymella bryoniae* from South Carolina remain sensitive to DMI fungicides despite multiyear exposure. *Journal of Phytopathology*, *161* (5), 315-323.
- Kirimura, K., Hirowatari, Y., & Usami, S. (1987). Alterations of respiratory systems in *Aspergillus niger* under the conditions of citric acid fermentation. *Agricultural and biological chemistry*, *51*, 1299-1303.
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., Minter, D. W., & Stalpers, J. A. (2008). *Dictionary of the fungi* (10<sup>th</sup> Editon). Australia: CSIRO Publishing.
- Kittleson, A. R. (1952). A new class of organic fungicides. *Science*, *115* (2978), 84-86.
- Knight, R. L., & Keep, E. (1958). *Developments in soft fruit breeding at East Malling*. Report for East Malling Research Station for 1957 (pp. 62-67). Kent, United Kingdom.
- Koch, L. W. (1931). Spur blight of raspberries in Ontario caused by *Didymella appianata*. *Journal of Phytopathology*, *21*, 247-287.

- Köller, W., Wilcox, W. F., Barnard, J., Jones, A. L., & Braun, P. G. (1997). Detection and quantification of resistance of *Venturia inaequalis* populations to sterol demethylation inhibitors. *Phytopathology*, 87 (2), 184-190.
- Köller, W., & Wilcox, W. F. (2001). Evidence for the predisposition of fungicide-resistant phenotypes of *Venturia inaequalis* to a preferential selection for resistance to other fungicides. *Phytopathology*, 91, 776-781.
- Komyoji, T., Sugimoto, K., Mitani, S., Matsuo, N., & Suzuki, K. (1995). Biological properties of a new fungicide, fluazinam. *Journal of Pesticide Science*, 20, 129-135.
- Krämer, W., & Schirmer, U. (2007). *Modern Crop Protection Compound*. Weinheim: WILEY-VCH, Verlag GmbH & co. KGaA.
- Kuck, K. H., Scheinpflug, H., & Pontzen, R. (1995). DMI fungicides. In H. Lyr (Ed.), *Modern selective fungicides, 2<sup>nd</sup> revised and enlarged edition*. (pp. 205-258). Jena, Germany: Gustav Fisher Verlag.
- Kundu, C., Goon, A., & Bhattacharyya, A. (2011). Harvest residue study of fungicide tebuconazole EC formulation in groundnut and paddy. *Journal of Environmental Protection*, 2, 424-428.
- Küng-Färber, R. B., Chin, K. M., & Leadbitter, N. (2002). Sensitivity of *Venturia inaequalis* to trifloxystrobin. *Pest Management Science*, 58, 261-267.
- Kushalappa, A. C., & Eskes, A. B. (1989). *Coffee rust: epidemiology, resistance, and management*. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press.
- Lakić, N., & Vukša, P. (1991). Model probit analize u toksikološkim eksperimentima sa gljivicama. *Pesticidi*, 6, 185-190.
- Leroux, P. (2004). Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides. In Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski & N. Delen (Eds.),

*Botrytis: biology, pathology and control.* (195-222). Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

Leroux, P., & Gredt, M. (1972). *Etude de l' action in vitro des fongicides, methode de l' incorporation ou milieu.* Laboratoire de Phytopharmacie-CNRA-Versailles, France.

Leroux, P., Fritz, R., Debieu, D., Albertini, C., Lanen, C., Bach, J., Gredt, M., & Chapeland, F. (2002). Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science*, 58, 876-888.

Leroux, P., Albertini, C., Gautier, A., Gredt, M., & Walker, A. S. (2007). Mutations in the cyp51 gene correlated with changes in sensitivity to sterol 14 $\alpha$ -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Management Science*, 63, 688-699.

Leroux, P., & Walker, A. S. (2011). Multiple mechanisms account for resistance to sterol 14 $\alpha$ - demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Management Science*, 67, 44-59.

Lesko, S., Tripis, L., & Yang, S. (1984). Cellular response to oxygen radicals. In D. Armstrong & S. R. Sohal (Eds.), *Free radicals in molecular biology, aging, and disease, Volume XXVII.* (pp.391-396). New York: Raven Press.

Lindqvist-Kreuze, H., Hellqvist, S., Koponen, H., & Valkonen, J. P. T. (2003). *Phoma- Didymella* complex on hybrid arctic bramble with wilting symptoms. *Plant Pathology*, 52, 567-578.

Lisi, P., Caraffini, S., & Assalve, D. (1987). Irritation and sensitization potential of pesticides. *Contact Dermatitis*, 17, 212-218.

Los, D. A., & Murata, N. (2004). Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. *BBA Biomembranes*, 1666,142-157.

- Lousberg, R. J. J. ch., Holland, G. J. J., Minderhoud, L., Salemink, C. A., Foppen, F. H., Broekhoven, L. W. van, Marini Bettòlo, G. B., & Tuttobello, L. (1973). Production of the raspberry phytotoxin of *Didymella applanata* (Niessl) Sacc. *Journal of Phytopathology*, 76 (2), 133-141.
- Lukens, R. J., & Sisler, H. D. (1958). Chemical reaction involved in the fungitoxicity of captan. *Phytopathology*, 48, 235-244.
- Luo, C.-X., Cox, K. D., Amiri, A., & Schnabel, G. (2008). Occurrence and detection of the DMI resistance-associated genetic element 'Mona' in *Monilinia fructicola*. *Plant Disease*, 92,1099-1103.
- Ma, Z., Proffer, T. J., Jacobs, J. L., & Sundin, G. W. (2006). Overexpression of the 14 alphasubunit methylase target gene (CYP51) mediates fungicide resistance in *Blumeriella jaapii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 2581-2585.
- MacBean, C. (2012). *The Pesticide Manual*. Hampshire, UK: British Crop Protection Council.
- Marinovich, M., Viviani, B., Capra, V., Corsini, E., Anselmi, L., D'Agostino, G., Nucci, A. D., Binaglia, M., Tonini, M., & Galli, C. L. (2002). Facilitation of acetylcholine signaling by the dithiocarbamate fungicide propineb. *Chemical Research in Toxicology*, 15 (1), 26-32.
- Matheron, M. E., & Porchas, M. (2000). Impact of azoxystrobin, dimethomorph, fluazinam, fosetyl-Al, and metalaxyl on growth, sporulation, and zoospore cyst germination of three *Phytophthora* spp. *Plant Disease*, 84, 454-458.
- Matolcsy, G., Oros, G., Kômíves, T., & Andriská V. (1994). A family of new, non-ETU generating dithiocarbamate microbicides. In *Brighton crop protection conference - pests and diseases*. (vol. 2. pp. 533-540). Brighton, England.

- Matthiesen, R. L., Ahmad, A. A., & Robertson, A. E. (2016). Temperature affects aggressiveness and fungicide sensitivity of four *Pythium* spp. that cause soybean and corn damping off in Iowa. *Plant Disease*, *100*, 583-59
- McCallan, S. E., & Wilcoxon, F. (1936). The action of fungus spores on Bordeaux mixture. *Contributions from Boyce Thompson Institute*, *8* (2), 151-165.
- McGrath, M. T., & Shishkoff, N. (2001). Resistance to triadimefon and benomyl: dynamics and impact on managing cucurbit powdery mildew. *Plant Disease*, *85* (2), 147-154.
- Mehrotra, R. S., & Aggarwal, A. (2013). *Fundamentals of Plant Pathology*. New Delhi, India: McGraw Hill Education.
- Milenkovski, S., Baath, E., Lindgren, P. E., & Berglund, O. (2010). Toxicity of fungicides to natural bacterial communities in wetland water and sediment measured using leucine incorporation and potential denitrification. *Ecotoxicology*, *19* (2), 285-294.
- Miles, T. D., Miles, L. A., Fairchild, K. L., & Wharton, P. S. (2014). Screening and characterization of resistance to succinate dehydrogenase inhibitors in *Alternaria solani*. *Plant Pathology*, *63*, 155-164.
- Misić, P. D., Tešović, Z. V., Daubeny, H. A., & Pepin, H. S. (1975). Relative resistance to spur blight (*Didymella applanata*) among red, purple and black raspberry cultivars and selections in Yugoslavia. *Plant Disease Reporter*, *59* (7), 571-573.
- Mitani, S., Ohhashi, K., Yamaguchi, T., & Komyoji, T. (1996). Effect of fluazinam on infection process of *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype. *Journal of Plant Protection Research*, *21*, 61-63.
- Mitchell, P. (1975). The protonmotive Q cycle: a general formulation. *FEBS Letters*, *59*, 137-139.



- Miyamoto, T., Ishii, H., Seko, T., Kobori, S., & Tomita, Y. (2009). Occurrence of *Corynespora cassiicola* isolates resistant to boscalid on cucumber in Ibaraki Prefecture, Japan. *Plant Pathology*, 58, 1144-1151.
- Miyamoto, T., Ishii, H., Stammler, G., Koch, A., Ogawara, T., Tomita, Y., Fountaine, J. M., Ushio, S., Seko, T., & Kobori, S. (2010a). Distribution and molecular characterization of *Corynespora cassiicola* isolates resistant to boscalid. *Plant Pathology*, 59, 873-881.
- Miyamoto, T., Ishii, H., & Tomita, Y. (2010b). Occurrence of boscalid resistance in cucumber powdery mildew in Japan and molecular characterization of the iron-sulfur protein of succinate dehydrogenase of the causal fungus. *Journal of General Plant Pathology*, 76, 261-267.
- Muntañola-Cvetković, M. (1987). *Opšta mikologija*. Beograd, Srbija: NIRO Književne novine.
- Mycobank (2016). <http://www.mycobank.org/MB/195467>. Datum pristupa: 18.09.2016.
- Nakaune, R., Adachi, K., Nawata, O., Tomiyama, M., Akutsu, K., & Hibi, T. (1998). A novel ATP-binding cassette transporter involved in multidrug resistance in the phytopathogenic fungus *Penicillium digitatum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3983-3988.
- Nene, Y. L., & Thapliyal, P. N. (1994). *Fungicides in plant disease control*. New Delhi: Oxford and IBH.
- Nikolić, M., & Milivojević, J. (2010). *Jagodaste voćke tehnologije gajenja*. Srbija: Naučno voćarsko društvo Srbije.
- Nikolić, M., & Tanović, B. (2012). *Rubus* and *Ribes* industry in Serbia: A production model for developing countries. *Acta Horticulturae (ISHS)*, 946, 405-412.

- Nowacka, A. (2003). Polish monitoring of pesticide residues in crops. In J. Maček (Ed.), *Zbornik predavanj in referatov 6. Slovenskega posvetovanja o Varstvu rastlin* (pp. 34-41). Slovenije, Zreče.
- Nozawa, Y., & Morita, T. (1986). Molecular mechanisms of antifungal agents associated with membrane ergosterol. Dysfunction of membrane ergosterol and inhibition of ergosterol biosynthesis. In K. Iwata & H. Vanden Bossche (Eds.), *In vitro and in vivo evaluation of antifungal agent*. (pp. 111-122). Amsterdam, Netherlands: Elsevier Science Publisher B. V.
- Olaya, G., Zheng, D., & Köller, W. (1998). Differential responses of germinating *Venturia inaequalis* conidia to kresoxym-methyl. *Pesticide Sciences*, 54, 230-236.
- Olaya, G., & Holm, A. (2001). Sensitivity of *Didymella bryoniae* isolates to azoxystrobin. *Phytopathology*, 91, S67.
- Onions, A. H. S. (1971). Preservation of fungi. In J. R. Norris & D. W. Ribbons (Eds.), *Methods in microbiology, Volume 4*, (pp. 113-151). London: Academic Press.
- Owens, R. G., & Novotny, H. M. (1959). Mechanisms of action of the fungicide captan [N- (trichloromethylthio)-4-cyclohexene-1,2-dicarboximide]. Contributions from Boyce Thompson Institute, 20, 171-190.
- Pepin, H. S., Williamson, B., & Topham, P. B. (1985). The influence of cultivar and isolate on the susceptibility of red raspberry canes to *Didymella applanata*. *Annals of Applied Biology*, 106, 335-337.
- Perišić, M. (1951). *Didymella applanata* (Niessl) Sacc. in Yugoslavia - jedna nova bolest maline kod nas. *Zaštita bilja*, 8, 18-21.
- Phillips, M. (2011). *The holistic orchard: tree fruits and berries the biological way*. USA: Chelsea Green Publishing.

- Popović, V. Ž., Kalanović, B. M., & Živković, V. R. (2003). Malina u proizvodnji i izvozu poljoprivrede Srbije. *Ekonomika poljoprivrede*, 50 (3), 267-275.
- Punithalingam, E. (1978). *Didymella applanata*. In Commonwealth Mycological Institute (Great Britain); C.A.B. International Mycological Institute (Eds.), *CMI Descriptions of pathogenic fungi and bacteria*. (Set 57, No. 735.). Kew, Surrey, England: Commonwealth Mycological Institute.
- Rath, N. C., Rasaputra, K. S., Liyanage, R., Huff, G. R., & Huff, W. E. (2011). Dithiocarbamate toxicity-an appraisal. In M. Stoytcheva (Ed.), *Pesticides in the modern world-effects of pesticides exposure*. (pp. 323-340). InTechOpen, DOI: 10.5772/18307.
- Reddy, P., V., Patel, R., & White, J. F. (1998). Phylogenetic and developmental evidence supporting reclassification of cruciferous pathogens *Phoma lingam* and *Phoma wasabiae* in Plenodomus. *Canadian Journal of Botany*, 76, 1916-1922.
- Rekanović, E., Mihajlović, M., Potočnik, I. (2010). *In vitro* sensitivity of *Fusarium graminearum* (Schwabe) to difenoconazole, prothioconazole and thiophanate-methyl. *Pesticides and Phytomedicines*, 25 (4), 325-333.
- Rekanović, E., Potočnik, I., Milijašević-Marčić, S., Stepanović, M., Todorović, B., Mihajlović, M. (2011). Osetljivost izolata *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary na fluazinam, fosetil-Al i propamokarb-hidrohlorid. *Pesticidi i fitomedicina*, 26 (2), 111-116.
- Rekanović, E., Stepanović, M., Potočnik, I., Milijašević-Marčić, S., Todorović, B., Duduk, B., & Gavrilović, V. (2012). Field efficacy of fungicides and biofungicides in the control of spur blight of raspberries in serbia. *Acta Horticulturae*, 946, 289-292.

- Richmond, D. V., & Somers, E. (1963). Studies on the fungitoxicity of captan. III. Relation between the sulfhydryl content of fungal spores and their uptake of captan. *Annals of Applied Biology*, 52, 327-336.
- Robertson, J. L., Smith, K. L., Savin, N. E., & Lavigne, R. J. (1984). Effects of dose selection and sample size on the precision of lethal dose estimates in dose-mortality regression. *Journal of Economic Entomology*, 77, 833-837.
- Ruberson, J. R. (1999). *Handbook of pest management*. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press.
- Russell, P. (2003). Taking the path of least resistance-what resistance is, why it is a problem and what we can do to combat it. *Pesticide Outlook*, 14, 57-61.
- Russell, P. E. (2005). A century of fungicide evolution. *Journal of Agricultural Sciences*, 143, 11-25.
- Sargent, D. J, Fernàndez-Fernàndez, F., Rys, A., Knight, V. H., Simpson, D. W., & Tobutt, K. R. (2007). Mapping of A1 conferring resistance to the aphid *Amphorophora idaei* and dw (dwarfing habit) in red raspberry (*Rubus idaeus* L.) using AFLP and microsatellite markers. *BMC Plant Biology*, 7, 7-15.
- Sauter, H., Steglich, W., & Anke, T. (1999). Strobilurins: Evolution of a new class of active substances. *Angewandte Chemie International Edition*, 38, 1328-1349.
- Scheinflug, H. (1994). History of DMI fungicides and monitoring for resistance. In C. J. Delp (Ed.), *Fungicide Resistance in North America*. (pp. 45-51). St Paul, Minnesota, USA: APS Press.
- Schepers, H. T. A. M. (1996). Effect of rain on efficacy of fungicide deposits on potato against *Phytophthora infestans*. *Potato Research*, 39 (4), 541-550.

- Schnabel, G., & Jones, A. L. (2001). The 14 $\alpha$ -Demethylase (CYP51A1) gene is overexpressed in *Venturia inaequalis* strains resistant to myclobutanil. *Phytopathology*, *91*, 102-110.
- Schuring, F., & Salemink, C. A. (1972). A phytotoxin from *Didymella applanata* cultures. In S. Kadis, A. Ciegler & S. J. Ajl (Eds.), *Microbial toxins* (pp. 193-209). New York, USA: Academic Press.
- Schwinn, F. J., & Margot, P. (1991). Control with chemicals. In D. S., Ingram & P. H. Williams (Eds.), *Advances in Plant Pathology, Volume VII: Phytophthora infestans: the cause of potato late blight*. (pp. 225-265). San Diego, USA: Academic Press.
- Shamoun, S. F., & Sieber, T. N. (2000). Colonisation of leaves and twigs of *Rubus parviflorus* and *R. spectabilis* by endophytic fungi in a reforestation site in British Columbia. *Mycological Research*, *104* (7), 841-845.
- Shpatova, T. V., Shternshis, M. V., & Beljaev, A. A. (2003). Evaluation of the effects of biological preparations on phytopathogenic fungi *Didymella applanata* and *Botrytis cinerea*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, *39*, 36-39.
- Shternshis, M. V., Beljaev, A. A., Shpatova, T. V., Duzhak, A. B., & Panfilova, Z. I. (2006). *The effect of chitinase on Didymella applanata, the causal agent of raspberry cane spur blight*. *BioControl*, *51*, 311-322.
- Siegel, M. R. (1981). Sterol-inhibiting fungicides: effects on sterolbiosynthesis and site of action. *Plant Disease*, *65*, 986-989.
- Sierotzki, H., Parisi, S., Steinfeld, U., Tenzer, I., Poirey, S., & Gisi, U. (2000). Mode of resistance to respiration inhibitors at the cytochrome bc<sub>1</sub> enzyme complex of *Mycosphaerella fijiensis* field isolates. *Pest Management Science*, *56*, 833-841.

- Sisler, H. D., Ragsdal, N. N., & Waterfield, W. W. (1984). Biochemical aspects of the fungitoxic and growth regulatory action of fenarimol and other pyrimidin-5-ylmethanols. *Pesticide Sciences*, *15*, 167-176.
- Smith, F. D., Parker, D. M., & Köller, W. (1991). Sensitivity distribution of *Venturia inaequalis* to the sterol demethylation inhibitor flusilazole: baseline sensitivity and implications for resistance monitoring. *Phytopathology*, *81*, 392-396.
- Somers, E. (1963). The uptake of copper by fungal cells. *Annals of Applied Biology*, *51*, 425-437.
- Somers, E. (1965). Solubilisation of copper and the mode of action of Bordeaux mixture. *Nature*, *206*, 216-217.
- Stammler, G., Brix, H. D., Glättli, A., Semar, M., & Schoeﬂ, U. (2007). Biological properties of the carboxamide boscalid including recent studies on its mode of action. In *Proceedings XVI international plant protection congress* (pp.40-45). Glasgow, Scotland, UK.
- Stein, J. M. (2002). *The use of dimethomorph in the control of potato late blight (Phytophthora infestans): sensitivity survey, insensitivity generation, and field optimization*. Michigan State University.
- Steinfeld, U., Sierotzki, H., Parisi, S., Poirey, S., & Gisi, U. (2001). Sensitivity of mitochondrial respiration to different inhibitors in *Venturia inaequalis*. *Pest Management Science*, *57*, 787-796.
- Steinfeld, U., Sierotzki, H., Parisi, S., & Gisi, U. (2002). Comparison of resistance mechanisms to strobilurin fungicides in *Venturia inaequalis*. In H. W. Dehne, U. Gisi, K. H. Kuck, P. E. Russell & H. Lyr (Eds.), *Modern fungicides and antifungal compounds III*. (pp. 167-176). Bonn, Germany: AgroConcept GmbH.

- Stevanović, M. & Arsić, T. (1977). Hibridizacija nukleinskih kiselina. Iz Stevanović, M. (Ed.), *Osnovi genetičkog inženjerstva: izolovanje, obrada i elektroforetska analiza DNK*. Beograd: Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo.
- Stevanović, M., Dolovac, N., Trkulja, N., Milosavljević, A., Kuzmanović, S., & Aleksić, G. (2014). Suzbijanje *Didymella applanata* u zasadima maline primenom novijih organskih fungicida tokom vegetacije. *Zaštita bilja*, 65 (1), 27-32.
- Stevenson, K. L., Keinath, A. P., Thomas, A., Langston, D. B. Jr., Roberts, P. D., Hochmuth, R. C., & Thornton, A. C. (2012). Boscalid insensitivity documented in *Didymella bryoniae* isolated from watermelon in Florida and North Carolina. *Plant Health Progression*. doi:10.1094/PHP-2012-0518-01-BR.
- Stević, M., Vukša, P., & Elezović, I. (2010). Resistance of *Venturia inaequalis* to demethylation inhibiting (DMI) fungicides. *Zemdirbyste-Agriculture*, 97 (4), 65-72.
- Swait, A. A. J. (1980). Field observation on disease susceptibility, yield and agronomic character of some new raspberry cultivars. *Journal of Horticultural Science*, 55 (2), 133-137.
- Swingle, W. T. (1896). *Bordeaux mixture: Its chemistry, physical properties, and toxic effects on fungi and algae*. Washington, USA: Government Printing Office.
- Tamura, H., & Mizutani, A. (1999). Mode of action of strobilurin fungicides. *Journal of Pesticide Science*, 24, 189-196.
- Tamura, O. (2000). Resistance development of grey mould of beans towards fluazinam and relevant counter-measures. In *Book of abstracts of 10<sup>th</sup> symposium of research committee of fungicide resistance* (pp. 7-16). Okoyama, Japan.

- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Steker, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, *28*, 2731-2739.
- Thomas, A. (2011). *Sensitivity of Didymella bryoniae to DMI and SDHI fungicides and the relationship between fungicide sensitivity and control of gummy stem blight in watermelon*. University of Georgia.
- Thomas, A., Langston, D. B., Jr., & Stevenson, K. L. (2010). Sensitivity of *Didymella bryoniae* to DMI and carboxamide fungicides. *Phytopathology*, *100*, S126.
- Thomas, A., Langston, D. B., Jr., & Stevenson, K. L. (2012). Baseline sensitivity and cross-resistance to succinate-dehydrogenase-inhibiting fungicides and demethylation-inhibiting fungicides in *Didymella bryoniae*. *Plant Disease*, *96*, 979-984.
- Thorn, G. D., & Ludwig, R. A. (1962). *The dithiocarbamates and related compounds*. Amsterdam: Elsevier Publishing Company.
- Tokutake, N., Miyoshi, H., & Fujita, T. (1991). Electron transport inhibition of the cyochrome bc1 complex of rat liver mitochondria by phenolic uncouplers. *Biochimica et Biophysica Acta*, *105* (7), 377-383.
- Trochimowicz, H. J., Kennedy, G. L., & Krivanek, N. D. (1991). Heterocyclic and miscellaneous nitrogen compounds. In G. D. Clayton & F. E. Clayton (Eds.), *Patty's industrial hygiene and toxicology, Volume 2, part E, 4<sup>th</sup> Edition* (pp. 3285-3521). New York: Wiley.
- Tucker, R. P., Leaper, D. J., & Laidler, S. T. (1994). Fluazinam - control of potato late blight - UK experience 1992-3. In *Proceedings 1994 Brighton crop protection conference - pests and diseases, Volume 1*. (pp. 295-300). Brighton, UK.



- US EPA. (1975). United States Environmental Protection Agency, office of pesticide programs, criteria and evaluation division. EPA/540-1-75-012: 1975. Initial scientific and mini-economic review of captan. Washington, DC.
- US EPA. (1999). United States Environmental Protection Agency. 738-R-99-011: 1999. Registration eligibility decision (RED)-folpet. Washington, DC.
- US EPA. (2004). United States Environmental Protection Agency. 69 Fed. Reg. 68357-68360: 2004. Amendment to the 1999 captan registration eligibility decision (RED). Captan: cancer reclassification. Washington, DC.
- Vázquez-Acevedo, M., Antaramian, A., Corona, N., & Gonzalez-Halphen D. (1993). Subunit structures of purified beef mitochondrial cytochrome bc1 complex from liver and heart. *The Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 25,401-410.
- Veličković, N. (2007). *Malina, praktični priručnik*. Crna Gora: Pegaz.
- Veloukas, T., Leroch, M., Hahn, M., & Karaoglanidis, G. S. (2011). Detection and molecular characterization of boscalid-resistant *Botrytis cinerea* isolates from strawberry. *Plant Disease*, 95, 1302-1307.
- Veloukas, T., Markoglou, A. N., & Karaoglanidis, G. S. (2013). Differential effect of *SdhB* gene mutations on the sensitivity to SDHI fungicides in *Botrytis cinerea*. *Plant Disease*, 97, 118-122.
- Vieira, R. F., Silva, C. M. M. S., Maia, A. H. N., Fay, E. F., & Coelho, K. C. (2000). An appraisal of five methods for the measurement of the fungal population in soil treated with chlorothalonil. *Pest Management Science*, 56, 431-440.
- Vincelli, P. (2002). QoI (Strobilurin) fungicides: benefits and risk. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10. 1094/PHI-I-2002-0809-02.
- Vincent, P. G., & Sisler, H. D. (1968). Mechanism of antifungal action of 2,4,5,6-tetrachloroisophthalonitrile. *Physiologia Plantarum*, 21, 1249-1264.

- Waard, M. A. de., Andrade, A. C., Hayashi, K., Schoonbeek, H., Stergiopoulos, I., & Zwiers, L. (2006). Impact of fungal drug transporters on fungicide sensitivity, multidrug resistance and virulence. *Pest Management Science*, *62*, 195-207.
- Wain, R. L., & Wilkinson, E. H. (1946). Studies upon the copper fungicides. IX. Investigations with the exudate from fungus spores. *Annals of Applied Biology*, *33*, 401-405.
- Wharton, P., Fairchild, K., Belcher, A., & Wood, E. (2012). First report of *in vitro* boscalid-resistant isolates of *Alternaria solani* causing early blight of potato in Idaho. *Plant Disease*, *96*, 454.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A., Innis, D. H., Gelfand, J., Sninsky & T. J. White (Eds.), *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. (pp. 315-322). San Diego, California, USA: Academic Press.
- Williamson, B. (1980). Does spur blight (*Didymella applanata*) reduce the yield of red raspberries?. *Acta Horticulturae*, *112*, 285-294.
- Williamson, B. (1984). Polyderm, a barrier to infection of red raspberry buds by *Didymella applanata* and *Botrytis cinerea*. *Annals of Botany*, *53* (1), 83-90.
- Williamson, B. (1991). Spur Blight. In M. A. Ellis, R. H. Converse, R. N. Williams & B. Williamson (Eds.), *Compendium of raspberry and blackberry diseases and insects*. (pp.7-9). St. Paul, Minnesota, USA: The American Phytopathology Society Press.
- Williamson, B. (2003). A possible resurgence of minor fungal diseases of *Rubus* caused by reductions in fungicide use. *IOBC-WPRS BULLETIN*, *26* (2), 139-146.

- Williamson, B., & Hargreaves, A. (1981). Effects of *Didymella applanata* and *Botrytis cinerea* on axillary buds, lateral shoots and yield of red raspberry. *Annals of Applied Biology*, 97 (1), 55-64.
- Williamson, B., & Dale, A. (1983). Effects of spur blight (*Didymella applanata*) and premature defoliation on axillary buds and lateral shoots of red raspberry. *Annals of Applied Biology*, 103 (3), 401-409.
- Williamson, B., & Pepin, H. S. (1987). The effect of temperature on the response of canes of red raspberry cv. Malling Jewel to infection by *Didymella applanata*. *Annals of Applied Biology*, 110, 295-302.
- Williamson, B., & Jennings, D. L. (1992). Resistance to cane and foliar diseases in red raspberry (*Rubus idaeus*) and related species. *Euphytica*, 63 (1-2), 59-70.
- Wise, D. R., DeBerardinis, R. J., Mancuso, A., Sayed, N., Zhang, X. Y., Pfeiffer, H. K., & Thompson, C. B. (2008). Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. In *Proceedings of the national academy of sciences*, 105 (48), 18782-18787. USA.
- Worthing, C. R. (1991). Mancozeb. In C. R. Worthing & Hance, R. J. (Eds.), *The pesticide manual*. (pp. 529-530). UK: British Crop Protection Council.
- Yanase, Y., Yoshikawa, Y., Kishi, J., & Katsuta, H. (2007). The history of complex II inhibitors and the discovery of penthiopyrad. In H. Ohkawa, H. Miyagawa & P. W. Lee (Eds.), *Pesticide Chemistry: Crop protection, public health, environmental safety*. (pp. 295-303). Weinheim, Germany: WILEY-VCH.
- Yang, C., Hamel, C., Vujanovic, V., & et Gan, Y. T. (2011). Fungicide: modes of action and possible impact on nontarget microorganisms. *Agriculture et Agroalimentaire Canada*. doi:10.5402/2011/130289.

- Yin, Y. N., Kim, Y. K., & Xiao, C. L. (2011). Molecular characterization of boscalid resistance in field isolates of *Botrytis cinerea* from apple. *Phytopathology*, *101*, 986-995.
- Ypema, H. L., & Gold, R. E. (1999). Kresoxim-methyl-Modification of a naturally occurring compound to produce a new fungicide. *Plant Disease*, *83*, 4-19.
- Zara, V., Conte, L., & Trumpower, B. L. (2009). Biogenesis of the yeast cytochrome bc1 complex. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1793*, 89-96.
- Zehr, E. I., Luszcz, L. A., Olien, W. C., Newall, W. C., & Toler, J. E. (1999). Reduced sensitivity in *Monilinia fructicola* to propiconazole following prolonged exposure in peach orchards. *Plant Disease*, *83* (10), 913-916.
- Zemaitis, M. A., & Greene, F. E. (1979). *In vivo* and *in vitro* effects of thiuram disulfides and dithiocarbamates on hepatic microsomal drug metabolism in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *48*, 343-350.
- Ziogas, B. N., Baldwin, B. C., & Young, J. E. (1997). Alternative respiration: A biochemical mechanism of resistance to azoxystrobin (ICIA 5504) in *Septoria tritici*. *Pesticide Science*, *50*, 28-34.

## 8. PRILOZI

**Prilog 1.** Prikaz meteoroloških podataka (minimalne, maksimalne, srednje dnevne temperature i padavine), za lokalitet Arilje, za vreme trajanja oglada.

Datum	2014. god.				2015. god.				2016. god			
	T-min.	T-max.	T-sred.	Pad. (mm)	T-min.	T-max.	T-sred.	Pad. (mm)	T-min.	T-max.	T-sred.	Pad. (mm)
1.4.2014.	2,2	20,7	11,5		4	17,4	10,7	17	4,9	27	16	
2.4.2014.	1,4	22	11,7		-1,1	14	6,5	3,3	6	19	12,5	
3.4.2014.	2,4	23	12,7		2,5	9	5,8		2,2	24	13,1	
4.4.2014.	3,3	23,9	13,6		-5,4	12,5	3,6		3,6	26,7	15,2	
5.4.2014.	6,4	20,5	13,5		2,6	3,7	3,2	2	4,7	27,5	16,1	
6.4.2014.	7,9	13,8	10,9	1	2,7	6,7	4,7	17	5,4	28	16,7	
7.4.2014.	4,3	18,3	11,3		1,3	7,4	4,4	3,2	6,4	27	16,7	0,4
8.4.2014.	2,3	23,4	12,9		0,3	10,7	5,5	1	10,4	23,3	16,9	
9.4.2014.	3,5	11,9	7,7		4,7	11,5	8,1		11,2	18,6	14,9	
10.4.2014.	0,3	13,2	6,8	3	-1,5	18,8	8,7		9,9	12,5	11,2	10
11.4.2014.	5,4	11,5	8,5	0,9	-1,5	23,4	11		9	19	14	
12.4.2014.	4,8	16,5	10,7	0,8	4,6	20,7	12,7		2,7	24,6	13,7	
13.4.2014.	5,8	16	10,9		4,1	22,1	13,1		3,9	24,2	14,1	
14.4.2014.	-0,6	20,3	9,9		5,8	15,5	10,7	1	11	23,1	17,1	
15.4.2014.	4,5	10,4	7,5	4	0,2	21,1	10,7		5,2	20,4	12,8	
16.4.2014.	4	6,7	5,4	7,2	1,7	26,5	14,1		2	28,1	15,1	
17.4.2014.	0,3	6,3	3,3	20	5,4	23,7	14,6		6	29,3	17,7	
18.4.2014.	3,3	8,3	5,8	19	11,4	18,7	15,1		8,7	28	18,4	
19.4.2014.	7,8	12,6	10,2	18	3,6	11,5	7,6	7	11	21,5	16,3	
20.4.2014.	6,5	18,6	12,6	16	-1,8	16,5	7,4		7,3	14,2	10,8	2
21.4.2014.	5	20,5	12,8	0,6	5,5	16,7	11,1		-2	18,9	8,5	
22.4.2014.	9,5	22,5	16	2	1,2	19	10,1		-1,2	23,3	11,1	
23.4.2014.	8,6	18	13,3		0	23,5	11,8		1,9	22,6	12,3	
24.4.2014.	13,3	19	16,2	10	5,7	21	13,4		8,4	13	10,7	7,2
25.4.2014.	11,9	14,5	13,2	31	7,7	22,3	15	1	4	5,3	4,7	3,5
26.4.2014.	9,9	19,2	14,6	2	3,9	24,5	14,2		0,2	14	7,1	7
27.4.2014.	8,7	20	14,4		5,2	24,5	14,9		-1,4	19	8,8	
28.4.2014.	9,5	20,1	14,8	3	8,2	23	15,6	0,4	3,2	12,8	8	
29.4.2014.	10,8	18,3	14,6	25	7,3	14	10,7		8,5	11,7	10,1	4
30.4.2014.	11,1	18,5	14,8	8	0,7	21,2	11		8,9	16,1	12,5	4
1.5.2014.	9,1	18	13,6	0,2	7,5	23,5	15,5	0,4	5,9	13,5	9,7	
2.5.2014.	8,3	20,5	14,4	5	10,9	18,4	14,7	1	10,6	12,4	11,5	15
3.5.2014.	11,3	17,5	14,4	1	9,3	24,6	17	4	8,2	10,7	9,5	18
4.5.2014.	10	10	10	10	11,5	26,9	19,2		7,8	11,9	9,9	11
5.5.2014.	4,2	15,5	9,9	12	12,6	26,3	19,5		8,9	17,9	13,4	3

6.5.2014.	1,7	19,7	10,7		11,5	33,8	22,7		7,5	18,5	13	0,3
7.5.2014.	4	24,5	14,3		16,5	22,5	19,5		6,3	20,5	13,4	7
8.5.2014.	11,1	18,5	14,8		7,8	24	15,9		6	20,7	13,4	1
9.5.2014.	6,5	21,1	13,8		7	23,9	15,5		8,9	21,8	15,4	4
10.5.2014.	5	22,9	14		6,5	21	13,8		8,6	16,8	12,7	0,1
11.5.2014.	7,6	27,8	17,7		6,1	19,6	12,9	0,1	10,3	20,5	15,4	1
12.5.2014.	9,9	14,4	12,2	1	7,7	23	15,4		12,3	20,4	16,4	1,4
13.5.2014.	8,6	17,1	12,9	7	5,8	28,1	17		9,3	21,9	15,6	6
14.5.2014	10,5	11	10,8	39	8,2	27,5	17,9		6,6	22	14,3	0,1
15.5.2014.	5,2	9,2	7,2	27	11,5	23,2	17,4	11	10,7	21,8	16,3	
16.5.2014.	6,7	12,7	9,7	11	14,3	23,2	18,8		5,2	11	8,1	26
17.5.2014.	8,8	17,2	13	3	10,6	20	15,3		4,8	17,7	11,3	1
18.5.2014.	10,4	20	15,2	7	13,3	24,4	18,9		2,6	20,2	11,4	
19.5.2014.	8,6	23,5	16,1	0,1	8,9	28,7	18,8		7,3	22,2	14,8	
20.5.2014.	9,7	24,8	17,3		12,2	29,5	20,9		8,6	13	10,8	4
21.5.2014.	9,9	26	18		11	23,2	17,1	1,1	11,6	21	16,3	22
22.5.2014.	9,1	27,9	18,5		15,3	20,4	17,9	1,1	6	24,7	15,4	
23.5.2014.	10,8	28,4	19,6		13	24,3	18,7	8	6,5	28,3	17,4	
24.5.2014.	12,3	27,2	19,8		12,4	18,7	15,6		9,3	19,5	14,4	
25.5.2014.	13,1	25,5	19,3	14	11,5	19,3	15,4	18	9,6	22,2	15,9	8
26.5.2014.	13,3	26,2	19,8	0,3	10,4	18,7	14,6	4	11,2	24,3	17,8	17
27.5.2014.	13,1	26,9	20	4,2	12,7	13,2	13	3	8,2	26,4	17,3	
28.5.2014.	13	24,4	18,7		9	13,8	11,4		9,7	29,3	19,5	
29.5.2014.	11,4	20,4	15,9	1	3,8	20,2	12		12,5	29,8	21,2	
30.5.2014.	13,4	22,1	17,8		6,4	26,3	16,4		12,3	28,7	20,5	
31.5.2014.	12,3	20,1	16,1		7,3	26,3	16,8		15	27,7	21,4	
1.6.2014.	8,9	19,5	14,2		8,8	27,3	18,1		10,4	26,2	18,3	
2.6.2014.	11	18	14,5	3	8,9	27,6	18,3		11,9	24,8	18,4	2,2
3.6.2014.	8,1	21,6	14,9	0,4	9	28,7	18,9		13,6	24	18,8	6
4.6.2014.	7,7	23,6	15,7	1	10,5	29,4	20		11,5	24,1	17,8	0,6
5.6.2014.	7,4	25,8	16,6		15,3	28,4	21,9	0,3	12,4	24,5	18,5	
6.6.2014.	8,7	26,7	17,7		16,1	27,8	22	7	13,4	24,1	18,8	0,5
7.6.2014.	10,2	27,9	19,1		10	27,7	18,9		12,1	24,1	18,1	0,9
8.6.2014.	11,7	29,5	20,6		8,4	27,1	17,8		8,8	23,4	16,1	0,2
9.6.2014.	13,7	30,3	22		7	28	17,5		6,6	26	16,3	
10.6.2014.	13,4	30,7	22,1		15,2	26,6	20,9	6	13,8	24,6	19,2	7,4
11.6.2014.	13,7	31,6	22,7		13,5	28,8	21,2			13,9	24,7	19,3
12.6.2014.	16	30,1	23,1	1,2	14	31,1	22,6		14,9	25,1	20	4,1
13.6.2014.	13,9	28,5	21,2		15,5	32	23,8	2	14,6	22	18,3	12,1
14.6.2014.	16,8	17,5	17,2	12	14,8	32,1	23,5		13,5	24,4	19	15,9
15.6.2014.	14,5	17,3	15,9	8	13,4	31	22,2		13,5	28,2	20,9	1,7
16.6.2014.	13,7	17,2	15,5	7,2	17,2	23,2	20,2	4,1	10	29,3	19,7	
17.6.2014.	14,9	22,5	18,7	10	17,3	20,5	18,9	0,3	15,2	34	24,6	

18.6.2014.	14,7	19	16,9	17	12	17,3	14,7	31	14,7	28	21,4	
19.6.2014.	14,5	19	16,8	3,6	14	24,5	19,3		14,9	26,2	20,6	
20.6.2014.	11,7	23,7	17,7	12	12	17,7	14,9	14	15,2	29	22,1	13,2
21.6.2014.	13	22,2	17,6	8	12,5	17,6	15,1	3	20,4	25	22,7	
22.6.2014.	8,7	27,5	18,1		7,7	23,2	15,5		20	30	25	0,3
23.6.2014.	11	30,7	20,9		7,5	29	18,3		19,8	32,6	26,2	
24.6.2014.	15	29,2	22,1	0,3	13	16	14,5	0,3	19,5	32,7	26,1	
25.6.2014.	15,8	28,8	22,3		7,5	20,7	14,1	0,8	17,4	32,2	24,8	1,3
26.6.2014.	14,1	21	17,6	25,1	10,9	15	13		17,5	29,9	23,7	
27.6.2014.	13,8	24,3	19,1	3	12,5	23,6	18,1	9	17	30	23,5	
28.6.2014.	11	26,4	18,7		14	23,9	19	0,2	15,1	21,5	18,3	8,9
29.6.2014.	11,7	29,9	19,1		15	24	19,5	2	14,4	27,2	20,8	
30.6.2014.	14,5	30	22,3		15	24,9	20	2,2	13,7	28,7	21,2	
1.7.2014.	12,9	24,3	18,6	5	12,4	26	19,2		16	30,4	23,2	
2.7.2014.	11	27,7	19,4		11,2	27,5	19,4		17,4	32	24,7	0,2
3.7.2014.	13,2	22,8	18		13,5	27,8	20,7		17,1	29,5	23,3	
4.7.2014.	9,5	26	17,8		12,3	28,7	20,5		15,8	26	20,9	6,4
5.7.2014.	10	29,4	19,7		12,5	30,5	20,7		11,6	27,6	19,6	
6.7.2014.	15	30,1	22,6		12,7	32,3	22,5		11,3	27,7	19,5	
7.7.2014.	15,3	31,8	23,6		12,9	32,7	22,8		16,8	25,9	21,4	
8.7.2014.	16,8	28	22,4		12,8	34,7	23,8		10,3	27,3	18,8	
9.7.2014.	14,1	29,3	21,7	0,1	17,9	22	20		11,2	31,4	21,3	
10.7.2014.	12,5	25,1	18,8		15,6	25	20,3	0,6	13,7	30	18,8	
11.7.2014.	14,1	21,9	18	4	8	27,5	17,8		13,3	31,4	22,4	
12.7.2014.	15,1	26,5	20,8		9,4	30,5	20		14,4	34	24,2	
13.7.2014.	13,9	26	20		11,7	29,8	20,8		16,9	34,5	25,7	
14.7.2014.	14,8	25,9	20,4	5	16	26,8	21,4	6	16,6	34,2	25,4	
15.7.2014.	14,1	17,3	15,7	1	13,7	30,5	22,1		16,2	20,5	18,4	
16.7.2014.	15	25,2	20,1	12,5	14,8	32	23,4		13,7	20,6	17,2	23,3
17.7.2014.	14,5	26,5	20,3	30	15,6	34,8	25,2		12,5	20,6	16,6	
18.7.2014.	16,4	26,5	21,5	5	17	35,1	26,1		14,8	25,7	20,3	0,3
19.7.2014.	16	28,5	22,3	9	17,5	35,7	26,6		12,7	24,7	18,7	
20.7.2014.	16,3	30	23,2		19,2	34,5	26,9		11	27,2	19,1	
21.7.2014.	17,1	33	25,1		16,5	33,4	25			13	29	21
22.7.2014.	17,9	28	23	1,8	14,6	34,5	24,6		13	32,4	22,7	
23.7.2014.	15,8	25,9	20,9	0,2	17,3	34,8	26,1		15,6	33,5	24,6	
24.7.2014.	16,8	27,4	22,1	3	15,1	33,4	24,3		17	32,4	24,7	
25.7.2014.	16,2	27,8	22		12	35,3	23,7		18,4	30,3	24,4	
26.7.2014.	16,8	29,3	23,1	0,2	18,5	27,1	22,8		15,7	25	20,4	1,7
27.7.2014.	18	28	23	0,3	13,5	33,3	23,4		17,5	29,9	23,7	4,9
28.7.2014.	17,6	24,5	21,1	21	18	29	23,5	2	17,2	30,6	23,9	
29.7.2014.	17,5	29,1	23,3	2	14,2	34,7	24,5		16,5	28,7	22,6	35,6
30.7.2014.	17,7	28,3	23		16,2	31,2	23,7		18,3	30,3	24,3	

31.7.2014.	16,4	24	20,2	1	19,2	24,4	21,8		17,1	31,4	24,3	
1.8.2014.	15,9	23	19,5	7	15,4	28,2	21,8	6	14,7	29,1	21,9	
2.8.2014.	16,5	28,3	22,4	6	15,1	33,3	24,2		15,9	24,2	20,1	26,1
3.8.2014.	18,1	30,6	24,4		17,2	29,5	23,4	2,1	13,4	26,3	19,9	
4.8.2014.	16,1	28,6	22,4	9	17,6	30,1	23,9	1,1	12,7	28,3	20,5	
5.8.2014.	17,4	27,6	22,5		16,6	33	24,8		14,7	31,7	23,2	
6.8.2014.	16,2	26	21,1	22	15,6	33,1	24,4		17,6	20,5	19,1	
7.8.2014.	17,6	25	21,3	10	15,3	34	24,7		16,8	18,6	17,7	43,6
8.8.2014.	17,5	25,1	21,3	9	13	32,4	22,7		13,4	21,3	17,4	14,5
9.8.2014.	16,6	29,3	23	7	11,5	31,8	21,7		14,8	26,7	20,8	7,7
10.8.2014.	17,1	30,5	23,8		9,4	32,4	20,9		16,6	29,5	23,1	
11.8.2014.	18,5	32,2	25,4	0,3	12,9	32,8	22,9		13,3	16,9	15,1	45,3
12.8.2014.	17,4	32,5	25		11,5	35	23,3		13,3	21,3	17,3	0,5
13.8.2014.	18,5	34	26,3		15,7	35,5	25,6		7,8	23	15,4	
14.8.2014.	14,5	34,4	24,5		14,5	35	24,8		9,3	25	17,2	
15.8.2014.	17,1	24,4	20,8		13,8	34,5	24,2		10,3	27,8	19,1	
16.8.2014.	15,8	24	19,9	1	14,5	33,2	24,8		13	27,9	20,5	
17.8.2014.	14,6	22,2	18,4	9	17,2	27	22,1	3	14,8	29,2	22	
18.8.2014.	10,5	25,5	18		12,2	28,4	20,3		16,5	27	21,8	1,3
19.8.2014.	12,1	28,3	20,2		15	29	22	0,5	15,4	28,5	22	7,2
20.8.2014.	14,4	28,5	21,5		16,3	25,1	20,7	10	16,2	26,9	21,6	22
21.8.2014.	14,9	25,1	20		15	20,1	17,6	10,1	16	32	24	
22.8.2014.	16,5	26,2	21,4	8	15,2	19,1	17,6	6	17,6	20,8	19,2	3,8
23.8.2014.	15,7	28,5	22,1	4,2	15,3	25	17,6		14,5	17,4	16	2,6
24.8.2014.	16	24	20	2	11,5	29,4	20,5		16,1	23,3	19,7	5,8
25.8.2014.	14,1	22,4	18,3	1	14,8	26,6	20,7		15,2	26,7	21	
26.8.2014.	11,3	29,3	20,3		15	28,7	21,9		15,6	28	21,8	
27.8.2014.	13,1	26,6	19,9		15,4	33,3	24,4		14,6	26,9	20,8	
28.8.2014.	12,2	22	17,1	3,3	13,5	34,3	23,9		12,5	28	20,3	
29.8.2014.	9,3	23,7	16,5		14,7	34,3	24,5		13,2	29,7	21,5	
30.8.2014.	10,2	26,8	18,5		13,1	34,1	23,6		14,5	28,4	21,5	
31.8.2014.	15,2	26,6	20,9		11,4	35,5	23,5		14,6	27	20,8	



## 9. BIOGRAFIJA

Biljana (Dušan) Mirković, rođena je 14. marta 1988. godine u Valjevu. Osnovnu školu i srednju Valjevsku gimnaziju završila je u Valjevu. Osnovne akademske studije na Poljoprivrednom fakultetu, smer fitomedicina upisuje školske 2007/2008 godine i na dan 09.09.2011. godine brani završni rad, čime je završila osnovne akademske studije sa prosečnom ocenom 9,83 (devet 83/00). Proglašena je za studenta generacije 2007/2011 Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Školske 2011/2012 upisuje master akademske studije na istom fakultetu, smer fitomedicina. Dana 21.09.2012. godine odbranila je master rad, čime je završila master akademske studije sa prosečnom ocenom 10,00 (deset, 00/100). Doktorske akademske studije na istom fakultetu, studijski program poljoprivredne nauke: modul fitomedicina, upisala je školske 2012/2013 godine. Položila je sve ispite predviđene programom doktorskih akademskih studija sa prosečnom ocenom 9,93 (devet 93/00).

Kao najbolji student Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Beogradu dobila je više priznanja, pohvalnica, plaketa, nagrada. Zadužbina Nikole Spasić je pohvaljuje i nagrađuje kao najboljeg studenta II godine Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu za školsku 2008/2009 godinu; Skupština grada Jagodine je 20. februara 2011. godine nagrađuje kao najboljeg studenta Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu putovanjem u Pariz na 48. Međunarodni Sajam Poljoprivrede; Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu povodom dana fakulteta je pohvaljuje i nagrađuje kao najboljeg studenta IV godine odseka za fitomedicinu; Kao student završne godine osnovnih akademskih studija školske 2010/2011 godine bila je stipendista Fonda za mlade talente Republike Srbije; Povodom Dana Univerziteta u Beogradu dodeljena joj je Povelja za izuzetan uspeh tokom studiranja, kao najboljem studentu generacije 2007/2011 Poljoprivrednog fakulteta.

Od 2013. godine kao stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije uključena je u projekat III46008: „Razvoj integrisanih sistema upravljanja štetnim organizmima u biljnoj proizvodnji sa ciljem prevazilaženja rezistentnosti i unapređenja kvaliteta i bezbednosti hrane“. Od februara 2014. godine do januara 2016. godine, deo programa doktorske disertacije realizuje u Laboratoriji za primenjenu fitopatologiju Instituta za pesticide i zaštitu životne sredine, Beograd.

Školske 2014/2015 i 2015/2016 bila je angažovana na izvođenju vežbi na osnovnim studijama na predmetima: „Opšta fitofarmacija“ i „Fitofarmacija-Fungicidi“ na Poljoprivrednom fakultetu u Beogradu.

Biljana Mirković je kao autor ili koautor objavila 16 naučnih radova, od čega su dva rada u međunarodnom časopisu sa SCI liste.

Član je Društva za zaštitu bilja Srbije. Govori engleski jezik.

Nezaposlena.

## Prilog 1.

Potpisana **Biljana Mirković**

Broj indeksa **12/4**

### Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

**”Efekti fungicida na *Didymella applanata* (Niesl.) Sacc. *in vitro* i mogućnost hemijske zaštite maline”**

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Prilog 2.**

**Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije  
doktorskog rada**

Ime i prezime autora **Biljana Mirković**

Broj indeksa **12/4**

Studijski program **Poljoprivredne nauke Modul: Fitomedicina**

Naslov rada **”Efekti fungicida na *Didymella applanata* (Niessl.) Sacc. *in vitro*  
i mogućnost hemijske zaštite maline”**

Mentor **prof. dr Milan Stević, vanredni profesor**  
Drugi mentor **dr Brankica Tanović, viši naučni saradnik**

Potpisana **Biljana Mirković**

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

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

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

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

### Prilog 3.

#### Izjava o korišćenju

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

**"Efekti fungicida na *Didymella applanata* (Niessl.) Sacc. *in vitro* i mogućnost hemijske zaštite maline"**

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim predlozima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo
2. Autorstvo – nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_