

UNIVERZITET U BEOGRADU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Sanja P. Živković

**KARAKTERIZACIJA *Eutypa lata*,
PROUZROKOVAČA ODUMIRANJA
ČOKOTA VINOVE LOZE U SRBIJI I
OSETLJIVOST SORTI**

Doktorska disertacija

Beograd, 2019.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF AGRICULTURE

Sanja P. Živković

**CHARACTERIZATION OF
Eutypa lata, CAUSAL AGENT OF
GRAPEVINE DIEBACK IN SERBIA
AND SUSCEPTIBILITY OF VARIETIES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019.

Komisija za ocenu i odbranu:

Mentor: dr Milan Ivanović, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu – Poljoprivredni fakultet

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

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

dr Mila Grahovac, docent
Univerzitet u Novom Sadu – Poljoprivredni fakultet

dr Darko Jevremović, naučni saradnik
Institut za voćarstvo, Čačak

dr Slavica Todić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Poljoprivredni fakultet

Datum odbrane: _____

ZAHVALNICA

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

Zahvalna sam dr Aleksandri Bulajić, redovnom profesoru na korisnim savetima datim tokom pregleda rukopisa.

Zahvalnost za veliku podršku, nesebično prenetom znanju i pomoći pri realizaciji disertacije dugujem dr Vojislavu Trkulji, redovnom profesoru.

Zahvalnost dugujem dr Tanji Vasić, naučnom saradniku na velikoj i bezrezervnoj pomoći i podršci prilikom izvođenja eksperimenata, izrade i finalizacije ove disertacije.

Zahvalna sam dr Goranu Delibašiću, redovnom profesoru na korisnim sugestijama i savetima koji su doprineli kvalitetu ove disertacije.

Zahvaljujem dr Darku Jevremoviću, naučnom saradniku na konstantnoj pomoći, korisnim savetima i podršci koju mi je pružio tokom celokupnog perioda izrade disertacije.

Zahvalnost na veoma korisnim savetima koji su doprineli kvalitetu ove disertacije dugujem dr Slavici Todić, redovnom profesoru i dr Mili Grahovac, docentu.

Zahvaljujem Bojanu Anđelkoviću, diplomiranom biologu za pomoć oko tehničke obrade ove doktorske disertacije.

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

KARAKTERIZACIJA *Eutypa lata*, PROUZROKOVAČA ODUMIRANJA ČOKOTA VINOVE LOZE U SRBIJI I OSETLJIVOST SORTI

REZIME

U periodu od 2004. do 2012. godine, na teritoriji Srbije, uočeni su simptomi odumiranja čokota vinove loze. Simptomi se najpre ispoljavaju u vidu sitnih, hlorotičnih i nekrotičnih pega po obodu listova, deformacijom listova, pojavom skraćenih lastara, često sa tzv. cik-cak porastom internodija. Vremenom dolazi do delimičnog ili potpunog sušenja čokota vinove loze.

Primenom standardnih fitopatoloških metoda iz simptomatičnih biljaka vinove loze dobijeno je 47 izolata *Eutypa* sp. iz 14 lokaliteta. Izolati potiču iz sledećih sorti vinove loze: Kaberne sovinjon, Rkaciteli, Prokupac, Rizling rani, Burgundac crni, Italijanski rizling, Sovinjon, Šardone, Frankovka i Kardinal. Patogenost izolata proverena je veštačkom inokulacijom zdravih reznica vinove loze sorte Kaberne sovinjon. Svi proučavani izolati prouzrokuju nekrozu tkiva oko mesta inokulacije, hlorozu i deformaciju listova kao i pojavu sitnih, nekrotičnih pega po obodu liski koji vremenom opadaju. Inokulisane reznice zaostaju u porastu dobijajući žbunast izgled sa cik-cak porastom internodija.

Identifikacija proučavanih izolata *Eutypa* sp. izvršena je na osnovu morfoloških osobina i prisustvo piknida u kulturi. Piknidi su loptastog ili nepravilnog oblika, tamnosmeđe do crne boje, veličine 0,5-1 mm. Iz piknida se izlučuje konidijalna masa krem do blede narandžaste boje. Konidije su jednoćelijske, neseptirane, hijalinske, izdužene i umereno krive sa spljoštenom osnovom, dimenzija $36,10 \mu\text{m} \times 1,71 \mu\text{m}$. Različite hranljive podloge i tipovi svetlosti imaju veliki uticaj na sporulaciju proučavanih izolata *Eutypa* sp. Najintenzivnija sporulacija svih proučavanih i kontrolnih izolata odvijala se na PDA podlozi, zatim na MA, GWA i WA, dok na podlogama YA i TA ni nakon 3 meseca ne dolazi do sporulacije. Izlaganje kultura režimu od 24 h UV svetlosti se pokazalo kao najpogodnije za razvoj konidija, potom 12 h UV i 12 h tame, dok je najnepovoljniji režim svetlosti za razvoj konidija je 12 h svetla i 12 h tame. Pročavane kulture ne formiraju teleomorfni stadijum.

Korišćenjem prajmera ITS1-ITS4, koji umnožava sekvencu ITS regiona ribozomalne DNK, Metodom lančane reakcije polimeraze (PCR), kod svih proučavanih

izolata, kao i kod kontrolnih izolata dobijen je amplikon veličine 574 bp. Primenom para prajmera T1/Bt2b, koji omogućuje amplifikaciju proteinskog gena β -tubulin, umnožen je fragment veličine 780 bp kod svih proučavanih i kontrolnih izolata. Amplifikacijom proteinskog nuklearnog gena RPB2, korišćenjem prajmera RPB2-7F-RPB2-11aR, umnožen je fragment očekivane veličine oko 820 bp kod svih proučavanih i referentnih izolata iz međunarodnih kolekcija. Za specifičnu detekciju *Eutypa* sp. primenjen je specifični par prajmera Lata 1-Lata 2.2. Kod svih proučavanih i kontrolnih izolata umnožen je amplikon očekivane veličine od oko 385 bp. Takođe, za specifičnu detekciju *Eutypa* sp. primenjena je RFLP-PCR metoda sa parom prajmera ITS1-ITS4, gde su dobijeni PCR produkti tretirani sa *AluI* restrikcionim enzimom.

Za filogenetske analize *Eutypa* sp., patogena vinove loze, korišćene su nukleotidne sekvence tri različita genomna regiona: ITS rDNK, proteinski nuklearni gen β -tubulin i RPB2 gen. U rekonstruisanim filogenetskim stablima svi ispitivani izolati dobijeni tokom izrade ove doktorske disertacije nalaze u klasteru sa izolatima *E. lata* iz različitih delova sveta.

U eksperimentima ispitivanja osetljivosti 27 različitih sorti vinove loze uočene su razlike u intenzitetu pojave nekroze na listovima nakon veštačkih inokulacija izolatima *E. lata*. Od testiranih domaćih i inostranih sorti vinove loze, u uslovima postavljenog eksperimenta najveću otpornost prema izolatima ispoljile su lokalne sorte Tamjanika, Drenak i Prokupac dok su sorte Afuz ali i Radmilovački muskat pokazale veliku osetljivost.

Na osnovu patogenih, morfoloških i molekularnih odlika proučavanih izolata utvrđeno je da odumiranje čokota vinove loze u Srbiji izaziva vrsta iz roda *Eutypa*: *E. lata*.

Ključne reči: vinova loza, odumiranje čokota, *Eutypa lata*, patogenost, morfologija, odgajivačke odlike, molekularna detekcija i identifikacija, osetljivost sorti.

Naučna oblast: Biotehničke nauke

Uža naučna oblast: Fitopatologija

UDK: 634.8:632.482(497.11)(043.3)

CHARACTERIZATION OF *Eutypa lata*, CAUSAL AGENT OF GRAPEVINE DIEBACK IN SERBIA AND SUSCEPTIBILITY OF VARIETIES

ABSTRACT

During the period from 2004 to 2012, symptoms of grapevine dieback were observed in Serbia. Symptoms initially appear as small, chlorotic and necrotic spots along the rim of the leaves, deformation of leaflets and the appearance of shortened shoots, often with the so-called zig-zag internodes. Over time, partial or complete dying of the vines develops.

Standard phytopathological methods were used and 47 isolates were obtained from symptomatic grapevine plants from 14 localities. The isolates originate from the following cultivars: Cabernet Sauvignon, Rkaciteli, Prokupac, Riesling early, Pinot noir, Italian Riesling, Sauvignon, Chardonnay, Franconien noir and Cardinal. Pathogenicity of isolates was tested by artificial inoculation of healthy grapevine cuttings cv. Cabernet Sauvignon. All studied isolates cause tissue necrosis around the site of inoculation, chlorosis and deformation of the leaves, along with the appearance of tiny, necrotic spots on the periphery of the leaf that falls off over time. Inoculated cuttings are stunted, dwarf-like with zig-zag internodes.

Identification of the studied isolates was performed on the basis of morphological properties and the presence of pycnidia in the culture. Pycnidia are spherical or irregular shape, ranging from dark brown to black, measuring 0,5-1 mm. Pycnidia exude conidial mass pale brown to pale orange color. Conidia are single celled, non-septate, hyaline, elongated and curved with flat basis, measuring $36,10 \mu\text{m} \times 1,71 \mu\text{m}$. Different artificial mediums and types of light have major influence on sporulation of tested isolates *Eutypa* sp. Most intense sporulation of all studied and control isolates was on PDA medium, followed by MA, GWA and WA, while on YA and TA mediums no sporulation occurred after 3 months. Exposure of cultures to 24h UV light proved to be the most suitable for the development of conidia, followed by 12h UV and 12h darkness, while the most unfavorable regime of light for the development of conidia was 12h light and 12h darkness. Tested cultures of *Eutypa* sp. did not form a teleomorphic stage.

With primer pair ITS1-ITS4, which amplify the ITS region of the ribosomal DNA, in polymerase chain reaction (PCR) amplicons of 574 bp were obtained in all of the studied isolates, as well as in the control isolates. With primer pair T1/Bt2b, which amplify protein nuclear gene of β -tubulin, a 780-bp fragment was amplified in all studied and control isolates. Amplification of the protein nucleus gene RPB2 with primer pair RPB2-7F-RPB2-11aR resulted in amplicons of the expected size of about 820 bp in all the studied and reference isolates from international collections. For specific detection of *Eutypa* sp. a specific primer pair Lata 1-Lata 2.2 was applied and amplification of the expected size of about 385 bp was observed in all isolates. In addition, for specific detection of *Eutypa* sp. RFLP-PCR method was used with ITS1-ITS4 primer pair and RFLP patterns were determined after digestion with *AluI* restriction enzyme.

Nucleotide sequence analysis of three genome regions: ITS region of rDNA, protein nuclear gene β -tubulin and RPB2 gene, were used for phylogenetic analysis. In reconstructed phylogenetic trees, all studied isolates from this doctoral dissertation clustered with *E. lata* isolates from different parts of the world.

In experiments of susceptibility of 27 different varieties of grapevine, differences in the intensity of necrosis on the leaves was observed after artificial inoculations with *E. lata*. In our experiments, among domestic and foreign grapevine varieties, the highest resistance to isolates was demonstrated by local varieties Tamjanika, Drenak and Prokupac, while the cultivars Thompson seedless and Radmilovački muskat demonstrate great susceptibility.

Based on pathogenic, morphological and molecular features of studied isolates it has been confirmed that grapevine dieback in Serbia is caused by the species from the genus *Eutypa*: *E. lata*.

Key words: grapevine, vine tree dieback, *Eutypa lata*, pathogenicity, morphology, cultural features, molecular detection and identification, cultivar susceptibility.

Scientific area: Biotechnical Sciences

Narrow scientific field: Phytopathology

UDC: 634.8:632.482(497.11)(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Bolesti vinove loze.....	3
2. PREGLED LITERATURE	8
2.1. Predstavnici roda <i>Eutypa</i>	8
2.2. Istorijat pojave, nomenklatura i mesto roda <i>Eutypa</i> u sistematici gljiva	9
2.2.1. Istorijat, klasifikacija i taksonomija roda <i>Eutypa</i>	9
2.2.2. Taksonomski status vrste <i>Eutypa lata</i>	13
2.3. Domaćini <i>Eutypa lata</i>	15
2.4. Rasprostranjenost i ekonomski značaj odumiranja čokota vinove loze.....	17
2.5. Ciklus razvoja <i>Eutypa lata</i> na vinovoj lozi.....	19
2.6. Mere kontrole odumiranja čokota vinove loze	21
3. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	24
4. MATERIJAL I METODE RADA.....	26
4.1. Prikupljanje biljnog materijala i izolacija gljiva.....	26
4.2. Dobijanje čistih kultura, monosporijalnih izolata i njihovo čuvanje	27
4.3. Provera patogenosti i izbor izolata za dalja istraživanja.....	27
4.4. Proučavanje morfoloških odlika izolata <i>Eutypa</i> sp.....	30
4.4.1. Makroskopske morfološke odlike ispitivanih izolata.....	31
4.4.2. Mikroskopske morfološke odlike ispitivanih izolata.....	31
4.4.3. Formiranje teleomorfno stadijuma.....	32
4.5. Proučavanje odgajivačkih odlika izolata <i>Eutypa</i> sp.	33
4.5.1. Uticaj različitih podloga na razvoj i sporulaciju proučavanih izolata <i>Eutypa</i> sp.....	33
4.5.2. Uticaj svetlosti na razvoj i sporulaciju proučavanih izolata <i>Eutypa</i> sp...	34
4.6. Molekularna detekcija i identifikacija	35
4.6.1. Ekstrakcija DNK.....	35
4.6.2. Lančano umnožavanje fragmenata nukleinske kiseline	36
4.6.3. Detekcija i identifikacija primenom PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism).....	38
4.6.4. Vizuelizacija i analiza produkata PCR reakcije.....	38
4.6.5. Sekvenciranje dela genoma odabranih izolata.....	39
4.6.6. Molekularna identifikacija i karakterizacija	39
4.7. Osetljivost različitih sorti vinove loze prema izolatima <i>Eutypa lata</i>	45

5. REZULTATI	47
5.1. Simptomi bolesti na biljkama u polju	47
5.2. Izolacija patogena i dobijanje monosporijalnih kultura.....	51
5.3. Izbor izolata za dalja istraživanja.....	52
5.4. Proučavanje patogenih osobina izolata <i>Eutypa</i> sp.	52
5.5. Morfološke odlike proučavanih izolata <i>Eutypa</i> sp.....	63
5.5.1. Makroskopske morfološke odlike ispitivanih izolata.....	63
5.5.2. Mikroskopske morfološke odlike ispitivanih izolata	65
5.5.3. Reproduktivne tvorevine teleomornog stadijuma ispitivanih izolata <i>Eutypa</i> sp.....	75
5.6. Odgajivačke odlike ispitivanih izolata <i>Eutypa</i> sp.	75
5.6.1. Uticaj različitih podloga na radijalni porast kolonija i sporulaciju proučavanih izolata <i>Eutypa</i> sp.....	75
5.6.2. Uticaj svetlosti na razvoj i sporulaciju proučavanih izolata <i>Eutypa</i> sp... 85	
5.7. Molekularna detekcija i identifikacija proučavanih izolata	90
5.7.1. Molekularna identifikacija izolata <i>Eutypa</i> sp. poreklom iz vinove loze. 94	
5.7.2. Molekularna karakterizacija <i>Eutypa lata</i> patogena vinove loze	96
5.8. Osetljivost različitih sorti vinove loze prema izolatima <i>Eutypa lata</i>	101
6. DISKUSIJA	126
6.1. Simptomi odumiranja čokota vinove loze u vinogradima	126
6.2. Patogene osobine izolata <i>Eutypa lata</i>	128
6.3. Morfološke odlike izolata <i>Eutypa lata</i>	131
6.3.1. Makroskopske morfološke odlike proučavanih izolata <i>Eutypa lata</i>	131
6.3.2. Mikroskopske morfološke odlike proučavanih izolata <i>Eutypa lata</i>	132
6.3.3. Formiranje teleomornog stadijuma.....	134
6.3.4. Odgajivačke odlike proučavanih izolata <i>Eutypa lata</i>	135
6.4. Molekularna detekcija i identifikacija <i>Eutypa lata</i> poreklom iz vinove loze . 136	
6.4.1. Molekularna karakterizacija <i>Eutypa lata</i> poreklom iz vinove loze	145
6.5. Osetljivost različitih sorti vinove loze prema proučavanim izolatima <i>Eutypa lata</i>	149
7. ZAKLJUČAK.....	154
8. LITERATURA	156
BIOGRAFIJA.....	171

1. UVOD

Vinova loza je višegodišnja biljka koja ima jasno definisane vegetativne i generativne organe. U vegetativne organe spadaju koren, stablo i list, a u generativne cvast, cvet, grozd, bobica i semenska. Najmlađe delove stabla predstavljaju zeleni lastari ili jednogodišnji lastari sa kojih u jesen opadaju listovi. Oni se razvijaju iz okaca i zaperkovi pupoljaka. U toku razvoja i porasta lastara na njemu se istovremeno razvijaju i razni drugi organi kao što su listovi, okca, zaperkovi pupoljci, zaperkovi lastari, cvasti, rašljike, grozdovi i bobice. Kod vinove loze je pravilo da je rodni lastar samo onaj jednogodišnji zdrvenjeni lastar koji se nalazi na dvogodišnjem delu loze. Lastar u toku jedne vegetacije može da dostigne različitu dužinu, i to od 1 do 10 m, što zavisi od bujnosti sorte, klimatskih i zemljišnih uslova, kao i od toga da li se zalama ili pušta da slobodno raste (**Avramov, 1991**).

Vinova loza (*Vitis vinifera* L.) u Srbiji se uspešno gaji u brojnim vinogradarskim regionima. U našoj zemlji zastupljen je veliki broj sorti od najranijih do najkasnijih perioda sazrevanja (**Avramov, 1991**).

Rod *Vitis* deli se na dva odeljka, *Vitis* (*Euvtis*) i *Muscadina*. Najpoznatija je *Muscadina rotundifolia* jer je otporna na brojne patogene i uglavnom se koristi kao podloga za kalemljenje (**Galet and Morton, 1994**).

Vrste vinove loze poreklom iz severne Amerike imaju veoma važnu ulogu u genetskom poboljšavanju sorti vinove loze širom sveta. Ove vrste odlikuju se otpornošću na niske temperature kao i na korenovu vaš (*Daktulosphaera vitifoliae*), pepelnicu i plamenjaču za razliku od evropskih sorti.

Azijske vrste vinove loze (*Vitis amurensis*, *V. davidii*, *V. armata*, *V. romanetii*, *V. piasezkii*, *V. coignetiate*) poseduju različite nivoe osetljivosti na korenovu vaš, pepelnicu, plamenjaču i crnu trulež. *Vitis amurensis* potiče iz severoistočne Kine i uglavnom se koristi za stvaranje hibrida tolerantnih na niske temperature (**Walker, 2015**).

Najčešće gajena Evropska vrsta iz roda *Vitis* u svetu je *Vitis vinifera* L., koja se koristi za proizvodnju vina i stonog grožđa (**Walker, 2015**).

Vinovu lozu (*Vitis* sp.) su na Balkanu prvi počeli da gaje Rimljani. U srednjem veku na Balkanu se naglo proširilo vinogradarstvo, uglavnom zahvaljujući manastirima.

U XIX veku u Evropu je iz Severne Amerike preneti korenova vaš (*Dactylophaera vitifoliae*, stari naziv *Phylloxera vastatrix*) koja je ubrzo potpuno uništila vinovu lozu koja je gajena na sopstvenom korenu. Jedino su opstali vinogradi koji su zasnovani na živom pesku, gde korenova vaš nije mogla da opstane. Takođe, iz Amerike su prenete bolesti kao što su pepelnica (*Erysiphae (Uncinila) necator* Schwin. (1834)) i plamenjača (*Plasmopara viticola* (Berk. & M.A. Curtis) Berl. & De Toni (1888)). Da bi se prevazišla kriza koju je izazvala korenova vaš, kao zaštitna mera protiv ove štetočine, počela je primena kalemljenja domaćih loznih kalemova na otporne podloge donete iz Amerike. Protiv novih bolesti počela je i primena hemijskih preparata. Primenom ovih mera, vinogradarstvo u Evropi počelo je da se obnavlja (**Avramov, 1991**).

U pogledu klimatskih uslova za gajenje, vinova loza najbolje uspeva u umereno kontinentalnim, subtropskim i mediteranskim uslovima. Od klimatskih faktora na vinovu lozu najviše utiču toplota, sunčeva svetlost, vlaga i vetar. Za kretanje lastara vinove loze neophodne su minimalne temperature od 10 do 20 °C. Intezivan porast i obrazovanje okaca odvija se na 25 do 30 °C, dok su optimalne temperature za sazrevanje bobica od 28 do 32 °C. Najpogodnija zemljišta za gajenje vinove loze su skeletna zemljišta, deluvijum, aluvijum, živi pesak, crvenica, smonica, černozem, srednji i blagi podzoli i gajnjače. Najbolji kvalitet grožđa postiže se na svetlo obojenim zemljištima, a slabiji na tamno obojenim zemljištima. Međutim, najveći porast i bujnost vinova loza postiže na tamno obojenim zemljištima. U pogledu kiselosti zemljišta vinova loza uspeva na slabo kiselim, neutralnim i slabo alkalnim zemljištima (pH 5,5 do 7,2) (**Avramov, 1991**).

Značaj vinogradarstva se ističe zbog uloge koju grožđe ima u ishrani stanovništva. Ono se danas tretira kao najkompletnije voće, jer pored šećera, kiselina i mineralnih materija, sadrži i kompleks vitamina, koji imaju veliku ulogu u ishrani, lečenju i održavanju zdravlja ljudi. Plodovi vinove loze mogu se koristiti za proizvodnju vina i žestokih alkoholnih pića. Takođe se koriste i u prehrambeno-prerađivačkoj industriji za proizvodnju kompota, raznih nefermentisanih sokova, smrznutog koncentrata za sokove, kao u ishrani u svežem stanju tokom cele godine. Osim potrošnje grožđa u svežem stanju, najveći deo grožđa se preradi u vino, koje treba tretirati više kao hranu, a manje kao alkoholno piće (**Avramov, 1991**).

U Srbiji ukupan prosečan prinos grožđa u 2016. iznosio je blizu 145.829,00 tona. U našoj zemlji oko 21.201 ha nalazi se pod vinovom lozom. Ukupan prosečan prinos za 2016. iznosio je 6.900 kg/ha (**Republički zavod za statistiku, 2016**). U svetu se vinova loza gaji na približno 7,5 miliona hektara. Ova biljna kultura uspeva i u uslovima tropske klime, ali najveći broj vinograda je u umerenom klimatskom području. Prema podacima iz 2012. godine najveći broj vinograda je u Evropi (56%). Najveće površine pod vinogradima u svetu su u Španiji, Francuskoj, Italiji, Kini i Turskoj. Potom sledi SAD sa oko 10% od ukupnog broja vinograda u svetu (**Wilcox, 2015**).

Prema rejonizaciji vinogradarskih geografskih proizvodnih područja Srbije, vinorodna Srbija obuhvata teritoriju cele Republike Srbije nadmorske visine do 800 m, kao i područja iznad ove nadmorske visine ukoliko se ona nalaze na listi rejoniranih područja sa većom nadmorskom visinom i deli se na tri regiona: region Centralna Srbija, region Vojvodina i region Kosovo i Metohija. U okviru ova tri regiona nalaze se 22 rejon sa 77 vinogorja i više vinogradarskih oaza (**Ivanišević i sar, 2015**). Od vinskih sorti vinove loze najzastupljenije su sledeće: Šardone, Sovinjon, Burgundac beli, Rajnski rizling, Italijanski rizling, Burgundac sivi, Kaberne sovinjon, Merlo, Prokupac, Game crni, Frankovka, Rkaciteli i ostale. Od stonih sorti gaje se Muskat hamburg, Afuz ali, Šasla, Beogradska besemena, Crveni drenak, Kardinal i ostale (**Ivanišević i sar., 2015**).

1.1. Bolesti vinove loze

Vinova loza je višegodišnja biljka koja je izložena napadu brojnih biljnih patogena, koji u zavisnosti od sorte, prirode prouzrokovaca, kao i faktora spoljne sredine, konstantno utiču na prinos i kvalitet grožđa.

Među fitopatogenim gljivama prouzrokovacima bolesti lista i ploda ističu se vrste *Erysiphae necator* - prouzrokovac pepelnice vinove loze (**Pearson, 1994**), *Plasmopara viticola* - prouzrokovac plamenjače vinove loze (**Lafon and Clerjeau, 1994**), *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (1945) - prouzrokovac sive truleži grožđa (**Bulit and Dubos, 1994**), *Guignardia bidwellii* (Ellis) Viala & Ravaz (1982) - prouzrokovac crne truleži grožđa (**Ramsdell and Milholland, 1994**), *Phomopsis*

viticola (Sacc.) Sacc. (1915) - prouzrokovatelj crne pegavosti (ekskorioza) vinove loze (**Mostert et al., 2001; Ivanović i Ivanović, 2005b**), *Pseudopeziza tracheiphila* Müll.-Thurg. (1903) - prouzrokovatelj crvenila lišća vinove loze (**Schüepp, 1994**), *Monilinia fructigena* Honey (1945) - prouzrokovatelj truleži grožđa (**Stojanović i Kostić, 1958**), *Phoma glomerata* (Corda) Wollenw. & Hochapfel (1936) - prouzrokovatelj paleži cvasti i grozdica vinove loze, *Coniella diplodiella* (Speg.) Petr. & Syd. (1927) - prouzrokovatelj bele truleži grožđa (**Bisiach, 1994**), *Glomerella cingulata* (Stone.) Spauld i Schr. (1903) - prouzrokovatelj truleži zrelog grožđa (**Milholland, 1994**) i druge (loc.cit. **Ivanović i Ivanović, 2002**).

Među fitopatogenim gljivama, prouzrokovateljima bolesti stabla ističu se vrste *Eutypa lata* (Pers.) Tul.&C. Tul. (1863) – prouzrokovatelj odumiranja čokota (eutipoza) vinove loze (**Munkvold, 2001; Ivanović i Ivanović, 2005a**), *Stereum hirsutum* (Willd.) Pers. (1800) i *Phelinus igniarius* (L.) Quél. (1886) - prouzrokovatelji crne pegavosti (eska) (**Mugnai et al., 1999; Feliciano et al., 2004; Ivanović i Ivanović, 2005c; Sánchez-Torres et al., 2008; Essakhi et al., 2008**), *Botryosphaeria stevensi* Shoemaker (1964), *B. rhodina* Berk. & M.A. Curtis (1970) - prouzrokovatelji crne truleži krakova vinove loze (**Lehoczky, 1994; Van Niekerk et al., 2004; Gubler et al., 2005; Úrbez-Torres et al., 2006; Epstein et al., 2008; Úrbez-Torres et al., 2009; Úrbez-Torres et al., 2012**), *B. obtusa* (Schwein.) Shoemaker (1964) - prouzrokovatelj crnog raka vinove loze (**Ivanović i Ivanović, 2002; Van Niekerk et al., 2004; Úrbez-Torres et al., 2006; Epstein et al., 2008; Úrbez-Torres et al., 2009; Úrbez-Torres et al., 2012**) i druge.

Među fitopatogenim pseudogljivama i gljivama, prouzrokovateljima bolesti korena, ističu se vrste *Armillaria mellea* (Vahl) P. Kumm. (1871) - prouzrokovatelj truleži korena drvenastih biljaka (**Raabe, 1994**), *Verticillium dahliae* Kleb. (1913) - prouzrokovatelj uvenuća biljaka (**Schnathorst and Goheen, 1994**), *Rosellinia necatrix* Berl. Ex Prill. (1904) - prouzrokovatelj bele truleži korena (**Raabe, 1994**), *Phytophthora cactorum* (Lebert & Cohn) J. Schrot (1886), *P. cryptogea* Pethybr. & Laff. (1919), *P. nicotianae* Breda de Haan (1896) i *P. megasperma* Drechsler (1931) - prouzrokovatelji truleži korena i korenovog vrata voćaka (**Wilcox and Mircetich, 1994**), *Roesleria hypogaea* Thum. & Pass. (1877) - prouzrokovatelj truleži korena vinove loze (**Gärtel, 1994**) i druge.

U prokariotske organizmima koji mogu da parazitiraju vinovu lozu ubrajaju se bakterije i fitoplazme. Do danas je na vinovoj lozi opisano nekoliko ekonomski značajnih bakterija i fitoplazmi (Pearson, 1994). Najznačajniji prouzrokoivači bakterioza vinove loze su: *Agrobacterium tumefaciens* - prouzrokoivač raka korena i korenovog vrata (Šutić, 1995), *Xylophilus ampelinus* - prouzrokoivač bakteriozne plamenjače vinove loze (Šutić, 1995), *Xylella fastidiosa* - prouzrokoivač Pirsove bolesti vinove loze (Šutić, 1995; Arsenijević, 1997), *Flavescence doree* - prouzrokoivač zlatastog žutila i crvenila lišća vinove loze (Šutić, 1995; Duduk et al., 2003), *Phytoplasma solani* – crnilo drveta vinove loze (Ivanović i Ivanović, 2017) i drugi.

Među virusima i viroidima patogenim za vinovu lozu u međunarodnoj literaturi se kao ekonomski značajni navode virus lepezavosti lišća vinove loze (*Grapevine fanleaf virus*, GFLV), kod nas poznat kao virus infektivne degeneracije vinove loze (Šutić, 1995; Ivanović i Ivanović, 2017), virus uvijenosti lista vinove loze (*Grapevine leaf roll virus*, GLRaV), virusi jamičavosti drveta vinove loze (*Vitivirus*, *Foveavirus* i *Rugose wood complex*, RW); virus mozaika vinove loze (*Grapevine vein mosaic*, GVM) (Ivanović i Ivanović, 2017).

U Srbiji je opisan veći broj virusa na vinovoj lozi, a najznačajniji je virus uvijenosti lista, zastupljen u formi tri soja GLRaV-1, 2 i 3 (Starović i sar., 2008). Jevremović i Paunović (2011) su opisali virus žbunaste kržljivosti maline (*Raspberry bush dwarf virus*, RBDV) na vinovoj lozi, što je, prema istim autorima, drugi nalaz ovog virusa na vinovoj lozi u svetu, nakon otkrića u Sloveniji 2003 (loc cit. Ivanović i Ivanović, 2017). Infektivna degeneracija vinove loze je kolokvijalni naziv za oboljenje koje izaziva nekoliko nepovirusa i virus latentne prstenaste pegavosti jagode. Simptomi ovog oboljenja ne mogu se razlikovati od degenerativne lepezavosti koju izaziva virus lepezavosti lista vinove loze, pa se stoga često govori o sindromu infektivne degeneracije i lepezavosti lista vinove loze (Ivanović i Ivanović, 2017).

U literaturi se prouzrokoivači povezani infektivnom degeneracijom vinove loze navode kao evropski nepovirusi i severnoamerički nepovirusi. Na osnovu filogenetskih proučavanja i serološke srodnosti evropski nepovirusi su svrstani u tri podgrupe:

1. Nepovirusi podgrupe A: virus lepezavosti lista vinove loze (*Grapevine fanleaf virus*, GFLV), virus mozaika gušarike (*Arabis mosaic virus*, ArMV); virus prstenaste

pegavosti maline (*Raspberry ringspot virus*, RpRV); virus deformacije vinove loze (*Grapevine deformation virus*, GdefV);

2. Nepovirusi podgrupe B: virus crne prstenaste pegavosti paradajza (*Tomato black ring virus*, TBRV); žuti mozaik vinove loze (*Grapevine chrome mosaiv virus*, GCMV); anatolijski virus prstenaste pegavosti vinove loze (*Grapevine anatolian ringspot virus*, GARSV); i

3. Nepovirus podgrupe C: virus uvijenosti lista trešnje (*Cherry leafroll virus*, CLRV) (**Ivanović i Ivanović, 2017**).

Virus latentne prstenaste pegavosti jagode na vinovoj lozi (*Strawberry latent ringspot*, SLRV), koji se, takođe, vezuje za infektivnu degeneraciju, svrstan je u familiju *Secoviridae*. Nije srodan ni sa jednim nepovirusom. Prvo je opisan u Nemačkoj, potom i u drugim evropskim zemljama (**Martelli et al., 2016a**). U Srbiji je identifikovano prisustvo 3 soja virusa uvijenosti lista, i to GLRaV-1, 2 i 3 (loc cit. **Ivanović i Ivanović, 2017**).

U poslednjih nekoliko godina u našoj zemlji zapaženi su značajni gubici usled odumiranja čokota vinove loze. Tokom višegodišnjeg praćenja (2004-2012) na području Srbije, konstantovano je prisustvo gljive *Eutypa lata* koja može biti uzročnik odumiranja čokota vinove loze (**Živković et al., 2012a**). Ova bolest je utoliko veći problem jer ne postoje adekvatne hemijske mere zaštite. Takođe, odsustvo otpornih sorti prema ovoj bolesti dovodi do sve većih gubitaka, koji su procenjeni na 20 do 35%. Vidljivi simptomi ove bolesti pojavljuju se samo u F fazi razvoja vinove loze, kada su lastari vinove loze dužine od 20 do 50 cm i manifestuju se pojavom skraćenih lastara sa „cik-cak” izgledom internodija, deformisanim hlorotičnim liskama i nekrozom krajeva liski. Na poprečnom preseku debla vinove loze, vidi se nekroza u obliku slova "V" (**Gajić i sar., 2008; Živković et al., 2012a, 2012b**). Odumiranje čokota vinove loze prvi put je opisano u Australiji 1957. godine pod imenom *Eutypa armeniacae* (**Dye and Carter, 1976**). Danas je ovo oboljenje rasprostranjeno u mnogim oblastima gajenja vinove loze u SAD, Australiji, Novom Zelandu, Južnoj Africi, Evropi (**Carter, 1973; Mink, 1975; Moller and Lehoczky, 1980; Peros and Berger, 1994; Halleen et al., 2001**). Kod nas se o ovoj bolesti zna vrlo malo, a prisustvo ove bolesti u Srbiji prvi put je utvrđeno od strane **Gajić i sar. (2008)**.

Istraživanja u okviru ove disertacije doprineće rasvetljavanju etiologije odumiranja čokota vinove loze i daće doprinos potpunijem sagledavanju šteta nastalih poslednjih godina u proizvodnji vinove loze.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Predstavnici roda *Eutypa*

Gljive iz roda *Eutypa* široko su rasprostranjene u svetu i predstavljaju brojne patogene gajenih drvenastih biljaka, šumskog i ukrasnog drveća. Ove gljive su uglavnom specijalizovane za život na osušenom tkivu zaraženih biljaka (**Tiffany and Gilman, 1965; Glawe and Roger, 1984; Rappaz, 1987**). Nekoliko predstavnika roda *Eutypa* poznati su kao značajni patogeni na kajsiji, vinovoj lozi, jabuci i drugom gajenom (**Carter, 1991; Davidson and Lorenz, 1938; Moller and Kasimatis, 1978; Munkvold and Marois, 1994**) i šumskom drveću u SAD i Evropi (**Hinds and Laurent, 1978; Hinds, 1981; Sinclair and Lyon, 2005; Jurc et al., 2006**).

Rappaz (1987) je izolovao *Eutypa leptoplaca* iz krušine (*Frangula alnus* Mill.), zatim *Eutypa petrakii* var. *petrakii* iz gloga (*Carataegus* L.) i vrbe (*Salix* L.), a iz hrasta (*Quercus* L.) isti autor je izolovao gljivu *Eutypa lata* var. *aceri*. **Trouillas and Gubler (2004)** u SAD su utvrdili da je *Eutypa leptoplaca* (Mont.) Rappaz patogen na vinovoj lozi, što je i potvrđeno u ispitivanjima sprovedenim u Australiji (**Pitt et al., 2013**). **Rolshausen et al. (2014)** izoluju veći broj neidentifikovanih vrsta roda *Eutypa* sp., kao i predstavnike vrste *Eutypa laevata* iz raznih sorti vinove loze i potvrđuju njihovu patogenost na vinovoj lozi. Međutim, vrsta *Eutypa lata* je najznačajnija i najrasprostranjenija od svih predstavnika roda *Eutypa*. S obzirom da nanosi velike ekonomske štete na vinovoj lozi i kajsiji, detaljno je proučavana u Australiji i u SAD (**Carter, 1991**).

Pildain et al. (2005) su proučavali biodegradacioni potencijal vrsta iz roda *Eutypa*. Dobijeni rezultati ukazuju da predstavnici ovog roda imaju fiziološku sposobnost da izazovu truljenje drveta, tako što stvaraju enzime koji razlažu celulozu i lignin u ćelijskom zidu biljaka. Zbog toga ove gljive imaju važnu ulogu u prirodi, jer izazivaju truljenje osušenih delova zaraženih biljaka.

Istraživanja sprovedena u Kaliforniji pokazuju mogućnost korelacije između infekcije vinove loze vrstama iz roda *Eutypa* i prisustva plodonosnih tela ovih gljiva na domaćinima iz okoline, često u neposrednoj blizini vinograda (**Trouillas and Gubler, 2010; Trouillas et al., 2010, 2014**).

2.2. Istorijat pojave, nomenklatura i mesto roda *Eutypa* u sistematici gljiva

2.2.1. Istorijat, klasifikacija i taksonomija roda *Eutypa*

Bolest nazvana "mrtva ruka" na vinovoj lozi prvi put je opisana u Severnoj Americi od strane **Reddick**-a 1909. godine. Ista bolest je detektovana u Australiji na kajsiji 1933. godine (**Samuel 1933**). **Reddick (1909)** i **Coleman (1928)** smatrali su da je prouzrokovatelj "mrtve ruke" na kajsiji i vinovoj lozi patogen *Phomopsis viticola*. **Francki and Crowley (1967)** navode da simptome odumiranja čokota vinove loze izazvaju virusne infekcije. Tek je **Carter (1957)** nakon opsežnog proučavanja peritecija na vinovoj lozi i testova patogenosti ustanovio da se radi o gljivi *E. lata* (syn. *E. armeniacae*). Zatim su i **Moller et al. (1974)**, **Dye and Carter (1976)** i **Kouyeas et al. (1976)** serijom testova patogenosti dokazali da je bolest opisana kao "mrtva ruka" na vinovoj lozi, koju izaziva *E. lata*, isto što i "odumiruća ruka" ili "gumoza" na drvetu kajsije, što potvrđuju **Moller and Kasamatis (1978)**.

Cooke (1871) je među prvima dao pun opis do tada poznatih vrsta gljiva, kao i ilustracije rodova, pa tako gljivu *Eutypa lata* svrstava u rod *Eutypa* i familiju Sphaeriaceae. Ovaj autor gljivu opisuje kao "Široka *Eutypa*" ("Broad *Eutypa*") zbog rasutih, nejednakih peritecija koje su uronjene u drvo. U peritecijama se formiraju askusi sa 8 askospora. Askospore su bledožute boje, zaobljenih krajeva. Na unutrašnjoj strani kore često može da se nađe anamorfni stadijum. Konidije su u masi, žućkaste boje, bezbojne kada su pojedinačne, krive i zaobljenih krajeva. Takođe, isti autor navodi i njene sinonime: *Diatrype lata*, Curr. Linn. Trans., *Sphaeria lata*, Fr. S.M. U sistematici gljiva **Saccardo (1882)** ne odvajaju jasno različite vrste u okviru roda *Eutypa*, pa vrste *E. acharii* Tul., *E. lata* (Pers.: Fr.) Tul., i *E. ludibunda* Sacc. se smatraju istom vrstom.

Cooke and Ellis (1894) u delu "Nove gljive Nju Džersija" gljivu *E. lata* opisuju na hrastu (*Quercus* L.). **Castaigne (1907)** svrstava *E. lata* u familiju Sphaeriaceae i detaljno opisuje članove roda *Eutypa*. Takođe navodi sinonime *Sphaeria* (Pers., 1796) i *Hypoxylon* (West. et Van Haes, 1838).

U Holandiji **Miller (1897)** vrši reviziju sistematke gljiva, pominje *E. lata* i njen sinonim *Sphaeria lata* kao uzročnika oboljenja gloga (*Crataegus* L.), jasena (*Fraxinus* Tourn.ex L.) i leske (*Corylus avellana* L.). U Irskoj **Grove (1892)** beleži prisustvo *E. lata* na granama drveća u području priobalnog dela oblasti Antrim. Vrstu *E. lata*, izolovanu sa grana drvenastih biljaka, svrstava u klasu Pyrenomycetes. U Americi **Ellis and Everhart (1892)** objavljuju klasifikaciju svih Pyrenomycetes izolovanih u Severnoj Americi do tada. Za ovu gljivu su naveli više sinonima i to: *Sphaeria lata*, *Dyatrype lata*, *Valsa lata*. Takođe ovi autori navode da su strome ove gljive rasute u drvetu ili kori, nejednake veličine, crnosmeđe boje. Peritecija je uronjena, loptastog oblika, prečnika oko 1 mm. Askusi su cilindrični, dimenzija 40-45 x 4-5µm. Askospore izdužene, zakrivljene, žućkaste, dužine 8-12 x 1,5-2µm. Konidije su tanke, cilindrične, krive, hijalinske i izlučuju se iz roze želatinozne mase, dimenzija 18-22 x 1µm.

Prema **Voss-u (1887)** *E. lata* pripada takozvanoj grupi "landesflora" koju čini 165 vrsta gljiva. **Beccari (1898)** pominje gljivu *E. lata* (Pers.) Tul. kao uzročnika oboljevanja šumskog drveća na ostrvima Bornea.

U Engleskoj **Massee and Crossland (1905)** pominju *E. lata* kao patogena šumskog drveća u Jorkširu. Opisuju simptome sušenja kore drveta i grana na bršljanu (*Hedera*) i drugim drvenastim biljkama. **Göumann (1928)** svrstava gljivu *E. lata* u red Sphaeriales i familiju Diatrypaceae. Opisuje je kao vrstu koja uglavnom ima jednoćelijske spore i napada drvenaste delove biljke. **Göumann (1928)** vrši klasifikaciju gljiva. Rod *Eutypa* karakterišu sledeće osobine: višesporni askusi, dok se strome formiraju od brojnih grozdova peritecija koje su grupno uronjene. Takođe, autor još uvek ne pravi jasne razlike između *E. lata* i drugih vrsta.

Brojni autori su se bavili proučavanjem anamorfnog stadijuma gljive *E. lata*. U tabeli 1 date su biometrijske vrenosti konidija *E. lata* izolovanih iz vinove loze i drugih domaćina, saopštene od strane raznih autora.

Tabela 1. Biometrijske vrednosti dimenzija konidija *E. lata*, izolovanih iz vinove loze i drugih domaćina, saopštene od strane raznih autora

Dimenzija konidija (µm)	Domaćin	Izvor
14-22 × 1-2	Kajsija	Glawe and Rogers (1982)
32 × 0,6-1	Vinova loza	Belarbi and Mur (1983)
52-64 × 1,5-2	Kajsija	McKemy et al. (1993)
34-74(-78) × 1-1,5 (-2)	Vinova loza	Glawe et al. (1982)
(15-) 25-35 (-39) × 1-2	Vinova loza	Moller et al. (1968)
20-45 × 0,8-1,5	Vinova loza	Munkvold (2001)
18-45 × 0,8-1,5	Vinova loza	Carter (1994)
18-22 × 1	Razni	Karsten (1871/1879)
18-22 × 1	Razni	Ellis and Everhart (1892)
18-45 × 0,8-1,5	Vinova loza	Ivanović i Ivanović (2002)
(14)-16-18(-20) × 1	Vinova loza	Mostert et al. (2001)
23,6-35 × 1,8-4,7	Razni	Rolshausen et al. (2006, 2014)
23,6-35,0 × 2,4-4,0	Razni	Trouillas and Gubler (2010)
20-45 × 0,5-1,5	Ribizla i ogrozd	Wenneker et al. (2011)

Adam (1938) korišćenjem suspenzije konidija izaziva infekciju na drvetu kajsije. Međutim, **Carter (1957)** ne uspeva da naklija konidije na različitim hranljivim podlogama i navodi da jedino askospore imaju ulogu inokuluma. Takođe, teškoće u identifikaciji *E. lata* su što ova gljiva ne stvara teleomorfni stadijum u regionima gde su godišnje padavine manje od 330 mm, kao ni na veštačkim hranljivim podlogama (loc. cit. **Ju et al., 1991**).

Taksonomskom revizijom roda *Eutypa* **Rappaz** je 1987. utvrdio da je gljiva *Eutypa armeniacae* identična sa gljivom *E. lata* (**Glawe et al., 1982; Glawe and Rogers, 1982, 1984; Rappaz, 1987; Carter, 1991**).

Glawe et al. (1982) su determinaciju ove gljive vršili na osnovu simptoma na domaćinu, testovima patogenosti na kajsiji i identifikacijom anamorfa u kulturi. Anamorfni stadijum (*Cytosporina*) sa kajsije prvi put je opisan još 1910. godine u Engleskoj od strane **Smith-a** pod imenom *Libertella blepharis*. Potom su brojni autori dali opis ovog stadijuma (**Glawe and Rogers, 1982; Glawe et al., 1982; Ju et al., 1992; McKemy et al., 1993; Carter, 1994; Munkvold, 2001**).

Primena filogenetskog koncepta u sistematizaciji vrsta roda *Eutypa* nastupila je sa razvojem molekularnih metoda i analizom DNK (**Lecomte et al., 2000; Rolshausen et al., 2004; Catal et al., 2007; Rolshausen et al., 2006, 2014; Trouillas and Gubler, 2010; Trouillas et al., 2011**).

Lecomte et al. (2000) su prvi dizajnirali specifične prajmere za determinaciju vrste *E. lata*. Naročito uspešno se pokazao par prajmera Lata1/Lata2-2 za odvajanje *E. lata* izolata od izolata preko pedeset različitih vrsta mikroorganizama nastanjenih na vinovoj lozi.

Rolshausen et al. (2004) su primenom lančane reakcije polimeraze i restrikcione analize (Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism, PCR-RFLP) sa univerzalnim parom prajmera ITS1/ITS4 i restrikcionim enzimom *AluI* uspeali da razdvoje pojedine predstavnike u okviru roda *Eutypa* to: *E. lata* (*E. armeniaceae*), *E. petrakii* var. *hederae*, *E. astroidea*, *E. leptoplaca*, *E. crustata* i *E. lejoplaca*. **Catal et al. (2007)** dizajniranjem specifičnog para prajmera EL1/EL4 za *E. lata* i EV1/EV4 dizajniranih za *Eutypella vitis* kao i univerzalnog para prajmera ITS1F/ITS4 primenom nested PCR metode, uspevaju da razdvoje ova dva patogena poreklom iz vinove loze. Takođe su dokazali da su *E. lata* i *E. armeniaceae* sinonimi, kao i da jasno odvajaju *E. lata* od *E. laevata*. Isto tako su na osnovu filogenetske analize DNK sekvenci regiona brojnih izolata *E. lata* i *Eutypella vitis* dokazali da se ove dve gljive razlikuju. Međutim, problem u ispitivanjima **Catal et al. (2007)** je što njihovi prajmeri EL1/EL4 nisu uspevali da amplifikuju fragmente izolata iz Evrope i Australije.

Rolshausen et al. (2006) su na osnovu filogenetske analize DNK sekvenci ITS regiona i gena za β -tubulin, kao i morfologije anamorfnog i teleomorfnog stadijuma, patogenosti na vinovoj lozi i analizom sekundarnih metabolita koje stvaraju ispitivani izolati gljiva, izvršili razdvajanje više vrsta u okviru roda *Eutypa* kao i par vrsta u okviru rodova *Eutypella*, *Diatrype* i *Diatrypella*. Takođe su na osnovu filogenetske analize DNK sekvenci regiona brojnih izolata *E. lata* i *E. armeniaceae* dokazali njihovu filogenetsku sličnost.

Trouillas and Gubler (2010) su na osnovu filogenetske analize DNK sekvenci ITS regiona, gena za β -tubulin, DNK zavisnu RNK polimerazu (RPB2), kao i morfoloških osobina teleomorfnog i anamorfnog stadijuma, testa patogenosti sprovedenog na sortama vinove loze Sovinjon beli i Šardone razdvojili blisko srodne vrste: *E. lata*, *E. lata* var. *aceri*, *E. laevata* i *E. petrakii* var. *petrakii* koje su ranije opisane samo na osnovu morfologije. Potom su potvrdili morfološku identifikaciju ovih vrsta kao i genetske varijacije u okviru vrste *E. lata*, što su potvrdili i **Trouillas et al. (2014)**.

Svi navedeni tipovi sistematike vrsta iz roda *Eutypa* imaju nedostatke. Nepostojanje standardizovanih i međunarodno prihvaćenih sistema i primena različitih koncepta u identifikaciji vrste dovode do konfuzije i nedoumica. Po mišljenju velikog broja istraživača, neophodna je nova i detaljnija revizija roda *Eutypa* čiji su predstavnici ekonomski značajni patogeni velikog broja biljaka.

2.2.2. Taksonomski status vrste *Eutypa lata*

U većini starijih taksonomskih klasifikacija (**Göumann, 1949; Goidánich, 1964; Josifović, 1964**) fitopatogene gljive sa razvijenom micelijom svrstavane su u četiri klase, poznate kao Phycomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes i Deuteromycetes (Fungi imperfecti). Međutim, taksonomska uređenja (**Ainsworth et al., 1973**) gljive tretiraju kao zasebno carstvo Fungi, sa 2 razdela, *Myxomycota* i *Eumycota*. Gljive sa razvijenom micelijom (*Eumycota*) dalje su klasifikovane u 5 podrazdela, i to: Mastigomycotina, Zigomycotina, Ascomycotina, Basidiomycotina i Deuteromycotina. Fitopatogene gljive koje obrazuju polne spore - askospore, svrstane su na osnovu odsustva ili prisustva askokarpa i njegovog izgleda u 5 klasa, i to: Hemiascomycetes, Plectomycetes, Pyrenomycetes, Loculoascomycetes i Discomycetes. U okviru treće klase razlikuju se 2 reda Erysiphales i Sphaeriales. U drugom redu nalazi se veći broj familija fitopatogenih gljiva, a u okviru familije Diatrypaceae nalazi se rod *Eutypa*. Prema istim autorima fitopatogene gljive, koje poseduju samo spore za bespolno razmnožavanje, izdvojene su u podrazdeo Deuteromycotina, koji je podeljen u 3 klase: Hyphomycetes, Coelomycetes i Agonomycetes (*Mycelia sterilia*). U okviru druge klase autori razlikuju 2 reda: Sphaeropsidales, sa vrstama koje obrazuju konidije u piknidima, i Melanconiales, sa vrstama koje konidije formiraju u acervulama. U prvom redu nalazi se samo 1 familija Diatrypaceae, kojoj pripada i rod *Eutypa*.

Primenom navedenih kriterijuma predloženih od strane **Ainsworth-a et al. (1973)**, *E. lata*, prouzrokovatelj odumiranja čokota vinove loze, kod koga je opisan teleomorfni stadijum pod nazivom *E. lata*, koji prema **Pravilima Međunarodne Botaničke Nomenklature (2012)** ima prednost, pripadao bi sledećim taksonomskim jedinicama:

CARSTVO: Fungi

RAZDEO: Eumycota

PODRAZDEO: Ascomycotina

KLASA: Pyrenomycetes

RED: Sphaeropsidales

FAMILIJA: Diatrypaceae

ROD: *Eutypa*

Gljiva *E. lata* prouzrokuje odumiranje čokota vinove loze, pored teleomorfno stadijuma formira i anamorfni stadijum *Libertella blepharis* (Carter, 1957; Moller et al., 1968, 1974; Uyemoto et al., 1976; Glawe et al., 1982; Rappaz, 1987). Carter (1957) prvi je opisao da rod *Cytosporina* Sacc obrazuje konidije u piknidima. Danas je *Libertella* Desm. prihvaćena kao generičko ime za anamorf gljive *E. lata* (Carter, 1991). Takođe, Sutton (1977) navodi da rod *Cytosporina* ima sinonim *Dumortieria* Westd.

Kod mnogih vrsta roda *Eutypa* konidije se formiraju iz plodonosnih tela – piknida (Glawe and Rogers, 1982, 1984). Još su braća Tulasne (1863) izveštavali da gljiva *E. acharii* Tul & C. Tul može da formira konidije na 2 načina i to u plodonosnim telima - piknidima ili direktno na vazdušnoj miceliji ili hifama. Gljiva *E. lata* formira konidije samo u plodonosnim telima - piknidima. Takođe, prema Rappaz-u (1987) 5 različitih vrsta *Eutypa* i to: *E. lata* var. *aceri* F. Rappaz zajedno sa *E. petrakii* F. Rappaz, *E. spinosa* Tul. & C. Tul., *E. crustata* (Fr.: FR.) Sacc. i *E. astroidae* (Fr.: Fr.) F. Rappaz imaju oba tipa konidija (loc cit. McKemy et al., 1993).

U toku poslednje decenije razvojem molekularnih metoda dobijen je veliki broj podataka o genetskoj strukturi roda *Eutypa*. Revizija klasifikacije Pyrenomycetes (Sordariomycetes) obavljena je molekularnom analizom 4 genska regiona: mala nuklearna podjedinica rDNK (Small Nuclear Subunit of rDNA, SSU rDNA) velika nuklearna podjedinica rDNK (Large Nuclear Subunit, LSU rDNA); translokacioni faktor izduživanja 1- α (translation elongation factor 1- α TEF1); i druga velika podjedinica RNK polimeraze (second largest subunit of RNA polymerase II, RPB2). Dobijeni podaci su statistički analizirani, a ispitivane vrste svrstane u filogenetsko stablo. Kao novi takson uvedena je podklasa Xylariomycetidae. Rod *Eutypa* je ostao u

familiji Diatrypaceae. **Zhang et al. (2006)** su na taj način odredili novi taksonomski status *E. lata* u sistematici gljiva:

CARSTVO: Fungi

RAZDEO: Ascomycota

KLASA: Sordariomycetes

PODKLASA: Xylariomycetidae

RED: Xylariales

FAMILIJA: Diatrypaceae

ROD: *Eutypa*

Na osnovu podataka dobijenih iz svetske baze (**ARS Fungal Databases, 2012 i Index Fungorum, 2012**) rod *Eutypa* pripadao bi sledećim taksonomskim jedinicama:

CARSTVO: Fungi

RAZDEO: Ascomycota

KLASA: Ascomycetes

RED: Xylariales

FAMILIJA: Diatrypaceae

ROD: *Eutypa*

2.3. Domaćini *Eutypa lata*

E. lata je veoma polifagna vrsta i napada veliki broj biljaka iz raznih botaničkih familija. Među brojnim domaćinima ovog parazita su kajsija, badem, maslina, pistaći, kruška, vrba, vinova loza, dunja, orgozd, ribizla, kivi, fikus i brojne šumske vrste, na kojima, prema **Carter-u (1975, 1994)**, prouzrokuje simptome kao što su odumiranje pojedinih grana ili celih biljaka.

Wenneker et al. (2010) navodi da je *E. lata* u Holandiji identifikovana kao parazit na 28 biljnih familija i 87 vrsta. *E. lata* je patogen velikog broja biljaka, iz različitih rodova koštičavih, jabučastih, bobičastih i drugih voćaka i pričinjava velike štete. Isto tako gljiva je izolovana i iz velikog broja ukrasnih, samoniklih ili drvenastih biljaka. Familije sa ili iz kojih je izolovana gljiva *E. lata* su: *Aceraceae*, *Anacardiaceae*, *Araliaceae*, *Apocynaceae*, *Berberidaceae*, *Betulaceae*, *Cornaceae*, *Caprifoliaceae*, *Ebenaceae*, *Ericaceae*, *Ericaceae*, *Fagaceae*, *Juglandaceae*, *Leguminosae*,

Planataceae, Rhamnaceae, Rosaceae, Rutaceae, Salicaceae, Sambucaceae, Tamaricaceae, Tiliaceae, Moraceae, Oleaceae, Pittosporaceae, Ulmaceae, Verbenaceae, Vitaceae. Ovo je važno sa epidemiološke strane jer svih 87 vrsta iz gore navedenih familija predstavljaju rezervoar to jest izvor inokuluma. Prema **Carter et al. (1985)** vinova loza (*Vitis* sp.) je univerzalni domaćin za distribuciju *E. lata* na druge vrste koje rastu u blizini.

Prema brojnim autorima među najznačajnijim domaćinima ovog parazita ističe se vinova loza (**Kouyeas et al., 1976; Bolay and Moller, 1977; Moller and Kasamatis, 1978; Lehoczky and Moller, 1979; Moller and Lehoczky, 1980; Petzoldt et al., 1981, 1983; Bisiach and Minervini, 1985; Kassemeyer, 1987; Munkvold and Marois, 1994; Gubler et al., 2005; Loschiavo et al., 2007; Catal et al., 2007; Trouillas et al., 2010; Wenneker et al., 2010**) i drugi.

Veći broj autora navode ovu vrstu i kao značajnog parazita raznih vrsta koštičavih voćaka, kao što su: kajsijska (**English and Davis, 1965, 1978; Carter and Moller, 1977; English et al., 1983; Wenneker et al., 2010**), višnja i trešnja (**Munkvold and Marois, 1991, 1994; Trouillas and Gubler, 2010**), šljiva (**Bolay and Carter, 1985; Wenneker et al., 2010**), breskva (**Carter et al., 1983; Wenneker et al., 2010**), badem (**Quinn, 1941; Rumbos, 1985; Trouillas and Gubler, 2010; Gramaje et al., 2012**) i drugi.

Prema brojnim autorima među važnijim domaćinima ovog parazita su jabučaste voćke i to, pre svega jabuka i kruška (**Saccardo, 1882; Cuboni and Mancini, 1886; Glawe et al., 1983; Rolshausen et al., 2006; Trouillas and Gubler, 2010; Wenneker et al., 2010**) i drugi.

Isto tako, brojni autori navode *E. lata* kao izuzetno značajnog parazita masline (**Knoche, 1923; Rumbos, 1993; Carter, 1995, loc. cit. Rumbos, 1985; Tosi and Natalini, 2008**), ali i drugih voćnih vrsta kao što su ribizla (**Carter and Price, 1973; Prodorutti et al., 2008; Wenneker et al., 2011**), ogrozd (**Wenneker et al., 2011**), a značajna je i kao patogen limuna (**Rappaz, 1984; Kouyeas, 1978; Carter, 1986**) i oleandra (**Trouillas and Gubler, 2010**).

Veći broj autora utvrdili su ovog parazita i na raznim vrstama drvenastih biljaka, kao što su: vrba (**Saccardo, 1882; Gubler et al., 2005; Trouillas and Gubler, 2010**), javor (**Johnson and Kuntz, 1979; Trouillas and Gubler, 2010**), jasika (**Hinds, 1981;**

Trouillas and Gubler, 2010). *E. lata* prouzrokuje različite simptome i na drugim rodovima drvenastih biljaka, kao što su: *Crataegus*, *Fraxinus*, *Corylus*, *Ulmus*, *Acer*, *Quercus*, *Oak*, *Myrica* (**Cuboni and Mancini, 1886**; **Massee and Crossland, 1905**; **Carter and English, 1994**; **Rolshausen et al., 2006**; **Prodorutti et al., 2008**).

Trouillas and Gubler (2010) u svojim istraživanjima proučavali su krug domaćina *E. lata* u vingradarskim regionima u Kaliforniji. Takođe su analizirali i fenotipske varijacije i filogenetski diverzitet izolata *E. lata*. Ovi autori su pratili prisustvo peritecija *E. lata* na drvetu vinove loze, u voćnjacima na drvetu kajsije, badema, višnje, trešnje, jabuke i kruške, kao i na prirodnim domaćinima krupnolisnom javoru, vrbi i oleandru. Filogenetskom analizom DNK sekvenci ITS regiona i gena za β -tubulin, gena za DNK zavisnu RNK polimeraze (RPB2) potvrdili su i identifikovali *E. lata* izolovane sa različitih biljnih domaćina. Interspecifični filogenetski diverzitet prema **Trouillas and Gubler (2010)** ne podudara se sa geografskim poreklom izolata, i interspecifične grupe nakon različitih DNK filogeneza nisu podudarne. Značajne fenotipske varijacije izolata *E. lata* otkrivene su na vinovoj lozi, i to u pogledu dužine askospora i konidija kao i nivoa agresivnosti izolata.

2.4. Rasprostranjenost i ekonomski značaj odumiranja čokota vinove loze

Geografska rasprostranjenost. Pojava odumiranja čokota vinove loze pojavljuje se u gotovo svim zemljama sveta gde se vinova loza komercijalno uzgaja. Ovo je razumljivo s obzirom na širok krug biljaka domaćina koje gljiva *E. lata* napada. Osim široke rasprostranjenosti, odumiranje čokota vinove loze kao ekonomski važna bolest vinove loze značajnija je u oblastima gde su godišnje padavine iznad 600 mm. S druge strane retko se pojavljuje u oblastima gde su prosečne godišnje padavine manje od 250 mm (**Carter, 1994**). Bolest preovlađuje u regionima gde su zime oštre, kao što je istočni deo SAD, i u umerenim regionima Australije, Jugoistočne Francuske i Južne Afrike (**Rolshausen et al., 2015**). **Dye and Carter (1976)** navode da je ova bolest izazvala velike ekonomske štete na Novom Zelandu. **Moller and Lehoczky (1980)** izveštavaju o pojavi ove bolesti u vinogorju Mađarske. **Kassemeyer (1987)** je prvi opisao pojavu *E. lata* u Nemačkoj, dok **Bisiach and Minervini (1985)** prvi put

registruju ovu bolest u Italiji (loc. cit. **Cortesi and Milgroom, 2001**). U Španiji o pojavi ove bolesti pišu **Luque et al. (2009)**.

Ekonomski značaj. Prema **Carter (1994)** i **Pitt et al. (2013)** odumiranje čokota vinove loze je veoma opasna bolest vinove loze jer ne postoji efikasna hemijska zaštita, pa nakon napredovanja ove bolesti dolazi do smanjenja prinosa i odumiranja delova ili celih zaraženih biljaka, što dovodi do velikih ekonomskih gubitaka (**Rolshausen et al., 2015**).

Munkvold et al. (1992, 1993, 1994) izveštavaju o umanjenju prinosa vinove loze napadnute gljivom *E. lata* koje se kreće od 19 do 94%. Infekcija gljivom *E. lata* smanjuje broj pupoljaka na obolelim biljkama vinove loze, tako što redukuje broj funkcionalnih krakova, što utiče na smanjenje broja grozdova, a samim tim i na umanjenje prinosa. **Hight and Wicks (1998)** navode da je u južnom delu Australije oko 5% biljaka vinove loze zaraženo ovom bolešću, a posebno sorte Grenač (9,3%) i Širaz (8,1%), pri čemu nisu uzete u obzir već osušene biljke vinove loze. Takođe, za pojavu simptoma na lastarima potrebno je da prođe od 3 do 8 godina. Stoga mnoge obolele biljke bez vidljivih simptoma na lastarima nisu ušle u procenu šteta izazvanih ovom bolešću. Isto tako, procenu su radili u periodu kada su zdravi biljni delovi prekrili lisnom masom obolele delove biljaka vinove loze. **Wicks et al. (1997)** navode da je u jače zaraženim vinogradima u Južnoj Australiji zaraženo oko 60% biljaka vinove loze. Isti autori u istraživanjima iz 1999. godine navode da inficirane biljke sorte Širaz imaju redukovane krakove za 2/3 u odnosu na zdrave. Smanjenje prinosa je bilo od 740 kg/ha na sorti Kaberne sovinjon do 860 kg/ha na sorti Širaz (loc. cit. **Van Niekerk et al., 2003**). Nivo infekcije varira u vinogradu i nisu sve biljke inficirane u isto vreme. Tako u vinogradima starijim od 10 godina u kojima je zastupljena sorta Kaberne sovinjon prinos je manji za 31,7%. Dodatni troškovi nisu ušli u kalkulaciju, kao na primer troškovi nastali zbog gubitka kvaliteta vina (**Van Niekerk et al., 2003**).

Siebert (2001) navodi da su u Kaliforniji gubici izazvani bolešću izazvanom *E. lata* iznosili 16% od ukupne proizvodnje grozđa (**Rolshausen et al., 2015**). **Sosnowski et al. (2007a)** tvrde da je u saveznim državama Južnoj Australiji i Viktoriji gljivom *E. lata* zaraženo preko 80% biljaka vinove loze. **Mahoney et al. (2005)** i **Loschiavo et al. (2007)** ističu da nemogućnost kontrole bolesti doprinosi povećanju ekonomskih gubitaka prvenstveno zbog smanjenja prinosa i smanjenja životnog veka biljaka vinove

loze. Takođe, suzbijanje ove bolesti zahteva prilična finansijska ulaganja, vreme i fizički rad jer iziskuje odstranjivanje obolelih krakova, podsađivanje ili prekalemljivanje.

2.5. Ciklus razvoja *Eutypa lata* na vinovoj lozi

Gljiva *E. lata* je vaskularni patogen koji inficira vinovu lozu kroz sveže preseke od rezidbe. Opšte je mišljenje da se bolest širi uz pomoć askospora (Carter, 1994; Rolshausen et al., 2015). Ovo gledište je potpomognuto analizama vegetativne kompatibilnosti i DNK populacije *E. lata*, i u novije vreme filogenetskom analizom DNK sekvenci odgovarajućih delova genoma koje ukazuju na veoma visok stepen genetskog diverziteta u populacijama *E. lata* u vinogradima i van njih (Péros et al., 1996; 1997; 1999; DeScenzo et al., 1999; Péros and Berger, 1999; Cortesi and Milgroom, 2001; Péros and Berger, 2003; Travadon et al., 2012; Rolshausen et al., 2015).

Gljiva prezimljava na odumrlom zaraženom drvetu u vidu peritecija. Peritecije su smeštene u stromama na površini mrtvog biljnog tkiva. Zrela stroma je tamnocrne boje, hrapave površine nastale usled isturanja vratova peritecija. Peritecije *E. lata* su flašastog oblika. Svaka peritecija sadrži brojne askuse, a svaki askus sadrži 8 askospora, dužine 6,5-11 μm i širine 1,8-2 μm (Carter, 1994; Rolshausen et al., 2015). U regionima gde su zime blage, peritecije *E. lata* dozrevaju u rano proleće, a askospore se sukcesivno oslobađaju iz peritecija tokom perioda padavina kada je vodeni talog veći od 1 mm (Gubler et al., 2005). Kasno u jesen peritecije su skoro ispražnjene, ali u njima ima dovoljno askospora da inficiraju preseke od rezidbe. U regionima gde su uobičajene zimske temperature ispod 0 °C, rasejavanje askospora je intenzivno u vreme rezidbe vinove loze. Askospore ostaju vitalne i do 2 meseca, a mogu se prenositi i vetrom na rastojanja od 50 do 100 km (Carter, 1957; Ramos et al., 1975, loc. cit. Glawe et al., 1982; Gubler et al., 2005).

Infekcija nastaje kada askospore dospeju na sveže preseke nastale rezidbom i u prisustvu vodenih kapi prodiru u vaskularno tkivo. Rane na čokotu nastale rezidbom zarastaju tek nakon dve nedelje. Kišne kapi neophodne su za oslobađanje askospora, i nakon prenošenja vetrom i dospevanja na preseke nastale rezidbom, askospore kličaju u sprovodnim sudovima, u periodu od 11-12 h, pri optimalnoj temperaturi 20-25 °C,

obično 2 mm ispod površine preseka. Micelija gljive u stablu i krakovima prvo zahvata ksilem, a zatim se širi na kambijum i floem. U fazi mirovanja dešava se invazija ksilemskog sprovodnog tkiva, zatim slabljenje biljaka zbog proizvodnje toksina i izazivanje truljenja drveta izlučivanjem enzima za degradaciju ćelija (**Carter, 1994; Mahoney et al., 2005; Gubler et al., 2005; Rolshausen et al., 2008**).

Rane su posebno osetljive odmah nakon orezivanja, premda se infekcije mogu javiti i nakon 7 nedelja od rezidbe (**Petzoldt et al., 1981; Munkvold et al., 1993, 1994; Munkvold and Marois, 1991, 1994**). Veruje se da *E. lata* inficira samo rane kod starijih biljaka vinove loze, mada novija istraživanja pokazuju da je patogen takođe sposoban da inficira i mlade lastare. Međutim, takva infekcija se verovatno eliminiše sledećom rezidbom (**Sosnowski et al., 2007b**).

Na mrtvoj kori sa unutrašnje strane ili drvetu inficiranog tkiva može da se nađe i matriks belodožute do narandaste boje iz kojeg se oslobađaju brojne jednoćelijske konidije dužine 18-45 µm i širine 0,8-1,5 µm (**Rolshausen et al., 2015**). Konidije mogu biti veoma efikasne u širenju bolesti na malim rastojanjima, pošto se stvaraju u sluzastoj masi i šire se kapima vode. Mada, po nekim autorima procenat klijanja konidija u prirodi je veoma mali (**Ju et al., 1991**).

Vinova loza koja je mlađa od 5 godina ne podleže infekciji, dok je pojava simptoma retka kod biljaka vinove loze starosti od 8 do 10 godina (**Glawe et al., 1982; Gubler et al., 2005; Ivanović i Ivanović, 2002, 2005a; Sosnowski et al., 2007b**).

U ranijim istraživanjima više pažnje se posvećivalo praćenju klimatskih uslova pogodnih za širenje askospora u vinogradima (**Paillassa, 1992; Ramos et al., 1975; Trese et al., 1980**). Peritecije se pojavljuju samo u oblastima sa godišnjim padavinama iznad 350 mm (**Glawe et al., 1982; Carter, 1994; Gubler et al., 2005**). Navodnjavanje orošavanjem može obezbediti povoljne uslove za formiranje plodonosnih tela u oblastima sa niskim padavinama (**Munkvold and Marois, 1991, 1994**). **Cortesi and Milgroom (2001)** navode u svojim istraživanjima da peritecije mogu biti prisutne na živim biljkama vinove loze inficiranim ovim patogenom. Prema **Munkvold et al. (1993)** od početka infekcije do stvaranja peritecija neophodno je da prođe najmanje 5 godina i godišnje padavine iznad 500 mm. Isto tako, ovi autori navode da se često dešava da u vinogradima ne dolazi do formiranja peritecija u oblastima gde je visok nivo padavina.

Ramos et al. (1975) i **Trese et al. (1980)** izveštavaju o obilnom formiranju peritecija na osušenom drvetu kajsije pri godišnjim padavinama većim od 800 mm. S druge strane ove tvorevine bile su veoma retke u područjima gde su godišnje padavine ispod 280 mm. Oblast Bordo u Francuskoj je pogodna za stvarnje teleomorfno stadijuma zbog uticaja atlanske klime i godišnjih padavina od preko 900 mm (**Dubos, 2002**). Prisustvo peritecija je tek nedavno identifikovano u oblastima Castilla Leon i Rioja Alavesa (Španija) u kojima preovladava mediteranska klima i godišnje padavine 400-500 mm. Peritecije su otkrivene na sorti Tempranilo u vinogradu starom 86 godina. Inače u ovoj oblasti Španije još osamdesetih godina prošlog veka identifikovano je odumiranje čokota vinove loze na osnovu prisustva anamorfa na oko 11% obolelih biljaka (loc. cit. **Muruamendiaraz et al., 2009**).

Istraživanja u Kaliforniji pokazuju da gljivi *E. lata* više odgovara hladna i vlažna klima (**Urbez-Torres et al., 2006**), što potvrđuju i istraživanja **Cortesi and Milgoom (2001)**. Naime, od ukupnog broja ispitanih vinograda ovi autori su ustanovili prisustvo peritecija u 24% vinograda u Italiji, odnosno u 43% vinograda u Nemačkoj.

2.6. Mere kontrole odumiranja čokota vinove loze

U cilju suzbijanja odumiranja čokota vinove loze u vinogradima koriste se fitosanitarne i hemijske mere. Primena preventivnih mera borbe ogleda se u izboru sorti, izboru uzgojnog oblika čokota, vremenu rezidbe i uklanjanju i spaljivanju obolelih delova čokota.

U regionima gde ima više domaćina gljive *E. lata*, kontrola bolesti se ne može vršiti samo sanitarnim merama. Redovna rezidba i uništavanje obolelih delova čokota omogućava kontrolu inokuluma u granicama pogodnim za vinovu lozu. U proleće u ranoj fazi razvoja vinove loze kada su zdravi lastari dužine 25–50 cm, treba obeležiti napadnute delove čokota kako bi se odstranili kasnije u fazi mirovanja prilikom redovne rezidbe (**Sosnowski et al., 2011; Rolshausen et al., 2015**).

U pojedinim regionima odstranjivanje obolelih krakova je efikasna metoda u kontroli odumiranja čokota vinove loze u vinogradima. Oboleli krakovi se odstranjuju sečenjem najmanje 10 cm ispod vidljivog dela simptoma oboljenja. Ovaj vid lečenja omogućava svakoj pojedinačnoj biljci vinove loze da nastavi sa razvojem i oporavkom,

ali ne doprinosi sprečavanju nastanka novih infekcija (**Sosnowski et al., 2011; Rolshausen et al., 2015**).

S obzirom da nema otpornih sorti vinove loze na gljivu *E. lata*, za zasnivanje vinograda preporučuje se sadnja tolerantih sorti, a izbegavanje osetljivih sorti. Na osnovu dosadašnjih istraživanja utvrđeno je da su prema ovom patogenu sorte Kaberne sovinjon i Šardone osetljivije od sorti Merlo, Semion i Zinfandel (**Rolshausen et al., 2015**).

Kao preventivna mera borbe preporučuje se i izbor nekog od uzgojnih oblika koji podrazumevaju formiranje čokota sa niskim stablom – mešovita rezidba. Više je istraživanja utvrdilo prednosti korišćenja uzgojnog oblika Gijo (jednogubi i dvogubi način rezidbe) u odnosu na ostale tipove rezidbe (**Sosnowski, 2016**). Vreme rezidbe je jedan od bitnih činilaca koji utiče na ostvarenje zaraze gljivom *E. lata*. Kao preventivna mera preporučuje se rana prolećna rezidba. Nakon rane prolećne rezidbe na presecima dolazi do pojave suzenja koje traje od 9 do 30 dana. Pretpostavlja se da suzenje najverovatnije sprečava ostvarenje infekcije. Smatra se da kapi tečnosti koje tada konstantno izbijaju (cure) iz tkiva na preseku, sprečavaju kontakt askospore patogena i vaskularnog tkiva preseka. Iako suzenje vremenom slabi, preseci ne postaju osetljiviji na infekciju. To se najverovatnije dešava zato što turgor u živom delu vaskularnog tkiva, sprečava dospevanje askospora na dubinu potrebnu za klijanje (2 mm ispod oštećenog tkiva). Tokom orezivanja, ako je to moguće, preporučuje se i izbegavanje pravljenja velikih preseka (**Ivanović i Ivanović, 2005a**).

Da bi se smanjio prodor askospora i ostvarivanje infekcije preseci nastali rezidbom se premazuju koncentrovanim tiofanat - metilom koji obezbeđuje dobru zaštitu protiv odumiranja čokota vinove loze i mnogih drugih značajnih bolesti debla (*Botryosphaeria dieback* i *esca*). Međutim, premazivanje mora da se vrši više puta, pošto ni jedan fungicid ne može da deluje tokom celog perioda osetljivosti preseka nastalih rezidbom. Slično, 5% rastvorom borne kiseline tretiraju se komercijalni kalemovi ili se primenjuje kao pasta za premazivanje preseka nastalih rezidbom. Borna kiselina obezbeđuje veoma efikasnu barijeru protiv invazije gljive *E. lata*, takođe inhibira klijanje askospora i kasnije porast micelije. Prednost paste borne kiseline u odnosu na prskanje je da omogućava fizičku barijeru u kišnom periodu jer je dovoljna samo jedna primena nakon rezidbe. Takođe borna kiselina ograničava infekcije i drugih

bolesti debla. Nedostatak delovanja borne kiseline je da izaziva fitotoksični efekat. Naime, dešava se da na tretiranim presecima od rezidbe ne dolazi do razvoja lastara iz pupoljaka u proleće. Prskanje i premazivanje preseka nastalih rezidbom trebalo bi da se obave ručno da bi se rane optimalno pokrile pastom kako bi se kasnije sprečio razvoj bolesti (**Sosnowski et al., 2013; Rolshausen et al., 2015**).

Brojne međunarodne studije izveštavaju o efikasnosti fungicida za kontrolu *E. lata* uključujući preparate iz grupe DMI (tebukonazol, flusilazol i miklobutanil) i QoI (Azoksistrobin). Istraživači su takođe procenjivali efikasnost ovih preparata i na druge patogene iz familija Diatrypaceae i Botryosphaeriaceae (**Sosnowski et al., 2013; Rolshausen et al., 2015**).

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije obuhvatiće utvrđivanje prisustva i rasprostranjenosti gljiva iz roda *Eutypa* - patogena na vinovoj lozi (*Vitis Vinifera* L.) u Srbiji. Odumiranje čokota (eutipoza) vinove loze je bolest koja se pojavljuje u skoro svim područjima gajenja vinove loze u svetu, a do sada nije eksperimentalno proučavana u Srbiji.

Prema podacima iz literature, gubici nastali dejstvom ovog patogena mogu dosegnuti ogromne razmere. Imajući u vidu da naša zemlja pruža optimalne klimatske uslove za razvoj gljive *E. lata*, veliki broj potencijalnih biljaka domaćina, kao i činjenicu da je patogen dokazan u zemljama našeg okruženja postojala je osnovana sumnja da se ovo oboljenje proširilo i u našim vinogorjima.

Osnovni cilj istraživanja u okviru ove doktorske disertacije je proučavanje etiologije prouzrokača odumiranja čokota vinove loze, kao i pouzdana identifikacija i karakterizacija izolovanih gljiva do nivoa vrste ispitivanjem patogenih, morfoloških, odgajivačkih i ekoloških osobina, kao i primenom molekularnih metoda.

Naučni cilj istraživanja ove doktorske disertacije je da se utvrdi prisustvo i rasprostranjenost *E. lata* - prouzrokača odumiranja čokota vinove loze u Srbiji, kao i da se prouči osetljivost sorti prema ovom patogenu.

Takođe, primena protokola za molekularnu identifikaciju prouzrokača pružiće osnovu za brzu i preciznu identifikaciju prouzrokača odumiranja čokota vinove loze. Filogenetska analiza odabranih izolata pružiće jasniji uvid u taksonomsku poziciju prouzrokača kroz rekonstrukciju filogenetskog stabla na osnovu tri gena koja će biti uključena u ova istraživanja. Od velikog značaja će biti i to što će dobijeni rezultati predstavljati uvod u bližu genetičku karakterizaciju vrste *E. lata* u okviru roda *Eutypa* na prostorima Srbije. Sekvenciranje tri odgovarajuća dela genoma odabranih izolata, njihovo međusobno poređenje i određivanje filogenetskog međuodnosa sa drugim izolatima u svetu, doprineće poznavanju strukture populacije vrste *E. lata* u okviru roda *Eutypa* u Srbiji.

Takođe, jedan od postavljenih ciljeva biće unapređenje i uvođenje novih metoda detekcije i identifikacije, kao i ranog otkrivanja patogena u biljnom tkivu. S obzirom da danas ne postoje uspešne mere zaštite od ove bolesti, proučavanjem osetljivosti

najzastupljenijih sorti vinove loze u našoj zemlji doprineće razvijanju uspješnije prevencije ovog veoma štetnog oboljenja u našoj zemlji.

4. MATERIJAL I METODE RADA

4.1. Prikupljanje biljnog materijala i izolacija gljiva

Ispitivani izolati u ovom radu dobijeni su iz biljaka vinove loze sa simptomima sušenja i odumiranja koje su prikupljene u periodu 2004-2012. godine. Prikupljanje uzoraka obavljeno je u glavnim proizvodnim područjima vinove loze na teritoriji Republike Srbije iz 14 lokaliteta: Dobričevo, Drenovac (Pomoravski okrug), Praskovče, Lipovac (Nišavski okrug), Kobilje, Bela Voda, Krvavica, Suvaja, Trnavci, Tulež (Rasinski okrug), Gudurica (Južnobanatski okrug), Karbulovo (Borski okrug), Strezovac (Pčinjski okrug), Sremski Karlovci (Južnobački okrug). Sakupljanje uzoraka obavljeno je u drugoj polovini maja i početkom juna u vinogradima starim od 11 do 22 godine.

Prilikom prikupljanja uzoraka obolelih biljaka na terenu uzimani su fragmenti stabla i kordona vinove loze sa prelaza obolelog i zdravog tkiva, veličine od 10 do 20 cm. Uzorci su stavljeni u papirne kese i tako dopremani do fitopatološke laboratorije Instituta za krmno bilje, Kruševac. Ukupno je sakupljeno i analizirano 150 uzoraka.

Po donošenju u laboratoriju uzorci su najpre ispirani tekućom vodom, a zatim je primenom standardnih fitopatoloških metoda vršena izolacija gljiva. Izolacija patogena obavljena je sa stabla i kordona vinove loze. Kako bi se odstranile površinske nečistoće, delovi stabla i kordona ispirani su tekućom vodom 2 h, a zatim isecani na fragmente dužine 1 cm. Fragmenti stabla i kordona su isečeni na prelazu nekrotičnog i zdravog tkiva, površinski dezinfikovani 5 minuta u 5% rastvoru natrijum hipohlorita (NaOCl) (14% NaOCl, Superlab, Beograd) i isprani 3 puta po 5 minuta u sterilnoj destilovanoj vodi. Fragmenti su prenošeni na sterilan filter papir da se odstrani višak tečnosti, a potom postavljeni na hranljivu podlogu. Za izolaciju patogena korišćena je podloga krompir dekstrozni agar (Potato Dextrose Agar, PDA) sa dodatkom 300 µl/l gentamicin sulfata. Ova podloga pripremljena je od 200 g krompira, 20 g dekstroze (Torlak, Institut za imunologiju i virusologiju, Beograd), 20 g agara (Torlak, Institut za imunologiju i virusologiju, Beograd) i 1 l destilovane vode (**Dhingra and Sinclair, 1995**). Petri kutije sa fragmentima su inkubirane u termostatu pri temperaturi od 24±2°C, u mraku do razvoja kolonija gljiva oko fragmenata.

4.2. Dobijanje čistih kultura, monosporijalnih izolata i njihovo čuvanje

Izdvajanje čistih kultura gljiva koje su se razvile prilikom izolacije iz različitih biljnih delova izvršeno je presejavanjem fragmenata podloge i kolonije na svežu podlogu, 3-5 dana nakon izolacije. Za presejavanje su odabirane bele pamučaste kolonije, sa vazdušastom micelijom, koje su po makroskopskim osobinama odgovarale opisima vrsta roda *Eutypa*. Nakon izdvajanja čistih kultura izolata pristupilo se dobijanju monosporijalnih izolata koji su korišćeni za dalja istraživanja.

Monosporijalni izolati proučavanih gljiva dobijeni su od čistih kultura starih 30 dana gajenih na PDA u termostatu pri temperaturi od 24 ± 2 °C, pod uticajem UV svetla u trajanju od 24 h. U ovim kulturama se stvaraju piknidi iz kojih se izlučuje konidijalna masa krem žute boje. Za dobijanje monosporijalnih izolata u razvijene čiste kulture gljiva dodavano je 10 ml sterilne vode i blagim trljanjem staklenim štapićem izvršeno je odvajanje micelije i konidija od podloge. Tako dobijena suspenzija filtrirana je, u sterilnim uslovima, kroz dva sloja gaze da bi se odstranila micelija, a zatim razređivana u nekoliko koraka po 10 puta i od svakog razređenja odvajan je po 1 ml suspenzije konidija radi zasejavanja na vodeni agar (Water Agar, WA). WA pripreman je od 17 g agara i 1 l destilovane vode (**Dhingra and Sinclair, 1995**). Nakon inkubacije u trajanju od 4-6 h, uz mikroskopiranje su obeležene i izdvojene pojedinačne konidije svakog izolata, a zatim prebacivane na svežu PDA. Inkubacija je obavljena pri 24 ± 2 °C, pod uticajem UV svetla u trajanju od 24 h. Razvojem ovako presejanih pojedinačnih klizalnih konidija dobijeno je više monosporijalnih kultura od svakog pojedinačnog izolata. Dobijeni monosporijalni izolati presejani su u epruvete sa zakošenom PDA i gajeni 7 dana u termostatu pri 25 °C. Nakon odgovarajućeg razvoja izolata na zakošenoj PDA podlozi, epruvete su pakovane u plastične kese za čuvanje u frižideru pri 4 °C. Ponovno presejavanje ovako formirane kolekcije izolata obavljano je svakih 6 meseci.

4.3. Provera patogenosti i izbor izolata za dalja istraživanja

U cilju provere patogenosti dobijenih monosporijalnih izolata gljive izvršene su veštačke inokulacije vinove loze. Test provere patogenosti izolata obavljen je na dva načina: inokulacijom neukorenjenih reznica vinove loze (**Péros and Berger, 1994**) i

inokulacijom ukorenjenih reznica vinove loze u uslovima staklenika (**Sosnowski et al., 2007a**). Za inokulaciju reznica u oba oglada korištena je sorta Kaberne sovinjon.

Inokulacija neukorenjenih reznica vinove loze. Prema metodi **Péros and Berger-a (1994)** vršena je inokulacija neukorenjenih reznica vinove loze sorte Kaberne sovinjon u uslovima staklenika. Reznice vinove loze prikupljene su tokom zime na poljoprivrednom dobru "Radmilovac" Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Sa čokota, u fazi mirovanja, 10 dana pred postavljanje oglada isecani su lastari koji su do postavljanja oglada čuvani u frižideru pri temperaturi od 4°C. Pred inokulaciju pravljene su reznice dužine 10–15 cm skraćivanjem lastara na 2 nodusa. Potom su reznice potapane u vodu 24 h kako bi se lakše izvršila inokulacija (**Péros and Berger, 1994**).

Pripremljene reznice vinove loze inokulisane su fragmentom kolonije sa 10 dana starih kultura, odgajenih na PDA na 25 °C u mraku. Inokulisano je po 8 reznica u 4 ponavljanja. Isečak micelije nanošen je u zasek napravljen skalpelom na internodiji i obavijan parafilm trakom. Mesto inokulacije je potom obavijano sterilnom vatom natopljenom sterilnom vodom, da bi se sprečilo isušivanje (**Péros and Berger, 1994**). Tako pripremljene reznice smeštane su u kontejnere dimenzija 50 x 70 x 30 cm, tako da donji deo bude potopljen u vodu, redovno zalivane (bez prihranjivanja), kako bi se održala povišena vlažnost, i čuvane u stakleniku na 21 °C. Kao kontrola korišćene su 8 reznice u 4 ponavljanja sorte Kaberne sovinjon inokulisane fragmentima sterilne PDA podloge. Osam nedelja od inokulacije vršena je ocena simptoma na lastarima korišćenjem skale od 0 (biljke bez simptoma), 1 (biljke sa par sitnih i osušenih listova), 2 (biljke sa većim brojem sitnih i osušenih listova), 3 (biljke sa jedva prisutnim listovima) i 4 (biljke sa osušenim lastarima). Oglad je postavljen metodom slučajnog blok sistema (**Péros and Berger, 1994**). Izračunavanje intenziteta oboljenja na lastarima vršeno je direktnom proporcijom broja obolelih liski na inokulisanim reznicama i broja liski na kontrolnim reznicama.

Podaci su obrađeni u statističkom programu ANOVA primenom Dankanovog testa stepena značajnosti 0,05.

U cilju ispunjavanja Kohovih postulata sa biljaka na kojima su se razvili simptomi, izvršena je reizolacija i dobijanja monosporijalnih kultura reizolata korišćenjem istih metoda kao pri izolaciji.

Inokulacija ukorenjenih reznica vinove loze. Prema metodi **Sosnowski et al. (2007a)** vršena je inokulacija ukorenjenih reznica sorte Kaberne sovignon u uslovima staklenika Instituta za Krmno bilje u Kruševcu. Reznice za ovaj ogled posađene su godinu dana ranije u supstrat (Klasman 1) u crne plastične kese dimenzija 12 x 12 x 30 cm. Na proleće prve i druge godine biljke su prihranjivane sa veštačkim đubrivom NPK (15 : 15 : 15) u količini od 2 g po biljci. Potom su orezivane na dva pupoljka kako bi se smanjio broj novih lastara u oba vegetaciona perioda da bi se olakšalo održavanje biljaka i da bi se lakše izvršila ocena simptoma na lastarima.

Pre početka vegetacije ukorenjene biljke vinove loze inokulisane su tako što je skalpelom zasecano stablo u dužini od 5 mm u koji je ubacivan komadić micelije kulture *E. lata* stare 10 dana odgajene na PDA. Mesto inokulacije potom je obavijano parafilm trakom. Inokulisano je po 4 biljke u 2 ponavljanja. Kao kontrola korišćene su 4 biljke u 2 ponavljanja sorte Kaberne sovignon inokulisane fragmentima sterilne PDA podloge. Inokulisane biljke zalivane su po potrebi. Do očitavanja rezultata, koje je vršeno 8 i 27 meseci nakon inokulacije, biljke su čuvane u stakleniku do prvih viših temperatura, kada su iznošene napolje. Takođe, praćena je i pojava nekroze na stablu inokuliranih biljaka tako što su biljke vađene iz supstrata, nožem je odstranjivana kora sa drveta i merena dužina nekroze tkiva.

Proračun intenziteta simptoma na lastarima vršen je na osnovu razlike u dužini lastara na inokuliranim biljkama i dužine lastara na kontrolnim biljkama. Podaci su obrađeni u statističkom programu ANOVA primenom Dankanovog testa stepena značajnosti (p) 0,05.

U cilju ispunjavanja Kohovih postulata i u ovom ogledu obavljena je reizolacija na već opisan način 27 meseci nakon inokulacije.

Nakon potvrđivanja patogenosti izolata na reznicama vinove loze, pristupilo se izboru izolata čije će osobine biti detaljnije proučavane i na osnovu čega će biti obavljena njihova identifikacija. Od ukupno 47 izolata, za dalja ispitivanja patogenih, morfoloških, odgajivačkih i molekularnih osobina odabrano je 14 izolata *Eutypa* sp. različitog porekla (Tabela 2).

U komparativna proučavanja uključena su i 2 referentna izolata dobijena iz kolekcije fitopatogenih gljiva dr Pascal Lecomte-a (Institute National de la Recherche Agronomique, INRA, France). Ovi izolati označeni su šiframa 8F (izolovan iz

nepoznate sorte vinove loze u Veroni, Italija) i BX1.10 (iz drveta vinove loze sorte Kaberne sovinjon u Bordou, Francuska).

Tabela 2. Izolati odabrani za dalja istraživanja

R.b.	Izolat	Okrug	Lokalitet	Sorta	Godina izolacije
1	EL17	Pomoravski	Dobričevo, Čuprija	Kaberne Sovinjon	2004.
2	EL27	Nišavski	Praskovče, Ražanj	Rkaciteli	2004.
3	EL29	Rasinski	Kobilje, Kruševac	Prokupac	2005.
4	EL30	Pomoravski	Drenovac, Paraćin	Rizling rani	2005.
5	EL150	Rasinski	Tulež, Aleksandrovac	Burgundac crni	2006.
6	EL151	Rasinski	Bela voda, Kruševac	Italijanski rizling	2006.
7	EL152	Rasinski	Krvavica, Kruševac	Burgundac crni	2007.
8	EL153	Rasinski	Suvaja, Varvarin	Italijanski rizling	2007.
9	EL154	Južnobački	Sremski Karlovci	Sovinjon	2008.
10	EL155	Južnobanatski	Gudurica, Vršac	Šardone	2008.
11	EL156	Rasinski	Trnavci, Aleksandrovac	Frankovka	2009.
12	EL157	Borski	Karbulovo, Negotin	Šardone	2009.
13	EL158	Nišavski	Lipovac, Ražanj	Kardinal	2010.
14	EL199	Pčinjski	Strezovce, Preševo	Italijanski rizling	2010.
15	8F	Verona, Italija	Verona, Italija	Nepoznata	1988.
16	BX1.10	Bordo, Francuska	Bordo, Francuska	Kaberne Sovinjon	1990.

4.4. Proučavanje morfoloških odlika izolata *Eutypa* sp.

U ovom radu proučavane su makroskopske i mikroskopske morfološke odlike 14 izolata izolovanih tokom izrade ove doktorske disertacije i 2 referentna izolata. Od makroskopskih odlika opisane su karakteristike kolonija kao što su izgled, boja i zoniranost lica i naličja kulture desetog dana od zasejavanja (**Muntanola-Cvetković, 1987**).

Od mikroskopskih morfoloških karakteristika proučavani su izgled micelije, prisustvo bespolnog (konidije, piknidi, konidiofore) i polnog razmnožavanja (peritecije, askusi, askospore).

4.4.1. Makroskopske morfološke odlike ispitivanih izolata

Makroskopske morfološke odlike 14 izolata *Eutypa* sp. i 2 referentna izolata *E. lata* proučavane su na PDA podlozi, maltoznom agaru (Maltose Agar, MA) (30 g maltoze, 18 g agara i 1 l destilovane vode), podlozi od lastara vinove loze (Grape Wood Agar, GWA) (300 g iseckanih drvenastih lastara vinove loze, 18 g agara i 1 l destilovane vode) i vodenom agru (Water Agar, WA) prema metodi **Glawe et al. (1982)**. Posmatran je izgled, boja i zoniranost lica i naličja kulture, zatim izgled, struktura, boja i porast micelije.

Zasejavanje proučavanih izolata na podloge vršeno je aseptičnim nanošenjem okruglih fragmenata kolonija čistih kultura proučavanih izolata prečnika 10 mm, u centar Petri kutija, koje su potom gajene pri temperaturi od 25 °C, i pod uticajem 24 h UV svetla u trajanju od 30 dana.

4.4.2. Mikroskopske morfološke odlike ispitivanih izolata

Mikroskopske morfološke odlike odabranih izolata *Eutypa* sp. proučavane su na PDA, MA, GWA i WA podlogama prema metodi **Glawe et al. (1982)**, posmatranjem pod svetlosnim mikroskopom reproduktivnih tvorevina patogena pravljenjem privremenih mikroskopski preparata.

Kod svih 14 izolata *Eutypa* sp. i 2 referentna izolata *E. lata* proučavani su oblik i dimenzije konidija. Proučavanje oblika konidija obavljeno je posmatranjem 100 slučajno odabranih konidija proučavanog izolata, pomoću mikroskopa pri uvećanju 400 puta (Olimpus BX51/BX52, Japan) i digitalne kamere (Olimpus DP71, Japan).

Prosečne dimenzije konidija određene su merenjem dužine i širine po 100 slučajno odabranih konidija proučavanih izolata gljive, gajenih na PDA podlozi pomoću svetlosnog mikroskopa i digitalne kamere. Podaci su obrađeni u statističkom programu ANOVA primenom Dankanovog testa stepena značajnosti (p) 0,05.

Klijanje konidija proučavanih izolata praćeno je korišćenjem 2 metode, po **Ju et al. (1991)** i po **Belarbi and Mur (1983)**. Metoda po **Ju et al. (1991)** podrazumeva gajenje kolonija *Eutypa* sp. na 2% PDA podlozi sa dodatkom 5 g/l kvašćevog ekstrakta (Yeast Potato Dextrose Agar, YPDA). Zasejane kulture ispitivanih izolata gajene su pri

svetlosnom režimu 12 h tama i 12 h UV svetla u periodu od 30 dana pri temperaturi od oko 20 °C. Nakon 30 dana pojavile su se prve konidije. Minimalna konidijalna masa presejavana je sterilnom bakteriološkom iglom u centar Petri kutije sa YPDA podlogom. Dodavanjem male količine sterilne vode i nežnim mešanjem su razmeštane konidije po površini Petri šolje. Očitavanje rezultata vršeno je nakon 2, a najkasnije 4 dana od zasejavanja. Posmatrano je 100 slučajno izabranih konidija korišćenjem mikroskopa.

Metoda prema **Belarbi and Mur-u (1983)** podrazumeva gajenje ispitivanih izolata (EL17, EL27, EL29, EL30, 8F i BX1.10) na četiri podloge (PDA, MA, GWA, WA) pod uticajem kontinuiranog UV svetla. Uzeti su gore navedeni izolati jer su se pokazali najagresivnijim u testovima patogenosti. Nekoliko kapi konidijske suspenzije svakog proučavanog izolata uzimano je sterilnom ezom i stavljano u kapi sterilne vode na mikroskopske pločice. Ovako pripremljeni preparati držani su 15 dana u uslovima vlažne komore, pod uticajem kontinuiranog UV svetla. Da nebi došlo do isušivanja, redovno je vršeno vlaženje pločica sterilnom vodom. Posmatrano je po 100 slučajno izabranih konidija. Podaci su obrađeni u statističkom programu ANOVA primenom Dankanovog testa stepena znašajnosti (p) 0,05.

4.4.3. Formiranje teleomorfnog stadijuma

Za praćenje formiranja teleomorfnog stadijuma 14 proučavanih izolata *Eutypa* sp. i 2 referentna izolata *E. lata* gajeno je na PDA podlozi, kulture su gajene u debljem sloju (40 ml podloge po Petri šolji prečnika 100 mm), pri temperaturi od 25 °C u uslovima smene dana i noći. Očitavanje prisustva teleomorfni tvorevina vršeno je nakon 30 dana, 6 i 12 meseci.

Praćenje pojave teleomorfa vršeno je i u prirodi. Nakon skidanja kore sa mrtvog drveta prirodno zaraženih biljaka vinove loze, isecani su fragmenti mrtvog drveta i pod binokularom (Olympus SYX7, DFPLAPO 1 x 4) posmatrano je prisustvo strome sa peritecijama.

4.5. Proučavanje odgajivačkih odlika izolata *Eutypa* sp.

4.5.1. Uticaj različitih podloga na razvoj i sporulaciju pručavanih izolata *Eutypa* sp.

Za proučavanje uticaja različitih podloga na radijalni porast i sporulaciju izolata *Eutypa* sp. (Tabela 2) korišćene su sledeće podloge: PDA, MA, GWA, kvašćev agar (Yeast Agar, YA), WA i paradajz agar (Tomato Agar, TA).

Podloga od Kvašćevog agara, YA pripremljena je prema sledećoj recepturi: 4 g ekstrakta kvasca (Torlak, Institut za imunologiju i virusologiju, Beograd), 17 g agara i 1 l destilovane vode (**Dhingra and Sinclair, 1995**). Paradajz agar, TA pripremljena je prema sledećoj recepturi: 250 ml ekstrakta paradajza, 18 g agara i 1 l destilovane vode (**Dhingra and Sinclair, 1995**).

Zasejavanje pručavanih izolata gljive na podloge vršeno je aseptičnim nanošenjem okruglih fragmenata prečnika 4 mm čistih kultura pručavanih izolata, u centar Petri kutija pomoću kopljaste igle. Zasejane Petri kutije potom su gajene u termostatu pri temperaturi od 25 °C, bez prisustva svetlosti.

Izgled i boja vazdušne micelije, izgled ivice kolonije i zoniranje opisano je desetog dana od zasejavanja korišćenjem terminologije **Glawe et al. (1982)**.

Porast micelije praćen je merenjem prečnika kolonije tokom 10 dana dok prvi izolat nije u potpunosti prekrrio Petri kutiju.

Određivanje nivoa sporulacije, odnosno broja konidija/ml suspenzije, vršeno je pomoću hemocitometra po Thom-u sa 16 polja, čija je veličina 1 mm², a dubina 0,2 mm. Broj konidija je određivan s ciljem da se utvrde razlike u intenzitetu sporulacije 16 izolata *Eutypa* sp. pručavanih u ovom radu. Za tu svrhu pripremana je suspenzija spora, tako što je 5 ml destilovane vode dodato u Petri kutiju sa kulturom pručavanih izolata *Eutypa* sp. Dobijena suspenzija konidija zajedno sa fragmentima micelije presipana je u čistu epruvetu, a potom ceđena kroz polietilensku mrežu da bi se odstranili fragmenti micelije. Brojanje je izvršeno u 2 x 16 ponavljanja (32 polja), a iz toga je izračunavan prosečan broj konidija po 1 mm². Ovako dobijen broj konidija uziman je za izračunavanje gustine spora u 1 cm³ (1 ml) suspenzije prema formuli:

$$N = n \times 5 \times 1000$$

gde je: N - broj spora u 1 ml suspenzije (gustina spora /1ml), n - prosečan broj spora na 1 mm². Gustina spora se dobija množenjem prosečnog broja spora sa brojem 5 (jer je dubina jamica 0,2 mm), da bi se dobio broj spora u 1 mm³, a zatim se dobijeni broj množi sa 1000, pošto je u 1 cm³ sadržano 1000 mm³, da bi se dobila gustina spora u zapremini od 1 cm³ (1 ml).

Broj konidija po 1 mm² kolonije određen je na osnovu broja konidija/ml i površine kolonije, koja je izračunata iz proporcije težine papira na kome su ocrtane konture kolonija i težine papira površine 1 dm² (Trkulja, 2003).

Ogled je postavljen u pet ponavljanja. Fotografisanje rezultata oglada vršeno je desetog dana, kao i 30 dana, 60 i 90 dana od zasejavanja. Kao kontrola korišćena su 2 referentna izolata, 8F i BX1.10. Podaci su obrađeni u statističkom programu ANOVA primenom Dankanovog testa stepena značajnosti 0,05.

4.5.2. Uticaj svetlosti na razvoj i sporulaciju proučavanih izolata *Eutypa* sp.

Za ispitivanje uticaja različitih varijanti veštačke fluorescentne svetlosti i tame na porast kolonija i sporulaciju proučavanih izolata *Eutypa* sp. korišćene su čiste kulture 14 izolata i 2 referentna izolata *E. lata* gajenih na PDA pri temperaturi od 25 °C. Zasejane Petri kutije su potom izlagane uticaju 3 varijante veštačke fluorescentne svetlosti i tame, i to:

- 1) 24 h izlaganje uticaju UV svetla (UV);
- 2) alternativno, 12 h UV i 12 h tama (UV - T);
- 3) alternativno, 12 h veštačko fluorescentno svetlo i 12 h tama (S - T).

Kao izvor fluorescentne svetlosti služile su 3 sijalice od 40 W, a kao izvor ultraljubičaste svetlosti poslužile su 2 UV sijalice, sa svetlošću talasne dužine od 366 nm, koje su bile udaljene oko 50 cm od Petri kutija.

Porast micelije praćen je merenjem prečnika kolonije tokom 10 dana dok prvi izolat nije u potpunosti prekrpio Petri kutiju, kao i broj konidija po mm² kolonije određeni su na ranije opisani način. Ogled je postavljen u pet ponavljanja. Fotografisanje rezultata oglada vršeno je 30 dana posle zasejavanja podloge. Kao kontrola korišćena su 2 referentna izolata, 8F i BX1.10. Ovako dobijeni podaci su

obrađivani u statističkom programu ANOVA, primenom Dankanovog testa stepena značajnosti 0,05.

4.6. Molekularna detekcija i identifikacija

Detekcija i delimična molekularna karakterizacija 14 izolata *Eutypa* sp. iz Srbije i 2 referentna izolata *E. lata* obavljena primenom metode lančane reakcije polimeraze (Polymerase Chain Reaction, PCR). Ekstrakcija DNK ispitivanih izolata izvršena je primenom protokola **Day and Shattock (1997)**. Primenom 1 para specifičnih prajmera i 3 para univerzalnih prajmera sprovedene su četiri odvojene PCR reakcije. Takođe je primenjen protokol za detekciju vrste *E. lata* u okviru roda *Eutypa* korišćenjem RFLP metode (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP), gde su umnoženi PCR proizvodi podvrgnuti digestiji restrikcijom enzimom. Vizuelizacija dobijenih produkata izvršena je elektroforetskim razdvajanjem u agaroznom gelu.

4.6.1. Ekstrakcija DNK

Kolonije ispitivanih izolata gajene su na PDA u mraku, pri temperaturi od 25 °C u trajanju od 7 dana. Ekstrakcija DNK urađena je po metodi koju su opisali **Day and Shattock (1997)**. U prvom koraku, kolonije ispitivanih izolata sterilnom špatulom su sastrugane sa površine podloge i prenete u 2 ml tubice sa tečnim azotom. Po isparenju tečnog azota, u tubicu je naliveno 800 µl 2% CTAB pufera i inkubirano 1 h pri 65 °C. Tokom inkubacije, na svakih 15 min sadržaj tubice je snažno promućkan. Po inkubaciji, u svaku mikrotubu dodavano je 800 µl hloroforma i vorteksovano, a zatim centrifugirano 10 min pri 11000 rpm i temperaturi 4°C (Eppendorf 5804 R, Nemačka). Dobijeni supernatant (oko 700 µl) pipetiranjem je prebačen u novu tubicu zapremine 1,5 ml, dodato je oko 420 µl izopropanola i centrifugirano 15 min pri 11000 rpm i 4 °C. Po centrifugiranju, supernatant je pažljivo odliven, a u tubice je dodavano po 1ml ledeno-hladnog 70% etanola, koji je potom pažljivo odliven. Otvorene mikrotube su ostavljene 10-15 minuta pri sobnoj temperaturi. Po sušenju, DNK talog je resuspendovan u 100 µl TE pufera.

4.6.2. Lančano umnožavanje fragmenata nukleinske kiseline

Za detekciju i identifikaciju proučavanih izolata *Eutypa* sp. primenjene su četiri PCR reakcije i to korišćenjem sledećih parova prajmera prikazanih u Tabeli 3. i to: ITS1-ITS4 koji umnožavaju ITS region rDNK eukariota, T1-Bt2b za umnožavanje regiona proteinskog nuklearnog gena β -tubulin, RPB2-7F-RPB2-11aR korišćen je za umnožavanje DNK zavisne RNK polimeraze II (RPB2), kao i specifičan par prajmera Lata 1 i Lata 2.2.

PCR amplifikacija uzoraka izvedena je u termosajkleru (Mastercycler® Eppendorf, Nemačka).

Tabela 3. Pregled prajmera korišćenih za detekciju *Eutypa* sp.

Ciljana sekvenca	Naziv prajmera	Sekvence 5'-3'	Veličina fragmenta	Literarni izvor
ITS Eukariota	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	~574 bp	White et al. (1990)
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		
β -tubulin	T1	AACATGCGTGAGATTGTAAGT	780 bp	O'Donnell and Cigelnik (1997)
	Bt2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	780 bp	Glass and Donaldson (1995)
RPB2	RPB2-7F	ATGGG(G/T)AAGCA(G/A)GC(T/A)ATG GG	~820 bp	Liu et al. (1999)
	RPB2-11aR	GTG(T/A)AT(C/T)TT(G/A)TC(G/A)TC (C/A)ACC		
ITS1- ITS2	Lata 1	GAGCTACCCTGTAGCCCGCTG	~385 bp	Lecomte et al. (2000)
	Lata 2.2	GACGTCAGCCGTGACACACC		

Univerzalni prajmeri ITS1-ITS4 omogućavaju ITS regiona ribozomalne DNK eukariota koji obuhvata region ITS1, ITS2 i 5.8S rDNK. ITS region je visoko varijabilan između morfološki različitih gljiva, a sa druge strane konzervativan na nivou vrste i kod mnogih rodova fitopatogenih gljiva koristi se za filogenetske analize. Kako je ITS1-ITS4 par prajmera koji može da amplifikuje ITS region svih eukariota, može da se koristi za proveru uspešnosti ekstrakcije DNK ispitivanih izolata (**Lecomte et al., 2000**). PCR miks zapremine 25 μ l sadržao je: 12,5 μ l 2 \times Master mix, 9 μ l sterilne destilovane H₂O, po 1 μ l 10 mM ITS1 i ITS4 prajmera i 1,5 μ l DNK. PCR amplifikacija uzoraka izvedena prema sledećem programu: početna denaturacija pri 94 °C u trajanju d 5 minuta, 30 ciklusa denaturacije pri 94 °C u trajanju od 1,5 min, vezivanje prajmera pri

55 °C u trajanju od 2 min i elongacija prajmera pri 72 °C u trajanju od 3 min. Finalna elongacija odigrala se pri 72 °C u trajanju od 10 min. Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava produkta veličine od oko 574 bp.

Prajmeri T1-Bt2b omogućavaju amplifikaciju dela proteinskog nuklearnog gena β -tubulina, umnožavanjem fragmenta od oko 800 bp (Tabela 2) (**Trouillas and Gubler, 2010**). PCR miks zapremine 25 μ l sadržao je: 2,5 μ l 10 \times PCR pufera, 2,5 μ l dNTPs 2,5 mM, po 0,25 μ l 10 μ M T1 i Bt2b prajmera, 2 μ l 25 mM MgCl₂, 16,3 μ l H₂O, 0,2 μ l Taq polimeraze i 1 μ l DNK. PCR amplifikacija uzoraka izvedena je prema sledećem programu: početna denaturacija pri 94°C u trajanju od 5 minuta, 35 ciklusa denaturacije pri 94 °C u trajanju od 45 s, vezivanje prajmera pri 58 °C u trajanju od 45 s i elongacija prajmera pri 72 °C u trajanju od 60 s. Finalna elongacija pri 72°C u trajanju od 5 min.

Prajmeri RPB2-7F-RPB2-11aR omogućavaju amplifikaciju dela proteinskog nuklearnog gena RPB2 (DNA-dependant RNA polymerase II (RPB2) genes), veličine oko 820 bp (**Trouillas and Gubler, 2010**). PCR reakciona smeša od 25 μ l sadržala je 2,5 μ l 10 \times DreamTaq Buffer, 2,5 μ l 2,5mM dNTPs, 0,75 μ l svakog 10 μ M prajmera, 1,5 μ l 25mM MgCl₂, 0,25 μ l DreamTaq DNA Polymerase (5U/ μ l, Fermentas, Litvanija), 12,75 μ l H₂O i 4 μ l DNA. PCR amplifikacija uzoraka je izvedena prema sledećem programu: početna denaturacija pri 95°C u trajanju od 5 minuta, 30 ciklusa (denaturacija pri 95°C u trajanju od 1 min.; vezivanje prajmera pri 55°C u trajanju od 2 min. i elongacija prajmera pri 72°C u trajanju od 2 min.), finalna elongacija pri 72°C u trajanju od 10 min.

Prajmeri Lata 1-Lata 2.2 omogućavaju amplifikaciju fragmenta u ITS1 i ITS2 regionu. Ovaj par prajmera služi za specifičnu detekciju vrste *Eutypa lata* umnožavanjem fragmenta od oko 385 bp koji je lociran u ITS1 i ITS2 regionu (**Lecomte et al., 2000**). PCR miks zapremine 25 μ l sadržao je: 12,5 μ l 2 \times Master mix, 9 μ l sterilne destilovane H₂O, po 1 μ l 10 μ M Lata 1 i Lata 2.2 prajmera i 1,5 μ l DNK. PCR amplifikacija uzoraka je izvedena prema istom programu kao i sa prajmerima ITS1-ITS4. Kao negativna kontrola u svim PCR reakcijama korišćena je sterilna voda (PCR grade) umesto ciljane DNK uzorka (PCR smeša sa RNase-free vodom).

U svim PCR reakcijama, kao pozitivne kontrole, korišćeni su i referentni izolati *E. lata* iz međunarodnih kolekcija.

4.6.3. Detekcija i identifikacija primenom PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism)

PCR produkti dobijeni korišćenjem para prajmera ITS1-ITS4 (ITS1/5.8S/ITS2 region) dalje su analizirani digestijom *AluI* restrikcionim enzimom u cilju specifične detekcije na osnovu DNK profila koje formiraju različite vrste (Rolshausen et al., 2004). PCR proizvodu u zapremini od 25 μ l dodato je 3 μ l 10 \times enzim pufera i 2 μ l restrikcionog enzima *AluI*, a inkubacija u termosajkleru pri 37°C trajala je 60 min. RFLP-PCR proizvodi analizirani su elektroforezom u 1,5% agaroznom gelu i 0,5 \times TBE puferu. Vizuelizacija i analiza produkata PCR-RFLP reakcije vršena je pod istim uslovima kao kod PCR reakcija.

4.6.4. Vizuelizacija i analiza produkata PCR reakcije

Analiza PCR i PCR-RFLP proizvoda urađena je nakon elektroforetskog razdvajanja dobijenih produkata u 1,5% agaroznom gelu i 0,5 \times TBE puferu. Agarozni gel pripremljen je rastvaranjem 3,6 g agaroze (Merck, Nemačka) u 240 ml 0,5 \times TBE pufera i zagrevanjem do temperature ključanja u mikrotalasnoj pećnici. Nakon hlađenja, gel je razliven u kalupe aparata za elektroforezu (Serva, Nemačka). U gel je uronjen češalj postavljanim u odgovarajuća ležišta kalupa. Nakon polimerizacije gela češalj je izvađen i kalup sa gelom je postavljen u aparat za elektroforezu. U aparat je doliven 0,5 \times TBE pufer do nivoa gde je gel potpuno potopljen u pufer.

Pre pipetiranja u bunarčice, 5 μ l produkta PCR reakcije svakog uzorka pomešano je sa 1,5 μ l boje za nalivanje (Loading dye, MBI fermentas, Litvanija). Pri elektroforezi korišćen je marker 50 bp ladder (Sigma Aldrich, Nemačka), radi određivanja veličine produkata poređenjem sa očekivanom veličinom DNK fragmenata markera.

Elektroforeza je obavljena pri naponu od 100 V tokom 30 minuta. Bojenje je urađeno potapanjem agaroznog gela u 0,5 μ g/ml rastvoru etidijum-bromida u trajanju od 15 minuta. Amplifikovani fragmenti u gelu posmatrani su pod UV svetlom pomoću transiluminatora (Biometra, Velika Britanija).

4.6.5. Sekvenciranje dela genoma odabranih izolata

U cilju što potpunije identifikacije ispitivani izolati podeljeni su u grupe, pri čemu je svaka grupa identifikovana na osnovu drugog genetskog regiona, odnosno za sekvenciranje fragmenta koji obuhvata ITS1, ITS2 i 5.8S rDNK region genoma odabrano je pet izolata: EL17, EL27, EL29, EL153 i EL199. Za sekvenciranje dela proteinskog nuklearnog gena β -tubulin odabrano je šest izolata: EL27, EL30, EL151, EL154, EL155 i EL157. Za sekvenciranje navedenog fragmenta rađena je PCR reakcija sa prajmerima T1 i Bt2b. Takođe, za sekvenciranje dela proteinskog nuklearnog gena RPB2 odabrano je pet izolata: EL27, EL150, EL152, EL156 i EL158. Za sekvenciranje navedenog fragmenta rađena je PCR reakcija sa prajmerima RPB2-7F i RPB2-11aR.

Nakon umnožavanja i dobijanja jednog amplikona bez nespecifičnih fragmenata, svi dobijeni amplikoni poslani su na uslužno sekvencioniranje u MacroGen (Amsterdam, Holandija). Sekvenciranje je obavljeno sa istim prajmerima kao i amplifikacija, a obavljeno je u oba pravca.

4.6.6. Molekularna identifikacija i karakterizacija

Molekularna identifikacija odabranih izolata *Eutypa* sp., poreklom iz Srbije obavljena je, nakon sekvenciranja 2 nuklearna dela genoma, višestrukim uparivanjem sa sekvencama drugih gljiva dostupnih u GenBank bazi podataka i proračunom genetičke sličnosti. Nakon dobijanja sekvenci gena za sekvence ITS genomnog regiona 4 ispitivana izolata (EL17, EL27, EL29, EL153 i EL 199) i 6 ispitivanih izolata (EL27, EL30, EL151, EL154, EL155 i EL157) za proteinski nuklearni gen β -tubulin, zatim 5 ispitivanih izolata (EL27, EL150, EL152, EL156 i EL158) za nuklearni gen RPB2, kao i njihove obrade, međusobno su upoređivane sa odgovarajućim sekvencama koje su dostupne u međunarodnoj GenBank bazi podataka (Tabela 4).

Nakon dobijanja sekvenci proučavanih izolata i njihove obrade u programu Bioedit sequence alignment editor (version 7.0.5.3) (Hall, 1999), one su upoređene međusobno, kao i sa odgovarajućim sekvencama koje su dostupne u GenBank međunarodnoj bazi podataka (NCBI-National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, SAD).

Primenom BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) analize i višestrukim poređenjem dobijenih sekvenci sa dostupnim sekvencama odgovarajućih genomnih delova u GenBank bazi podataka ([http:// blast.GenBank.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.GenBank.nlm.nih.gov/Blast.cgi)) pomoću CLUSTAL W programa (Thompson et al., 1994), obavljena je potvrda identifikacije dobijenih sekvenci. Za proračun genetičke udaljenosti i najviši stepen nukleotidne sličnosti, nakon trimovanja sekvenci na dužinu najkraće sekvence upotrebljen je softverski paket MEGA verzija 5.0. (Tamura et al., 2011).

Filogenetska stabla rekonstruisana su pomoću odgovarajućih metoda korišćenjem distance-matrix metode (Neighbor Joining, NJ), a za proveru pouzdanosti rekonstruisanog filogenetskog stabla sproveden je bootstrap test od 1000 ponavljanja.

Dalja molekularna karakterizacija proučavanih izolata obavljena je rekonstrukcijom filogenetskih stabala koja pokazuju evolutivnu međupovezanost ispitivanih izolata *Eutypa* sp. iz Srbije sa izolatima iz drugih delova sveta (Tabela 4).

Filogenetska analiza vrsta u okviru roda *Eutypa* obavljena je na osnovu kombinacije DNK sekvenci ITS regiona. Za ova ispitivanja odabrane su sekvence izolata koje su identifikovane kao *E. lata* EL17, EL27, EL29, EL153 i EL199. Za rekonstrukciju filogenetskog stabla na osnovu DNK sekvenci ITS regiona uključeno je 33 izolata različitih filogenetskih vrsta unutar roda *Eutypa*, poreklom iz različitih delova sveta (Tabela 4). Korišćenjem Maximum Parsimony metode konstruisano je filogenetsko stablo, integrisano unutar programa MEGA verzija 5.0 i bootstrap analize sa 1000 ponavljanja.

Za filogenetsku analizu sekvenci regiona proteinskog nuklearnog gena β -tubulin, odabrane su sekvence izolata identifikovanog kao *E. lata* i to: EL27, EL30, EL151, EL154, EL155 i EL157, upoređivanje je vršeno sa 41 dostupnom sekvencom *Eutypa* sp. (Tabela 4). Takođe, za filogenetsku analizu sekvenci regiona proteinskog nuklearnog gena RPB2, odabrane su sekvence izolata koje su identifikovane kao *E. lata* EL27, EL150, EL152, EL156 i EL158, upoređivanje je vršeno sa 13 dostupnih sekvenci *Eutypa* sp. (Tabela 4) (Trouillas and Gubler, 2010). Filogenetsko stablo konstruisano je korišćenjem Maximum Parsimony metode, integrisane unutar programa MEGA verzija 5.0 i bootstrap analize sa 1000 ponavljanja.

Tabela. 4. Kontrolni izolati korišćeni prilikom filogenetske analize u ovoj doktorskoj disertaciji

Vrsta gljive	Domaćin	Poreklo	Izolat	Gen bank pristupni broj			Literaturni izvor
				ITS rDNA	β -tubilin	RPB2	
<i>Eutypella vitis</i>	<i>Vitis vinifera</i> cv. <i>Cabernet Fr.</i>	SAD	UCD2277MO	HQ288222	/	/	Urbez-Torres <i>et al.</i> , 2012
<i>Eutypa lata</i>	<i>Vitis vinifera</i> cv. <i>Chardonnay</i>	SAD	UCD2263MO	HQ288220	/	/	Urbez-Torres <i>et al.</i> , 2012
<i>Eutypa lata</i>	<i>Vitis vinifera</i> cv. <i>Cabernet Fr.</i>	SAD	UCD2275MO	HQ288221	/	/	Urbez-Torres <i>et al.</i> , 2012
<i>Eutypa laevata</i>	<i>Salix</i> sp.	Švajcarska	CBS291.87	HM164737	HM164771	HM164805	Trouillas and Gubler, 2010
<i>Eutypa cf laevata</i>	<i>Salix lasiolepis</i>	SAD	DSA600	/	HM164772	HM164806	Trouillas and Gubler, 2010
<i>Eutypa lata</i> var. <i>aceri</i>	<i>Acer pseudoplatanus</i>	Švajcarska	CBS290.87	HM164736	HM164770	HM164804	Trouillas and Gubler, 2010
<i>Eutypa lata</i> var. <i>aceri</i>	<i>Acer campestre</i>	Francuska	CBS217.87	/	HM164768	HM164802	Trouillas and Gubler, 2010
<i>Eutypa petrakii</i> var. <i>petrakii</i>	<i>Prunus spinosa</i>	Švajcarska	CBS244.87	HM164735	HM164769	/	Trouillas and Gubler, 2010
<i>Eutypa lata</i>	<i>Vitis vinifera</i> cv. <i>Cabernet Sau.</i>	Francuska	BX 1-10	AF099911	/	/	Lecomte <i>et al.</i> , 2000
<i>Eutypa lata</i>	<i>Salix</i> sp.	SAD	WILLOWC	HM164731	HM164765	/	Trouillas and Gubler, 2010
<i>Eutypa lata</i>	<i>Salix cf lasiolepis</i>	SAD	DCHR100	/	HM164750	/	Trouillas and Gubler, 2010
<i>Eutypa lata</i>	<i>Salix cf lasiolepis</i>	SAD	DCHR200	/	HM164751	/	Trouillas and Gubler, 2010
<i>Eutypa lata</i>	<i>Salix</i> sp.	SAD	DSA 500	/	HM164762	/	Trouillas and Gubler, 2010
<i>Eutypa lata</i>	<i>Salix</i> sp.	SAD	DSA 400	/	HM164761	/	Trouillas and Gubler, 2010
<i>Eutypa lata</i>	<i>Salix</i> sp.	SAD	DSA200	/	HM164760	/	Trouillas and Gubler, 2010
<i>Eutypa lata</i>	<i>Prunus avium</i>	SAD	DJAM100	/	HM164753	/	Trouillas and Gubler, 2010
<i>Eutypa lata</i>	<i>Prunus avium</i>	SAD	DCS100	/	HM164763	/	Trouillas and Gubler, 2010
<i>Eutypa lata</i>	<i>Prunus avium</i>	SAD	DMUNK100	/	HM164754	/	Trouillas and Gubler, 2010
<i>Eutypa lata</i>	<i>Prunus armeniaca</i>	SAD	DRO100	/	HM164758	/	Trouillas and Gubler, 2010
<i>Eutypa lata</i>	<i>Prunus armeniaca</i>	SAD	DAP100	/	HM164747	HM164781	Trouillas and Gubler, 2010
<i>Eutypa lata</i>	<i>Pyrus communis</i>	SAD	DPEAR200	/	HM164757	/	Trouillas and Gubler, 2010

Legenda: / nepoznat

Tabela. 4. Kontrolni izolati korišćeni prilikom filogenetske analize u ovoj doktorskoj disertaciji (nastavak)

Vrsta gljive	Domaćin	Poreklo	Izolat	Gen bank pristupni broj			Literaturni izvor
				ITS rDNA	β -tubulin	RPB2	
<i>Eutypa lata</i>	<i>Pyrus communis</i>	SAD	DPEAR100	HM164722	HM164756	/	Trouillas and Gubler, 2010
<i>Eutypa lata</i>	<i>Aesculus californica</i>	SAD	DCHES200	/	HM164766	/	Trouillas and Gubler, 2010
<i>Eutypa lata</i>	<i>Malus</i> sp.	SAD	DNA100	/	HM164755	/	Trouillas and Gubler, 2010
<i>Eutypa lata</i>	<i>Acer macrophyllum</i>	SAD	DCA200	/	HM164752	/	Trouillas and Gubler, 2010
<i>Eutypa lata</i>	<i>Vitis vinifera</i>	SAD	DCA700	/	HM164748	HM1647482	Trouillas and Gubler, 2010
<i>Eutypa lata</i>	<i>Vitis vinifera</i>	SAD	DCA900	/	HM164749	HM1647483	Trouillas and Gubler, 2010
<i>Eutypa lata</i>	<i>Nerium oleander</i>	SAD	OLEA3	HM164733	HM164767	HM164801	Trouillas and Gubler, 2010
<i>Eutypa lata</i>	<i>Vitis vinifera</i>	Španija	JL600	JN975345	/	/	Gramaje <i>et al.</i> , 2012
<i>Eutypa lata</i>	<i>Vitis vinifera</i>	SAD	UCD732SJ	/	HM164742	/	Trouillas and Gubler, 2010
<i>Eutypa lata</i>	<i>Vitis vinifera</i>	SAD	UCD795St	/	HM164744	HM164778	Trouillas and Gubler, 2010
<i>Eutypa lata</i>	<i>Vitis vinifera</i>	SAD	UCD715SJ	/	HM164741	HM164775	Trouillas and Gubler, 2010
<i>Eutypa lata</i>	<i>Vitis vinifera</i>	SAD	UCD379St	/	HM164739	HM164773	Trouillas and Gubler, 2010
<i>Eutypa lata</i>	<i>Vitis vinifera</i>	SAD	UCD400Mo	/	HM164740	/	Trouillas and Gubler, 2010
<i>Eutypa lata</i>	<i>Vitis vinifera</i>	SAD	UCD401Mo	/	/	HM164774	Trouillas and Gubler, 2010
<i>Eutypa lata</i>	<i>Vitis vinifera</i>	SAD	UCD777St	/	HM164743	HM164777	Trouillas and Gubler, 2010
<i>Eutypa lata</i>	<i>Vitis vinifera</i>	SAD	EAMS100	/	HM164764	/	Trouillas and Gubler, 2010
<i>Eutypa lata</i>	<i>Frangula alnus</i>	Švajcarska	3802	/	HM164745	/	Trouillas and Gubler, 2010
<i>Eutypa lata</i>	<i>Hedera helix</i>	Švajcarska	1908021	/	HM164746	/	Trouillas and Gubler, 2010
<i>Eutypa lata</i>	<i>Picea abies</i>	Litvanija	N15	FJ903370	/	/	Arhipova <i>et al.</i> , 2011
<i>Eutypa lata</i>	<i>Vitis vinifera</i>	Španija	JL744	JN975359	/	/	Gramaje <i>et al.</i> , 2012
<i>Eutypa lata</i>	<i>Prunus dulcis</i>	Španija	ELA-1	JN183853	/	/	Gramaje <i>et al.</i> , 2012

Legenda: / nepoznat

Tabela. 4. Kontrolni izolati korišćeni prilikom filogenetske analize u ovoj doktorskoj disertaciji (nastavak)

Vrsta gljive	Domaćin	Poreklo	Izolot	Gen bank pristupni broj			Literaturni izvor
				ITS rDNA	β -tubulin	RPB2	
<i>Eutypa lata</i>	<i>Prunus dulcis</i>	SAD	DRUSS100	/	HM164759	/	Trouillas and Gubler, 2010
<i>Eutypa lata</i>	<i>Ribes rubrum</i>	Holandija	PD06032053	GU071110	/	/	Wenneker <i>et al.</i> , 2011
<i>Eutypa lata</i>	/	SAD	D-Ap-100	/	AY684214	/	Trouillas and Gubler, 2004
<i>Eutypa lata</i>	/	SAD	D-Jam-100	/	AY684213	/	Trouillas and Gubler, 2004
<i>Eutypa lata</i>	/	SAD	D-Hb-2002	/	AY684215	/	Trouillas and Gubler, 2004
<i>Eutypa lata</i>	<i>Vitis sp.</i>	SAD	CA38 (E38)	AY462541	/	/	Catal <i>et al.</i> , 2007
<i>Eutypa lata</i>	<i>Vitis sp.</i>	SAD	CA31 (E31)	AY462540	/	/	Catal <i>et al.</i> , 2007
<i>Eutypa lata</i>	<i>Vitis vinifera cv. Cabernet Sau.</i>	Novi Zeland	12-38-7EX4.6	AY662393	/	/	VanderGheynst <i>et al.</i> , 2004
<i>Eutypa lata</i>	<i>Vitis vinifera cv. Cabernet Sau.</i>	Novi Zeland	12-38-7EX3	AY662392	/	/	VanderGheynst <i>et al.</i> , 2004
<i>Eutypa lata</i>	<i>Vitis vinifera cv. Chardonnay</i>	Australija	CSU-07-WP-VT12	EU835166	/	/	Pitt <i>et al.</i> , 2010
<i>Eutypa lata</i>	<i>Vitis vinifera cv. Shiraz</i>	Australija	CSU-07-WP-DO5	EU835163	/	/	Pitt <i>et al.</i> , 2010
<i>Eutypa lata</i>	<i>Vitis vinifera cv. Shiraz</i>	Australija	CSU-07-WP-DO3	EU835162	/	/	Pitt <i>et al.</i> , 2010
<i>Eutypa lata</i>	<i>Vitis vinifera cv. Sau. blanc</i>	Australija	CSU-07-WP-CV9	EU835161	/	/	Pitt <i>et al.</i> , 2010
<i>Eutypa lata</i>	<i>Vitis vinifera cv. Sau. blanc</i>	Australija	CSU-07-WP-CV1	EU835160	/	/	Pitt <i>et al.</i> , 2010
<i>Eutypa lata</i>	<i>Vitis vinifera cv. Cabernet Fr.</i>	Australija	CSU-07-WP-AA25	EU835159	/	/	Pitt <i>et al.</i> , 2010
<i>Eutypa lata</i>	<i>Vitis vinifera cv. Ruby Caberne</i>	Australija	CSU-07-WP-GY6	EU835156	/	/	Pitt <i>et al.</i> , 2010
<i>Eutypa lata</i>	<i>Prunus armeniaca</i>	Australija	WRPG004	DQ006939	/	/	Rolshausen <i>et al.</i> , 2006
<i>Eutypa lata</i>	<i>Tilia sp.</i>	Švajcarska	CBS 208.87	DQ006927	/	/	Rolshausen <i>et al.</i> , 2006
<i>Eutypa lata</i>	<i>Vitis vinifera cv. Cabernet Sau.</i>	Srbija	EL17	JQ41699	/	/	Ova istraživanja
<i>Eutypa lata</i>	<i>Vitis vinifera cv. Rkaciteli</i>	Srbija	EL27	JQ41700	JX978578	KJ922152	Ova istraživanja
<i>Eutypa lata</i>	<i>Vitis vinifera cv. Prokupac</i>	Srbija	EL29	JQ41701	/	/	Ova istraživanja

Legenda: / nepoznat

Tabela. 4. Kontrolni izolati korišćeni prilikom filogenetske analize u ovoj doktorskoj disertaciji (nastavak).

Vrsta gljive	Domaćin	Poreklo	Izolat	Gen bank pristupni broj			Literaturni izvor
				ITS rDNA	β -tubulin	RPB2	
<i>Eutypa lata</i>	<i>Vitis vinifera</i> cv. <i>Riesling</i>	Srbija	EL30	/	JX978579	/	Ova istraživanja
<i>Eutypa lata</i>	<i>Vitis vinifera</i> cv. <i>Pinot noir</i>	Srbija	EL150	/	/	KJ922153	Ova istraživanja
<i>Eutypa lata</i>	<i>Vitis vinifera</i> cv. <i>Riesling It.</i>	Srbija	EL151	/	JX978581	/	Ova istraživanja
<i>Eutypa lata</i>	<i>Vitis vinifera</i> cv. <i>Pinot noir</i>	Srbija	EL152	/	/	KJ922154	Ova istraživanja
<i>Eutypa lata</i>	<i>Vitis vinifera</i> cv. <i>Riesling It.</i>	Srbija	EL153	JQ41702	/	/	Ova istraživanja
<i>Eutypa lata</i>	<i>Vitis vinifera</i> cv. <i>Sau. Blanc</i>	Srbija	EL154	/	JX978581	/	Ova istraživanja
<i>Eutypa lata</i>	<i>Vitis vinifera</i> cv. <i>Chardonnay</i>	Srbija	EL155	/	JX978582	/	Ova istraživanja
<i>Eutypa lata</i>	<i>Vitis vinifera</i> cv. <i>Franconien</i>	Srbija	EL156	/	/	KJ922155	Ova istraživanja
<i>Eutypa lata</i>	<i>Vitis vinifera</i> cv. <i>Chardonnay</i>	Srbija	EL157	/	JX978583	/	Ova istraživanja
<i>Eutypa lata</i>	<i>Vitis vinifera</i> cv. <i>Kardinal</i>	Srbija	EL158	/	/	KJ922156	Ova istraživanja
<i>Eutypa lata</i>	<i>Vitis vinifera</i> cv. <i>Riesling It.</i>	Srbija	EL199	JQ41703	/	/	Ova istraživanja

Legenda: / nepoznat

4.7. Osetljivost različitih sorti vinove loze prema izolatima *Eutypa lata*

U cilju pronalaženja potencijalnih izvora otpornosti različitih sorti vinove loze proučavana je osetljivost 27 domaćih i stranih sorti vinove loze prema *E. lata*, korišćenjem metode **Péros and Berger-a (1994)**. Takođe proučavana je i osetljivost 6 najzastupljenijih sorti vinove loze u Srbiji prema patogernu *E. lata* korišćenjem metode **Sosnowski et al. (2007a)**.

Osetljivost različitih sorti vinove loze prema odabranim izolatima *E. lata* proučena je u uslovima veštačke inokulacije sledećih domaćih sorti vinove loze: Opuzenska rana, Gudurički klon, Radmilovački muskat, Beogradska besemena, Negotinski rubin, Banatski muskat, Smederevka (odomaćena sorta), Neoplanta, Prokupac, Tamnjanika, Drenak (potiče iz prednje Azije), Smederevski muskat, Demir kapija i Frankovka (nepoznatog porekla). Od stranih sorti vinove loze inokulisane su: Kaberne sovinjon, Rajnski rizling, Game crni, Italijanski rizling, Sovinjon, Hamburg, Rizling rani, Burgundac beli, Afuz ali, Kardinal, Šardone, Burgundac crni i Erli muskat. Ogled je izveden po metodi **Péros and Berger-a (1994)**. Za ogled je korišćeno 14 izolata iz Srbije i 2 referentna izolata iz međunarodnih kolekcija. Ogled je postavljen u 4 ponavljanja sa 8 reznica po ponavljanju. Kao kontrola poslužile su 8 reznice u 4 ponavljanja inokulisane sterilnom PDA podlogom. Rezultati su očitavani 10 nedelja od inokulacije praćenjem pojave deformacija i nekroze na listovima inokulisanih biljaka. Nakon očitavanja rezultata inokulisane reznice su posađene u crne plastične kese dimenzija 12 x 12 x 30 cm, napunjene supstratom (Klasman 1) (bez prihranjivanja). Tako pripremljene reznice dalje su čuvane u stakleniku do drugog očitavanja rezultata u narednom vegetacionom ciklusu. Posađene biljke su orezivane u februaru narednog vegetacionog ciklusa. S obzirom da je ogled izvođen u kontrolisanim uslovima, postavljan je u više navrata i to prve godine je inokulisano 10 sorti (Rajnski rizling, Opuzenska rana, Sovinjon, Radmilovački muskat, Beogradska besemena, Negotinski rubin, Šardone, Banatski muskat, Game crni, Demir kapija), druge godine 10 sorti (Kaberne sovinjon, Italijanski rizling, Gudurički klon, Hamburg, Rizling rani, Burgundac beli, Afuz ali, Smederevka, Frankovka, Kardinal) i treće godine 7 sorti (Burgundac crni, Neoplanta, Prokupac, Smederevski muskat, Erli muskat, Tamnjanika i Drenak).

Očitavanje rezultata vršeno i 10 nedelja od kretanja vegetacije u drugom vegetacionom ciklusu, praćenjem pojave deformacija i nekroze na listovima inokulisanih biljaka. Izračunavanje intenziteta oboljenja na lastarima vršeno je direktnom proporcijom broja obolelih liski na inokulisanim reznicama i broja liski na kontrolnim reznicama. Ovako dobijeni podaci obrađivani su u statističkom programu ANOVA, primenom Dankanovog testa stepena značajnosti 0,05.

Takođe, vršena je inokulacija ukorenjenih reznica vinove loze prema metodi **Sosnowski et al. (2007a)**. Za ogled su korišćene sledeće sorte: Italijanski rizling, Kaberne sovinjon, Kardinal, Rkaciteli, Prokupac, Burgundac crni. Ogled je postavljen u 2 ponavljanja po 4 biljke. Ocena stepena osetljivosti različitih sorti u ovom ogledu vršena je na osnovu pojave simptoma na lastarima nakon 8 i 27 meseci od inokulacije. Proračun intenziteta osetljivosti na lastarima izvršen je na osnovu razlike u dužini lastara na inokulisanim biljkama i dužine lastara na kontrolnim biljkama.

Ocena osetljivosti sorti vinove loze prema izolatima *Eutypa* sp. vršena je prema skali koja sadrži 5 kategorija i to:

- Kategorija 0: biljke sa zdravim lastarima;
- Kategorija 1: biljke sa skraćenim lastarima i kombinacijom sitnih i krupnih listova;
- Kategorija 2: biljke sa skraćenim lastarima i isključivo sitnim listovima;
- Kategorija 3: biljke sa drastično smanjenim lastarima i jedva prisutnim listovima;
- Kategorija 4: biljke sa osušenim listovima i lastarima.

Nakon 27 meseci praćena je i nekroza na stablu inokulisanih biljaka vinove loze tako što su biljke izvadene iz supstrata, nožem je odstranjivana kora sa drveta i merena dužina nekroze tkiva na inokulisanim biljkama vinove loze. Ovako dobijeni podaci obrađivani su u statističkom programu ANOVA, primenom Dankanovog testa stepena značajnosti 0,05. U ogledu je uključeno 14 izolata *E. lata* poreklom iz vinove loze iz Srbije, kao i 2 referentna izolata gljive *E. lata* 8F i BX1.10 iz kolekcije fitopatogenih gljiva Nacionalnog Instituta za istraživanja u poljoprivredi (INRA, Francuska), koje su u svojim istraživanjima koristili **Péros and Berger (1994)**.

5. REZULTATI

5.1. Simptomi bolesti na biljkama u polju

Pregledom vinograda u 14 lokaliteta gajenja vinove loze u našoj zemlji u periodu od 2004. do 2012. godine, uočeni su simptomi odumiranja čokota vinove loze. Uzorci su sakupljeni sa 14 lokaliteta u Srbiji (Slika 1).



Slika 1. Lokalizeti u Srbiji obuhvaćeni istraživanjima u ovoj doktorskoj disertaciji.

Sakupljanje uzoraka obavljeno je u drugoj polovini maja i početkom juna u vinogradima starim od 11 do 22 godine. Prilikom prikupljanja uzoraka obolelih biljaka na terenu uzimani su fragmenti stabla i kordona vinove loze sa prelaza obolelog i zdravog tkiva, veličine od 10 do 20 cm. Na svim ispitivanim lokalitetima je bilo biljaka sa simptomima eutipoze. U svim ispitivanim lokalitetima su izolovani izolati *E. lata*. Pa tako u Pomoravskom regionu (Dobričevo i Drenovac) od 20 uzoraka, 7 (35%) je bilo pozitivno na *E. lata*, zatim Rasinski region (Kobilje, Bela Voda, Krvavica, Suvaja, Trnavci i Tuleš) od 63 uzorka 20 (31,70%) je bilo pozitivno na *E. lata*, u Nišavskom regionu (Praskovče i Lipovac) od 20 uzoraka 6 (30%) je bilo pozitivno, a u Pčinjskom regionu (Strezovac) od 16 uzoraka 6 (37,50%) je bilo pozitivno na *E. lata*, potom u Borskom regionu (Karabulovo) od 11 uzoraka 3 (27,28%) je bilo pozitivno na *E. lata*, u Južnobanatskom regionu (Gudurica) od 10 testiranih uzoraka pozitivno je bilo 2 (20%), a u Južnobačkom regionu (Sremski Karlovci) od 10 uzoraka pozitivno je bilo 3 (30%) na *E. lata*.

Ustanovljeno je da su, u uslovima Srbije, simptomi bolesti na vinovoj lozi najuočljiviji u drugoj polovini maja meseca na lastarima biljaka. Tokom vegetacije oboleli delovi čokota vinove loze bivaju prekriveni novom lisnom masom, tako da se simptomi teže primećuju. Simptomi na listovima obolelih biljaka ispoljavaju se u vidu sitnih, hlorotičnih pega, raspoređenih po obodu liski. Ivice lista često su iskrzane i savijene prema naličju, a kod jačih infekcija površina listova je većim delom prekrivena nekrotičnim pegama. Centralni deo liske ima naboran izgled (Slika 2). Vremenom listovi se suše i prevremeno opadaju.



Slika 2. Zaraženi listovi nepravilnog oblika, iskrzanih ivica sa sitnim, nekrotičnim pegama na liski.

Usled usporenog porasta lastari se značajno skraćuju, svetlozelene boje su i pojavljuje se tzv. cik-cak raspored internodija (Slika 3).



Slika 3. Oboleli lastar sa skraćenim, cik-cak internodijama i zakržljanim, hlorotičnim listovima, nepravilnog oblika.

Obolele biljke u vinogradu mogu imati na jednom kraku čokota skraćene lastare sa hlorotičnim, sitnim listovima, nepravilnog oblika, dok su na drugom kraku iste biljke zdravi lastari sa normalno razvijenim listovima (Slika 4).



Slika 4. Oboleli čokot vinove loze star 11 godina sa skraćenim lastarima i hlorotičnim, sitnim listovima (desno) i zdravim lastarima i listovima (levo).

U početnom stadijumu razvoja, cvasti se nepravilno razvijaju, a na pojedinim delovima dolazi do izostajanja cvetanja. Cvasti se deformišu i postepeno suše, tako da su novonastali grozdovi rehuljavi sa bobicama nejednake veličine (Slika 5).



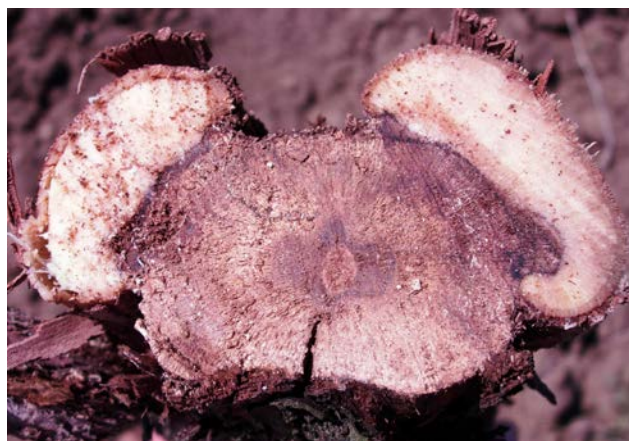
Slika 5. Izgled grozda sa nezaraženog čokota (levo); oboleli grozd vinove loze sa proređenim bobicama nejednake veličine (desno).

Uklanjanjem mrtve kore sa čokota uočava se nekroza koja se razvija oko starijih preseka od rezidbe. Nekrotirani delovi prostiru se duž stabla i mogu biti dugi nekoliko desetina santimetara. Nekroze najpre zahvataju površinu, a zatim prodiru u unutrašnjost, zahvatajući središnji deo čokota. Izumrlo tkivo je suvo, svetlo ili mrko smeđe boje (Slika 6, 7).



Slika 6. Poprečni presek stabla obolele biljke vinove loze u vinogradu sa izumrlim tkivom.

Usled rasta zdravog dela drveta oko zaraženog dolazi do pucanja stabla na površini duž nekrotičnog pojasa pri čemu spolja, na mrtvom delu tkiva drveta nastaju manje ili veće uzdužne pukotine (Slika 7). Na poprečnom preseku obolelog stabla manifestuje se jače ili slabije izražena nekroza, koja je u početnoj fazi u obliku slova "V".



Slika 7. Pucanje tkiva i deformacije usled rasta zdravog dela drveta.

Na delimično ili potpuno osušenim krakovima i rukavcima, kora se vremenom ljušti i otpada. Na drvetu bez kore, naročito oko starijih preseka od rezidbe, uočavaju se blaga površinska ulegnuća mrtvog tkiva (Slika 8).



Slika 8. Površinsko ulegnuće mrtvog dela drveta obolele biljke vinove loze.

5.2. Izolacija patogena i dobijanje monosporijalnih kultura

Iz biljaka vinove loze sa simptomima odumiranja čokota obavljena je izolacija patogena primenom standardnih fitopatoloških metoda. U periodu od 2004. do 2012. godine, sa 14 lokaliteta u Srbiji sakupljeno je i analizirano 150 uzoraka vinove loze i

dobijeno je 47 izolata *Eutypa* sp., 20 izolata *Botryosphaeria* sp. i 10 izolata *Fusarium* sp. Na osnovu boje i izgleda micelije gljiva na PDA podlozi, kao i anamorfnog stadijuma, determinisani su izolati do nivoa roda. Za dalja istraživanja korišćeno je svih 47 izolata *Eutypa* sp.

Patogenost monosporijalnih izolata proverena je veštačkim inokulacijama reznica vinove loze. Patogenim izolatima smatrani su oni izolati koji su na inokulisanim reznicama vinove loze izazivali pojavu hlorotičnih, deformisanih, sitnih listova sa iskrzanim ivicama i nekrotičnim pegama po rubu lista. Listovi inokulisanih reznica brzo su se sušili i opadali. Na inokulisanim reznicama vinove loze dolazilo je do slabijeg porasta lastara koji su imali svetlozelenu boju i cik-cak porast internodija. Nisu svi testirani izolati izazvali zarazu na svim inokulisanim biljkama.

5.3. Izbor izolata za dalja istraživanja

Izolacijom fitopatogenih gljiva iz zaraženih biljaka vinove loze, dobijeno je ukupno 47 izolata *Eutypa* sp., kojima je potvrđena patogenost veštačkim inokulacijama reznica vinove loze. Za dalja istraživanja odabrano je 14 izolata (Tabela 2). Ovi izolati pokazali su se najvirulentnijim u preliminarnim testovima patogenosti. Odabrani izolati međusobno su upoređivani na osnovu patogenih, morfoloških, odgajivačkih i molekularnih osobina u cilju pravilne identifikacije. Poređenje je vršeno sa determinisanim izolatima *E. lata* poreklom iz Italije (8F) i Francuske (BX 1.10).

5.4. Proučavanje patogenih osobina izolata *Eutypa* sp.

Svi proučavani izolati ispoljili su patogene osobine i prouzrokovali promene na inokulisanom tkivu korišćenjem dve metode - inokulacijom neukorenjenih i ukorenjenih reznica vinove loze sorte Kaberne sovignon.

1. Inokulacija neukorenjenih reznica vinove loze. Inokulacijom neukorenjenih reznica vinove loze utvrđeno je da su svi proučavani izolati prouzrokovali simptome karakteristične za *E. lata* na lastarima. Na kontrolnim biljkama, koje su inokulisane samo podlogom bez micelije, nije došlo do pojave simptoma. Inokulacija neukorenjenih reznica sprovedena je u fazi mirovanja. Naime, ovim je omogućeno da se

istovremeno razvijaju lastari biljke vinove loze i micelija gljive. U prvih 5 do 8 nedelja nakon inokulacije, pojavljuju se lastari umanjenog porasta, svetlo zelene boje sa hlorotičnim i deformisanim listovima. Simptomatični listovi upadljivo su sitniji od normalnih, sa povijenim ivicama prema naličju i hlorotičnim i nekrotičnim zonama po obodu (Slika 9).



Slika 9. Simptomi na listovima inokulisanih reznica vinove loze sorte Kaberne sovinjon: list sa povijenim ivicama na dole i nekrotičnim zonama po obodu.

Kasnije nekrotične zone šire se po celoj površini lista (Slika 10), a potom dolazi do sušenja i opadanja istih. Kod nekih inokulisanih reznica dolazi do brzog sušenja i opadanja liski, te tako ostaju samo svetlozelene skraćeni lastari).



Slika 10. Simptomi na listovima inokulisanih reznica vinove loze sorte Kaberne sovinjon: list sa sitnim nekrotičnim pegama po površini.

Takođe, na istoj biljci mogu se razviti skraćeni lastari sa hlorotičnim listovima normalno razvijeni lastari sa listovima bez simptoma (Slika 11).



Slika 11. Zdrav lastar bez promena i lastar sa skraćenim internodijama svetlozelene boje i deformisanim, hlorotičnim listovima koji se razvijaju iz inokulisane reznice.

Dalje, tokom vegetacije na obolelim listovima nastavljaju da se razvijaju simptomi, listovi se deformišu, suše i opadaju a lastar bez simptoma nastavlja normalno sa porastom i razvojem. Intenzitet simptoma, na inokulisane neukorenjene reznice sorte Kaberne sovinjon, ispitivanim izolatima *Eutypa* sp., kao i dva kontrolna izolata *E. lata*, prikazan je u tabeli 5.

Tabela 5. Broj obolelih liski (%) pri oceni patogenosti inokuliranih neukorenjenih reznica sorte Kaberne sovinjon na ispitivane izolate *Eutypa* sp.

Izolati	8 nedelja nakon inokulacije		
	Prosek	Minimum	Maximum
EL 17	80,57	75,00	85,38
EL 27	72,22	57,64	81,25
EL 29	77,80	61,20	87,50
EL30	75,68	50,00	87,50
EL 150	25,00	0,00	75,00
EL 151	47,23	37,50	62,50
EL 152	38,88	0,00	75,00
EL 153	30,56	0,00	50,00
EL 154	27,79	23,65	37,50
EL 155	16,68	0,00	37,50
EL 156	25,00	0,00	50,00
EL 157	16,68	0,00	25,00
EL 158	30,56	0,00	50,00
EL 199	30,56	0,00	50,00
8 F	83,33	75,00	87,50
B X 1.10	80,56	72,25	87,50

Reakcija ispitivanih izolata kao i intenzitet simptoma nakon inokulacije na sorti Kaberne sovinjon prikazani su u tabeli 6. Dobijeni rezultati obrađeni su dvofaktorijalnom analizom varijanse, primenom Dankanovog testa značajnosti 0,05, gde su jedan faktor bili ispitivani izolati a drugi sorta vinove loze.

Tabela 6. Rezultati dvofaktorijalne analize varijanse prosečnih vrednosti intenziteta simptoma 8 nedelja nakon inokulacije proučavanim izolatima *Eutypa* sp., primenom Dankanovog testa značajnosti $p=0,05$

Izvor varijacije	Suma kvadrata	Stepeni slobode	Varijansa	F količnik	p vrednosti
Izolati	50166,28	16	3135,393	8,608	0,000
Sorta	4922,034	1	4922,034	13,514	0,000
Izolati + Sorta	6853,861	16	428,366	1,176	0,303
Greška	31323,227	86	364,224		
Ukupno	98234,221	110			

Primenom analize varijanse (ANOVA) za značajnost utvrđenih razlika između izolata, dobijena je p vrednost od 0,000, koja je manja od 0,05, što znači da su te razlike statistički značajne (Tabela 6), odnosno da izolati utiču na intenzitet pojave simptoma na lastarima sorte Kaberne sovinjon.

Parnim poređenjem prosečnih vrednosti intenziteta simptoma na sorti Kaberne sovinjon prema ispitivanim izolatima izdvajaju se 4 homogene grupe izolata, koje su se statistički značajno razlikovale (Tabela 7). Izolati 8F, BX1.10, EL17, EL27, EL30 i EL29 koji pripadaju četvrtoj homogenoj grupi pokazali su statistički voma značajnu razliku u intenzitetu simptoma na sorti Kaberne sovinjon, odnosno bili su najvirulentniji. Izolati EL155, EL157, EL150, EL156, EL154, EL153, EL158, EL199 su smešteni u prvu homogenu grupu i nisu se jasno odvojili od druge homogene grupe, što znači da ne ispoljavaju statistički značajnu razliku u intenzitetu simptoma na sorti Kaberne sovinjon, što ove izolote svrstava u grupu manje patogenih.

Tabela 7. Homogene grupe dobijene analizom varijanse prosečnih vrednosti intenziteta simptoma na sorti Kaberne sovinjon nakon 8 nedelja za ispitivane izolote *Eutypa* sp., primenom Dankanovog testa značajnosti $p= 0,05$

Izolati	Homogene grupe			
	1	2	3	4
EL155	16,68ab	16,68ab		
EL157	16,68ab	16,68ab		
EL150	25,00ab	25,00ab		
EL156	25,00ab	25,00ab		
EL154	27,79ab	27,79ab		
EL153	30,56ab	30,56ab		
EL158	30,56ab	30,56ab		
EL199	30,56ab	30,56ab		
EL152		38,88ab		
EL151		47,23abc	47,23abc	
EL27			72,22acd	72,22acd
EL30				75,00bd
EL29				77,80ad
BX1.10				80,56bd
EL17				80,57bd
8F				83,33bd
<i>p</i> vrednosti	0,052	0,054	0,063	0,468

*Podaci u kolonama obeleženi istim slovima nisu statistički značajno različiti na osnovu Dankanovog testa $p= 0,05$.

Izolat EL152 je smešten u drugu homogenu grupu i u odnosu na ostale izolote iz druge homogene grupe ispoljavaja statistički značajnu razliku. Izolat EL151 se ne odvaja jasno od treće homogene grupe. Dok izolat EL27 ne ispoljava značajnu statističku razliku od izolata četvrte homogene grupe (Tabela 7).

Reizolacija patogena sa veštački inokulisanih biljaka na kojima su se razvili simptomi obavljena je istim metodama kao i pri izolaciji, čime su zadovoljeni osnovni Kohovi postulati. Dobijeni reizolati po izgledu micelije i morfologiji reproduktivnih organa u potpunosti su odgovarali izvornim izolatima.

2. Inokulacija ukorenjenih reznica. Inokulacija ukorenjenih reznica vinove loze u fazi mirovanja ukazuje da su svi proučavani izolati *Eutypa* sp., kao i dva kontrolna izolata *Eutypa lata* prouzrokovali pojavu simptoma na lastarima različitog intenziteta (Slika 12). Takođe, došlo je do nekroze tkiva oko mesta inokulacije (Slika 13).

Reakcija ispitivanih izolata kao i intenzitet simptoma nakon inokulacije na sorti Kaberne sovinjon prikazani su u tabeli 8.

Tabela 8. Parametri korišćeni pri oceni patogenosti inokulisanih ukorenjenih reznica sorte Kaberne sovinjon na ispitivane izolate *Eutypa* sp.

Izolati	8 meseci	27 meseci	
	Razlika u dužini lastara inokulisanih i kontrolnih biljaka (cm)	Razlika u dužini lastara inokulisanih i kontrolnih biljaka (cm)	Dužina nekroze (mm)
EL17	3,50	39,26	33,63
EL27	6,53	23,81	32,63
EL29	5,74	39,26	31,50
EL30	6,48	24,41	34,13
EL150	1,86	15,18	29,88
EL151	2,30	22,74	29,25
EL152	3,00	10,18	26,00
EL153	2,88	6,46	21,75b
EL154	2,31	19,08	25,88
EL155	0,63	18,73	24,63
EL156	0,00	14,83	25,75
EL157	0,00	9,82	28,38
EL158	1,56	21,75	26,00
EL199	2,19	9,50	29,38
8F	2,04	31,26	39,63
BX1.10	4,70	41,84	33,50
Kontrola	0,00	0,00	0,00



Slika 12. Oboleli listovi sa simptomima hloroze, deformacija lisne ploče, nekroza i listovi bez simptoma na istom lastaru.

Primenom analize varijanse (ANOVA) za značajnost utvrđenih razlika između izolata, dobijena je p vrednost od 0,000, koja je manja od 0,05, što znači da su te razlike statistički značajne, a to znači da izolati ispoljavaju različit nivo agresivnosti (Tabela 9).

Parnim poređenjem rezultata intenziteta simptoma na sorti Kaberne sovinjon na inokulaciju proučavanim izolatima *Eutypa* sp. nakon 8 meseci od inokulacije, korišćenjem p vrednosti (Tabela 9) može se uočiti jasno izdvajanje 2 homogene grupe. U prvu homogenu grupu spadaju većina ispitivanih izolata. Izolati EL155, EL156 i EL157 ispoljili su statistički značajno manji intenzitet simptoma na sorti Kaberne Sovinjon, tačnije nisu ni izazvali simptome na inokulisanim biljkama. U drugoj grupi se jasno izdvojio izolat EL27, koji se pokazao kao najvirulentniji. Potom su izolati EL30, EL29, BX1.10 pokazali statistički značajan intenzitet simptoma, što ih svrsatava u grupu patogenih izolata.

Tabela 9. Homogene grupe dobijene analizom varijanse prosečnih vrednosti izračunatih na osnovu razlike u dužini lastara inokulisanih i kontrolnih biljaka sorte Kaberne sovinjon nakon 8 meseci za ispitivane izolate *Eutypa* sp., primenom Dankanovog testa značajnosti $p=0,05$

Izolati	Homogene grupe	
	(Razlika u dužini lastara između inokulisanih i kontrolnih biljaka nakon 8 meseci)	
	1	2
EL156	0,00c	
EL157	0,00c	
EL155	0,00c	
EL158	1,56bc	
EL150	1,86abc	
8F	2,04abc	
EL199	2,19abc	
EL151	2,30abc	
EL154	2,31abc	
EL153	2,88abc	
EL152	3,00abc	
EL17	3,50abc	
BX1.10	4,70abc	
EL29	5,74ab	
EL30	6,48a	6,48a
EL27		6,53a
p vrednosti	0,085	0,078

*Podaci u kolonama obeleženi istim slovima nisu statistički značajno različiti na osnovu Dankanovog testa $p=0,05$.

Isto tako, parnim poređenjem prosečnih vrednosti razlika u dužini lastara inokulisanih i kontrolnih biljaka nakon 27 meseci uočavaju se 3 homogene grupe (Tabela 10). Analizirajući p vrednosti vidi se da postoji značajna statistička razlika između homogenih grupa. Izolati EL17, EL29, 8F, EL30, EL27 ispoljili su statistički značajnu razliku intenziteta simptoma na sorti Kaberne sovinjon. Izolat BX1.10 izdvaja se od ostalih izolata iz treće homogene grupe, što znači da je virulentniji od ostalih. Izolat EL153 izazvao je statistički značajno manji intenzitet simptoma na sorti Kaberne sovinjon, što ga svrstava u manje patogene izolate (Tabela 10).

Tabela 10. Homogene grupe dobijene analizom varijanse prosečnih vrednosti izračunatih na osnovu razlike u dužini lastara inokulisanih i kontrolnih biljaka sorte Kaberne sovinjon nakon 27 meseci za ispitivane izolate *Eutypa* sp., primenom Dankanovog testa značajnosti $p=0,05$

Izolati	Homogene grupe		
	(Razlika u dužini lastara između inokulisanih i kontrolnih biljaka nakon 27 meseci)		
	1	2	3
EL153	6,64b	6,64b	
EL199	9,50b	9,50b	9,50b
EL157	9,82b	9,82b	9,82b
EL152	10,18b	10,18b	10,18b
EL156	14,83ab	14,83ab	14,83ab
EL150	15,18ab	15,18ab	15,18ab
EL155	18,73ab	18,73ab	18,73ab
EL154	19,08ab	19,08ab	19,08ab
EL158	21,75ab	21,75ab	21,75ab
EL151	22,74ab	22,74ab	22,74ab
EL27	23,81ab	23,81ab	23,81ab
EL30	24,41ab	24,41ab	24,41ab
8F	31,26ab	31,26ab	39,63ab
EL29		39,26a	39,26a
EL17		39,26a	39,26a
BX1.10			41,84a
<i>p</i> vrednosti	0,067	0,056	0,059

*Podaci u kolonama obeleženi istim slovima nisu statistički značajno različiti na osnovu Dankanovog testa $p=0,05$.

Parna poređenja prosečnih vrednosti dužine nekroze ispitivanih izolata *E. lata* pokazala su izdvajanje 3 homogene grupe izolata koje su se statistički značajno razlikovale (Tabela 11). Izolati EL153, EL155, EL156, EL154 izazvali su statistički značajno manju dužinu nekroze. Dok su izolati 8F, EL30, EL17, EL27, BX1.10 ispoljili statistički značajno veću dužinu nekroze, što ih svrstava u najvirulentnije izolate (Tabela 11).

Može se uočiti da razlika u dužini lastara inokulisanih i kontrolnih biljaka sorte Kaberne sovinjon nakon 8 i 27 meseci i dužina nekroze oko mesta inokulacije, kao zasebni kriterijumi za ocenu patogenosti ispitivanih izolata *Eutypa* sp., ne mogu potpuno da podrže sva predhodno uočena grupisanja ispitivanih izolata, što je prikazano u tablama 9, 10 i 11. Naime, izolati koji nisu ispoljili simptome na lišću i lastarima 8

meseci nakon inokulacije izazvali su statistički značajne dužine nekroza oko mesta inokulacije posle 27 meseci i tako se svrstali u grupu virulentnih izolata.

Tabela 11. Razlike u patogenosti između proučavanih izolata *Eutypa* sp. na osnovu prosečne vrednosti dužine nekroze (mm), primenom Dankanovog testa značajnosti $p=0,05$

Izolati	Homogene grupe (dužina nekroze/mm)		
	1	2	3
EL153	21,75bc	21,75bc	
EL155	24,63ab	24,63ab	
EL156	25,75ab	27,75ab	
EL154	25,88	25,88	
EL152	26,00ab	26,00ab	
EL158	26,00ab	26,00ab	
EL157	28,38ab	28,38ab	
EL151	29,25ab	29,25ab	
EL199	29,38ab	29,38ab	
EL150	29,88ab	29,88ab	29,88ab
EL29	31,50a	31,50a	31,50a
EL27		32,63a	32,63a
BX1.10		33,50a	33,50a
EL17		33,63a	33,63a
EL30		34,13a	34,13a
8F			39,63a
<i>p</i> vrednosti	0,068	0,081	0,058

*Podaci u kolonama obeleženi istim slovima nisu statistički značajno različiti na osnovu Dankanovog testa $p=0,05$.

Upoređivanjem rezultata nakon osmog i dvadesetsedmog meseca od inokulacije, uočava se da je statistički značajno manji intenzitet simptoma na sorti Kaberne sovinjon na ispitivane izolate nakon 8 meseci, nego posle 27 meseci. Sve to ukazuje da pojedinim izolatima kao što su EL155, EL156 i EL157, treba više vremena za pojavu prvih simptoma na lastarima. Svi ispitivani izolati izazvali su pojavu nekroze tkiva oko mesta inokulacije (Tabela 11, Slika 13).



Slika 13. Nekroza oko mesta inokulacije 27 meseci nakon inokulacije.

Takođe, primećeno je da pojava simptoma na lastarima nije u korelaciji sa pojavom nekroze tkiva oko mesta inokulacije. Tako na primer, izolat EL150 od 8 inokulisanih biljaka, nakon 8 meseci izaziva pojavu simptoma na lastarima 1 inokulisane biljke, a nakon 27 meseci na 2 inokulisane biljke. Međutim, 27 meseci nakon inokulacije izaziva statistički značajno veću nekrozu oko mesta inokulacije, što ga svrstava u virulentne izolate. Isto tako, izolati EL155, EL156 i EL157, ne prouzrokuju simptome na lastarima 8 meseci nakon inokulacije, ali je uočeno da je dužina nekrotiranog tkiva oko mesta inokulacije posle 27 meseci statistički značajno veća, što ih svrstava u patogene izolate (Tabela 9, 10, 11). Na reznicama koje su poslužile kao negativna kontrola koje su inokulisane sterilnom PDA podlogom nije došlo do pojave simptoma.

Reizolacija patogena sa veštački inokulisanih biljaka na kojima su se razvili simptomi obavljena je istim metodama kao i pri izolaciji, čime su zadovoljeni osnovni Kohovi postulati i vrši se na isti način kao u predhodnom ogledu.

5.5. Morfološke odlike proučavanih izolata *Eutypa* sp.

U okviru morfoloških istraživanja izolata proučavane su makroskopske i mikroskopske odlike 14 proučavanih izolata *Eutypa* sp. i 2 kontrolna izolata *Eutypa lata*. Izolati su izlagani 24 h dejstvu UV svetla u trajanju od 30 dana da bi se podstakla sporulacija.

5.5.1. Makroskopske morfološke odlike ispitivanih izolata

Razvoj micelije proučavanih izolata *Eutypa* sp. praćen je na PDA, MA, GWA i WA. Na svim proučavanim podlogama kod svih izolata primećen je ujednačen porast micelije nakon 10 dana razvoja. Pa tako, na PDA podlozi nakon 10 dana micelija je pamučastog izgleda, bele boje sa slabim vazdušastim porastom. Celokupna kolonija se ravnomerno razvija i ima finu difuznu ivicu. Naličje kolonije je krem boje, bez plodonosnih struktura (Slika 14). Posle 15 dana dolazi do stvaranja tamnog pigmenta u podlozi. Nakon 30 dana lice kolonije je bele boje sa gustom pamučastom vazdušnom micelijom i bleđožutom konidijalnom masom, koja se izlučuje iz piknida. Piknidi se obrazuju subkonikalno, na stromi, sastavljenoj od nekoliko do više gustih slojeva ćelija. Bazalni deo piknida pokriven je konidioforama na kojima se formiraju konidije.



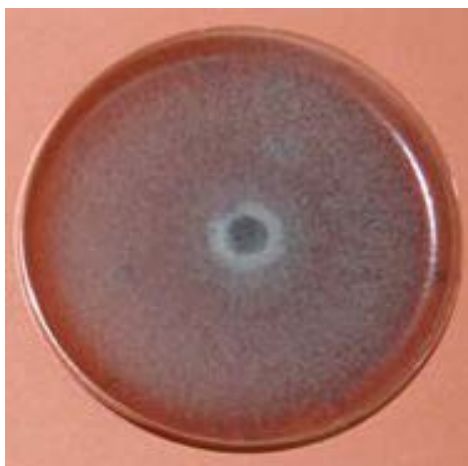
Slika 14. *Eutypa* sp.: Kolonija izolata EL27 na PDA podlozi nakon 10 dana razvoja.

Na MA ispitivani izolati *Eutypa* sp. razvijaju se na sličan način kao i na PDA. Nakon 10 dana kolonije su bele, sa gustom pamučastom vazdušnom micelijom, mnogo gušćom nego na PDA podlozi (Slika 15). Naličije kolonije je bledožute boje, i vremenom prelazi u tamnosmeđu boju sa koncentričnim krugovima.



Slika 15. *Eutypa* sp.: Kolonija izolata EL27 na MA podlozi nakon 10 dana razvoja.

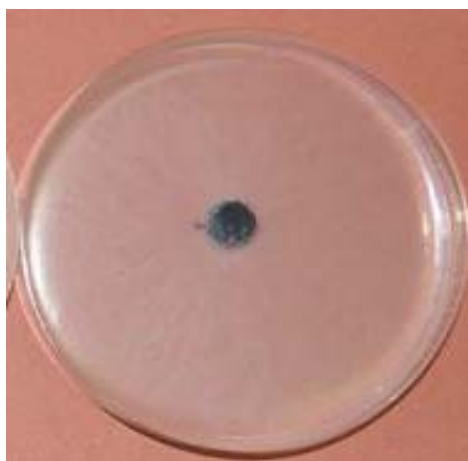
Na GWA podlozi ivice kolonije su cele, ravne, paperjaste. Micelija je sivobela, paperjasta celom površinom kolonije. Zbog boje podloge, sa naličja kolonije jedva je primetna razlika između zona. Na ovoj podlozi ne dolazi do formiranja stromatičnih tvorevina nakon 10 dana od zasejavanja (Slika 16).



Slika 16. *Eutypa* sp.: Kolonija izolata EL151 na GWA podlozi nakon 10 dana razvoja.

Nakon 30 dana na paperjastoj miceliji uočava se krembeli sluzasti matriks, nepravilno razbacan po površini kolonije, iz kojeg se izlučuju konidije.

Na WA podlozi razvija se retka, paperjasta micelija na celoj površini podloge nakon 10 dana od zasejavanja (Slika 17).



Slika 17. *Eutypa* sp.: Kolonija izolata EL151 na WA podlozi nakon 10 dana razvoja.

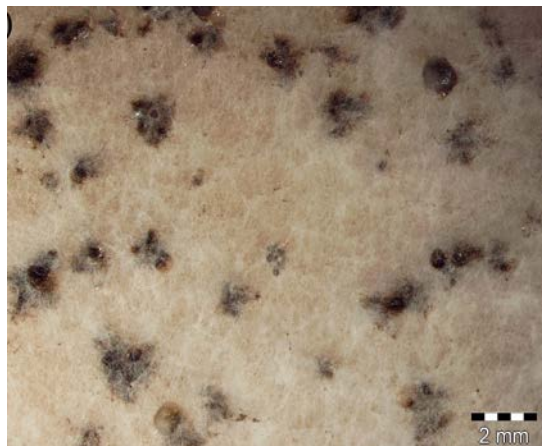
Posle 30 dana na paperjastoj miceliji uočava se bledo narandzasti sluzasti matriks, nepravilno razbacan po površini kolonije, iz kojeg se izlučuju konidije.

5.5.2. Mikroskopske morfološke odlike ispitivanih izolata

Mikroskopskim pregledom kolonija izolata *Eutypa* sp., gajenih na PDA podlozi pri temperaturi od 25 °C tokom 10 dana, uočeno je da ne postoje značajne razlike u morfološkim osobinama micelije.

Bespolne plodonosne tvorevine (konidiomata). Proučavani izolati *Eutypa* sp. obrazuju piknide, koji se formiraju u kulturi (Slika 18). Piknidi proučavanih izolata *Eutypa* sp. su loptastog ili nepravilnog oblika, od tamnosmeđe do crne boje. Konidijalna masa je krem do bledo narandžaste boje na podlozi PDA, MA, GWA (Slika 19, 20, 21, 22). Kod svih izolata piknidi se obrazuju subkonikalno, na stromi u velikom broju. Dimenzije piknida su od 0,5 do 1 mm.

Proučavani izolati *Eutypa* sp. pri gajenju na podlogama u kulturi formiraju stromatične tvorevine pod dejstvom 24 h UV svetla 30 dana nakon zasejavanja. Svi ispitivani izolati *Eutypa* sp. u kulturi obrazuju stromatična zadebljanja iz kojih se kod svih izolata oslobađaju konidije u vidu guste, u obliku kapljice ili razlivenne želatinozne mase (matriksa) krem do bledo narandžaste boje (Slika 18, 19, 20, 21, 22).



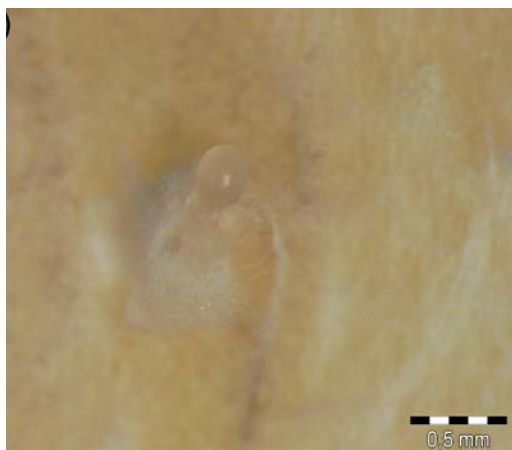
Slika 18. *Eutypa* sp.: Stromatične tvorevine izolata EL29 u kulturama starim 30 dana formiranim na PDA podlozi.



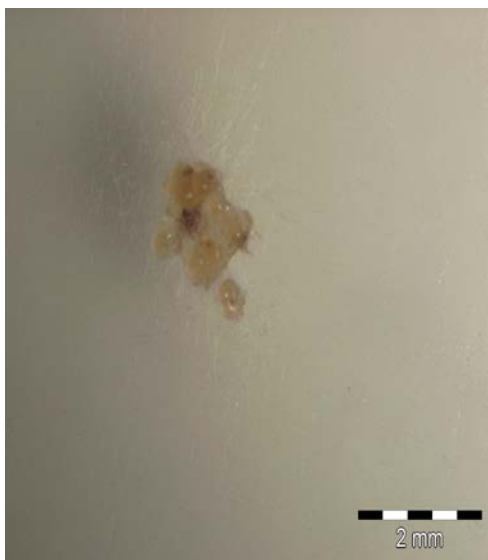
Slika 19. *Eutypa* sp.: Kapljica matriksa izolata EL29 u kulturama starim 30 dana formiranim na PDA podlozi.



Slika 20. *Eutypa* sp.: Stromatične tvorevine izolata EL27 u kulturama starim 30 dana formiranim na GWA podlozi.



Slika 21. *Eutypa* sp.: Stromatične tvorevine izolata EL17 u kulturama starim 30 dana formiranim na MA podlozi.

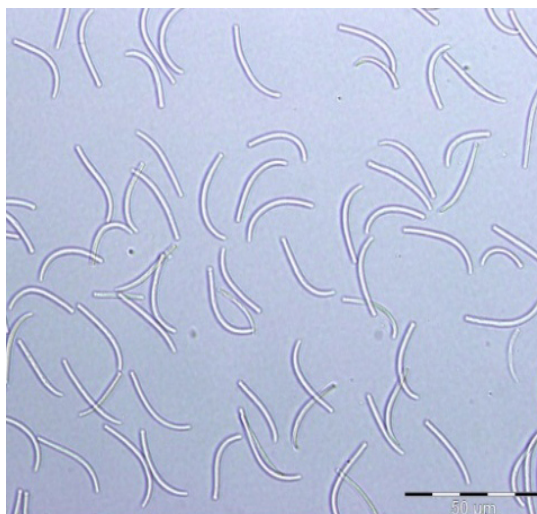


Slika 22. *Eutypa* sp.: Stromatične tvorevine izolata EL29 u kulturama starim 30 dana formiranim na WA podlozi.

Formiranje konidija. Konidije se stvaraju holoblastično u simpodijalnom nizu na konidiogenim ćelijama. Kod svih proučavanih izolata konidije se oslobađaju u sluzavoj masi (matriksu), koji je krem do bledo narandžaste boje.

Morfologija konidija. Kod proučavanih izolata *Eutypa* sp. ne postoje morfološke razlike vezane za izgled konidija. Sve konidije su jednoćelijske, neseptirane, hijalinske, izdužene i umereno krive sa spljoštenom osnovom (Slika 23). Ustanovljeno je da postoje značajne razlike u dimenzijama konidija ispitivanih izolata, i to kako u prosečnim, tako i u ekstremnim vrednostima. Dužina i širina konidija su parametri koji su pojedinačno

statistički analizirani u cilju utvrđivanja pogodnosti kao kriterijuma za razlikovanje između ispitivanih izolata *Eutypa* sp. (Tabela 12).



Slika 23. *Eutypa* sp.: Konidije EL151 u kulturama starim 30 dana formiranim na PDA podlozi.

Tabela. 12. Biometrijske vrednosti dimenzija konidija proučavanih izolata *Eutypa* sp. na PDA podlozi

Izolat	Dužina konidija (μm)			Širina konidija (μm)		
	Max	Min	prosek*	Max	Min	prosek*
EL 17	26,32	21,74	24,31	2,26	1,61	1,90
EL 27	23,34	17,82	20,80	2,57	1,57	1,95
EL 29	33,34	23,24	26,75	2,74	1,28	1,81
EL 30	35,52	22,09	26,79	2,36	1,51	1,80
EL 150	28,46	23,70	26,40	1,85	1,45	1,67
EL 151	28,46	25,40	26,67	1,89	1,20	1,63
EL 152	25,45	23,20	24,52	1,97	1,25	1,58
EL 153	23,10	19,50	20,94	1,81	1,20	1,54
EL 154	26,25	23,43	24,46	1,75	1,28	1,47
EL 155	25,74	22,09	23,76	1,92	1,45	1,68
EL 156	34,66	28,24	32,00	1,75	1,35	1,51
EL 157	25,15	24,00	19,23	1,95	1,50	1,68
EL 158	23,85	21,25	23,04	1,98	1,50	1,71
EL 199	33,25	23,06	27,80	1,50	1,39	1,45
8F	26,25	22,54	24,33	2,19	1,58	1,94
BX1.10	24,99	20,04	23,62	2,16	1,28	1,71

*Prosečna vrednost 100 ponavljanja.

Dužina konidija predstavlja jedan od prvih mernih parametara i dobijeni rezultati su obrađeni analizom varijanse kao dvofaktorijalni ogled, gde je jedan faktor bila dužina konidija po svim izolatima a drugi ispitivane podloge (Tabela 13).

Tabela 13. Rezultati dvofaktorijalne analize varijanse prosečne dužine i širine konidija proučavanih izolata *Eutypa* sp. na PDA podlozi, primenom Dankanovog testa značajnosti $p=0,05$

Izvor varijacije	Suma kvadrata	Stepeni slobode	Varijanse	F količnik	p vrednosti
Dužina konidija	535,877	15	35,725	5,521	0,000
	3931,257	3	1310,419	202,501	0,000
	1157,93	45	25,732	3,976	0,000
	1656,623	256	6,471		
	7281,688	319			
Širina konidija	3,395	15	0,226	3,291	0,000
	7,016	3	2,339	34,006	0,000
	10,692	45	0,238	3,455	0,000
	17,604	256	0,069		
	38,707	319			

Poređenjem F količnika utvrđeno je da između izolata postoje statistički vrlo značajne razlike. Nakon izračunavanja analize varijanse pristupilo se parnim poređenjem izolata pomoću Dankanovog testa 0,05 (Tabela 14).

Dužina konidija na PDA podlozi, kao zaseban morfološki kriterijum, grupisao je u izvesnoj meri ispitivane izolate. Tako su se na osnovu dužine konidija jasno izdvojile 4 homogene grupe izolata. Izolat EL157 u prvoj homogenoj grupi pokazuje značajno manju statističku razliku u dužini konidija, odnosno dužina konidija ovog izolata je manja u odnosu na druge testirane izolate. Izolati EL199 i EL156 spadaju u četvrtu homogenu grupu i takođe ispoljavaju značajnu statističku razliku, što znači da su konidije ovih izolata statistički značajno duže od konidija ostalih izolata.

U treću homogenu grupu jasno se odvajaju izolati EL150, EL151, EL29 i EL30, koji ispoljavaju značajnu statističku razliku. Potom su izolati EL27, EL153 smešteni u dve homogene grupe, kao i izolati EL17, 8F, EL154 i EL152, a to znači da ovi izolati pošto nisu jasno grupisani po grupama ne ispoljavaju značajnu statističku razliku u dužini konidija između sebe. Isto tako izolati EL158, BX1.10 i EL155 pošto su smešteni u 3 homogene grupe, ne ispoljavaju značajnu statističku razliku u dužini konidija (Tabela 14).

Tabela 14. Homogene grupe dobijene analizom varijanse prosečnih vrednosti dužine (μm) konidija ispitivanih izolata *Eutypa* sp. na PDA podlozi, primenom Dankanovog testa značajnosti $p=0,05$

Izolati	Homogene grupe			
	1	2	3	4
EL157	19,23cd			
EL27	20,80bcd	20,80bcd		
EL153	20,94bcd	20,94bcd		
EL158	23,04abcd	23,04abcd	23,04abcd	
BX1.10	23,62abcd	23,62abcd	23,62abcd	
EL155	23,76abcd	23,76abcd	23,76abcd	
EL17		24,31abc	24,31abc	
8F		24,33abc	24,33abc	
EL154		24,46abc	24,46abc	
EL152		24,52abc	24,52abc	
EL150			26,40ab	
EL151			26,67ab	
EL29			26,75ab	
EL30			26,79ab	
EL199			27,80ab	27,80ab
EL156				32,00a
p vrednost	0,070	0,153	0,071	0,057

*Podaci u kolonama obeleženi istim slovima nisu statistički značajno različiti na osnovu Dankanovog testa $p=0,05$.

Dužina konidija, kao zaseban morfološki kriterijum, ne može potpuno da podrži sva predhodno uočena grupisanja izolata *Eutypa* sp. (Tabela 14).

Merenja širine konidija ispitivanih izolata *Eutypa* sp. statistički su obrađeni analizom varijanse kao dvofkatorijalni ogled, gde je jedan faktor širina konidija svih izolata a drugi faktor podloge. Rezultati su prikazani u tabeli 13. Poređenjem F količnika sa tabličnim vrednostima, ustanovljeno je da između izolata ne postoji statistički značajna razlika u širini konidija između ispitivanih izolata na različitim hranljivim podlogama.

Nakon izračunavanja analize varijanse pristupilo se parnim poređenjima izolata pomoću Dankanovog testa, dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 15.

Tabela 15. Homogene grupe dobijene analizom varijanse prosečnih vrednosti širine (μm) konidija ispitivanih izolata *Eutypa* sp. na PDA podlozi, primenom Dankanovog testa značajnosti $p= 0,05$

Izolati	Homogena grupa
	1
EL199	1,45a
EL154	1,47a
EL156	1,51a
EL153	1,54a
EL152	1,58a
EL151	1,62a
EL150	1,67a
EL155	1,67a
EL157	1,68a
EL158	1,71a
BX1.10	1,71a
EL30	1,80a
EL29	1,81a
EL17	1,90a
8F	1,94a
EL27	1,95a
<i>p</i> vrednost	0,105

*Podaci u kolonama obeleženi istim slovima nisu statistički značajno različiti na osnovu Dankanovog testa $p= 0,05$.

Širina konidija na PDA podlozi kao morfološki kriterijum nije razlikovao ispitivane izolate. Naime, svi izolati su se smestili u jednu homogenu grupu, to jest p vrednost je 0,105 koja je veća od 0,05, a to znači da nema statistički značajne razlike među ispitivanim izolatima u širini konidija.

Parnim poređenjem izolata pomoću Dankanovog testa 0,05 rađena je analiza varijanse dužine konidija na podlogama PDA, MA, GWA i WA. Parnim poređenjem dužine konidija ispitivanih izolata pomoću Dankanovog testa, na različitim podlogama došlo se do zaključka da izolati EL17, EL27, EL29, EL150, EL151, EL153, EL154, EL155, EL156, EL158, EL199 i BX1.10 formiraju po 3 homologe grupe podloga, a dok ostali izolati (EL30, EL152, EL157 i 8 F) grupišu podloge u 2 homogene grupe. S tim da samo kod izolata EL17 podloga WA spada u prvu homogenu grupu sa statistički značajno manjom dužinom konidija u odnosu na druge podloge, dok svi ostali izolati u prvu grupu svrstavaju podlogu GWA.

Ostale podloge po pojedinim izolatima imaju različiti raspored po homogenim grupama. Dužina konidija, kao zaseban morfološki kriterijum, ne može potpuno da podrži sva predhodno uočena grupisanja izolata *Eutypa* sp.

Širina konidija kao zaseban morfološki kriterijum, je grupisao donekle ispitivane izolate. Nakon izračunavanja analize varijanse došlo se do zaključka da izolati EL17, EL, 150, EL151, EL152, EL153, EL156, EL157 i EL158 EL158 formiraju dve homogene grupe podloga, dok izolati EL27, EL29, EL30, 8F i BX1.10 imaju samo jednu homogenu grupu, što znači da ne postoji značajna statistička razlika u širini konidija na različitim podlogama. Izolati EL155, EL154 i EL199 formiraju 3 homogene grupe podloga, koje ne ispoljavaju značajnu statističku razliku u širini konidija. Posmatrajući homogene grupe podloga pod uticajem različitih izolata vidi se da postoji različiti raspored izolata po grupama što znači da širina kao zaseban morfološki kriterijum, ne može potpuno da podrži sva predhodno uočena grupisanja izolata *Eutypa* sp.

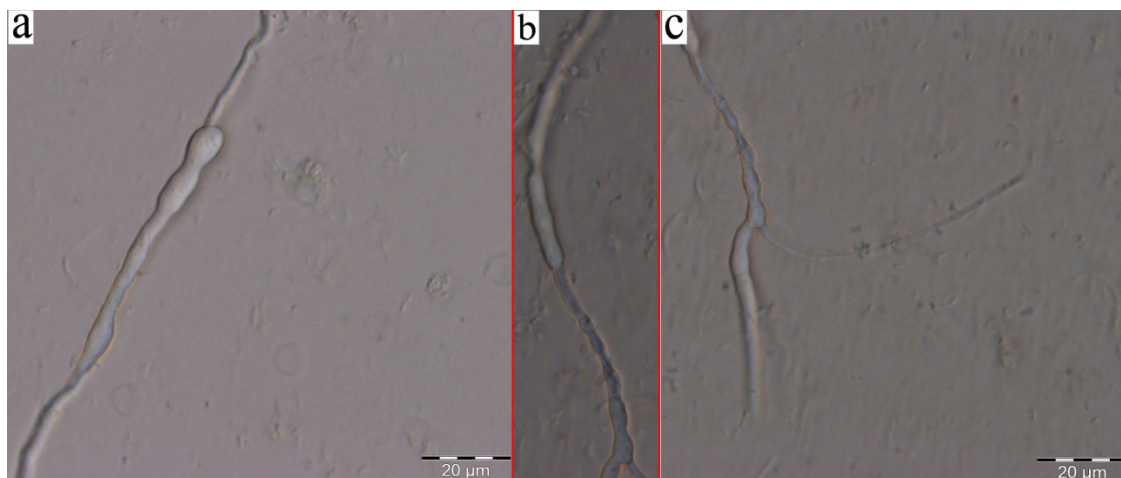
Dimenzije konidija proučavanih izolata *Eutypa* sp. na PDA iznosile su: dužina konidija 17,82-(32,00)-35,52 μm i širina 1,39-(1,45)-2,74 μm (Tabela 12), što je u okvirima vrednosti dimenzija konidija koje navode i drugi autori za *E. lata* izolovane iz vinove loze i drugih domaćina (Tabela 1). Dimenzija konidija na MA su: dužina konidija je 18,25-(25,85)-33,45 μm , širina 1,20-(1,71)-1,78 μm , na GWA dužina konidija je 15,77-(20,58)-25,38 μm a širina 1,42-(2,18)-2,94 μm i na WA dužina konidija je 17,66-(25,42)-33,17 μm i širina 1,00-(1,42)- 1,84 μm .

Klijanje konidija. Tokom klijanja konidije trpe određene morfološke promene (Slika 24). Konidije prilikom klijanja formiraju kličinu cev i to na oba kraja.

Naklijavanje konidija vršeno je na dva načina: konidije su prebacivane na podlogu YPDA (Yeast Potato Dextrose Agar) (Slika 24), a drugi način naklijavanja konidija, koje potiču sa podloga PDA, MA, GWA i WA, vršen je u kapi sterilne vode pod dejstvom 24 h UV svetla.

Ova dva načina naklijavanja se razlikuju u brzini izvođenja oglada. Naime, kod prvog postupka konidije kličaju već posle 2 do 4 dana, a kod drugog za klijanje konidija potrebno je 15 dana. U prvom postupku naklijavanja konidija često se dešava da se izdužene konidije teško razlikuju od micelije koju stvaraju. Kod drugog načina

naklijavanja konidija uočeno je da klijale konidje nastavljaju kljivanje u nizu, međusobno se povezujući.



Slika 24. *Eutypa* sp.: Kljivanje konidija na YPDA podlozi, a – izolat EL29; b i c – EL30.

Kljivanje konidija je parametar koji je takođe pojedinačno statistički analiziran u cilju određivanja njegove pogodnosti kao kriterijuma za razlikovanje ispitivanih izolata *Eutypa* sp. Statistički su obrađivani rezultati dobijeni iz drugog načina naklijavanja konidija (Tabela 16).

Tabela 16. Broj klijalih konidija proučavanih izolata *Eutypa* sp. i dva kontrolna izolata *E. lata* pod kontinuiranim dejstvom UV svetla

Izolati		Podloga			
		PDA	MA	GWA	WA
EL17	Prosek	0,14	0,17	0,18	0,05
	Minimum	0	0	0	0
	Maximum	5	5	7	2
EL27	Prosek	0,16	0,19	0,27	0,07
	Minimum	0	0	0	0
	Maximum	5	10	10	5
EL29	Prosek	0,13	0,21	0,29	0,07
	Minimum	0	0	0	0
	Maximum	5	6	7	7
EL30	Prosek	0,15	0,19	0,20	0,03
	Minimum	0	0	0	0
	Maximum	5	8	5	1
8F	Prosek	0,12	0,14	0,20	0,03
	Minimum	0	0	0	0
	Maximum	5	7	5	3
BX1.10	Prosek	0,14	0,21	0,18	0,05
	Minimum	0	0	0	0
	Maximum	7	6	8	1

Broj klijalih konidija predstavlja jedan od mernih parametara i dobijeni rezultati su obrađeni analizom varijanse kao dvofaktorijalni ogled, gde su jedan faktor broj klijalih konidija ispitivanih izolata a drugi podloge (Tabela 17).

Tabela 17. Rezultati dvofaktorijalne analize varijanse broja klijalih konidija ispitivanih izolata *Eutypa* sp., primenom Dankanovog testa značajnosti $p=0,05$

Izvor varijacije	Suma kvadrata	Stepeni slobode	Varijanse	F količnik	p vrednosti
Izolati	0,880	5	0,176	0,227	0,951
Podloga	9,819	3	3,273	4,216	0,006
Izolati + Podloga	0,875	15	0,058	0,075	1,000
Greška	1862,947	2400	0,776		
Ukupno	1874,535	2423			

Poređenjem F količnika je utvrđeno da između izolata ne postoji značajna statistička razlika u broju klijalih konidija. Međutim na osnovu F količnika za podloge se vidi da postoji statistička razlika između podloga u klijanju konidija. Naime p vrednost je 0,006, što je manje od 0,05.

Nakon izračinavanja analize varijanse pristupilo se parnim poređenjem izolata pomoću Dankanovog testa 0,05. Tako, klijanje konidija koje potiču sa podloge GWA je statistički značajno veće, nego kod konidija koje potiču sa WA (Tabela 17). Broj klijalih konidija, kao zaseban morfološki kriterijum, nije grupisao ispitivane izolate.

5.5.3. Reproduktivne tvorevine teleomornog stadijuma ispitivanih izolata *Eutypa* sp.

Ni jedan proučavani izolat *Eutypa* sp., poreklom iz stabla i krakova vinove loze iz Srbije, kao ni kontrolni izolati *E. lata*, nisu formirali peritecije u kulturi. I pored vrlo dugog čuvanja kultura do njihove potpune iscrpljenosti i posmatranja u više navrata, nakon 30 dana, 6 i 12 meseci, nije došlo do formiranja teleomornog stadijuma. Takođe, teleomorfni stadijum se nije pojavio na biljkama vinove loze inokulisanim izolatima *Eutypa* sp., ni posle 27 meseci. I pored višegodišnjeg praćenja ove bolesti u vinogradima, nije nađen teleomorfni stadijum u prirodi.

5.6. Odgajivačke odlike ispitivanih izolata *Eutypa* sp.

5.6.1. Uticaj različitih podloga na radijalni porast kolonija i sporulaciju proučavanih izolata *Eutypa* sp.

Ispitivanja pokazuju da sve hranljive podloge (PDA, MA, GWA, WA, YA i TA), pri temperaturi 25°C i bez prisustva svetlosti, imaju bitan uticaj na izgled i radijalni porast micelije, kao i sporulaciju izolata *Eutypa* sp. (Slika 25-30).

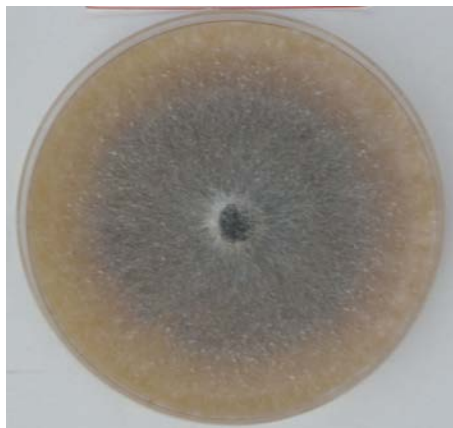
Svi proučavani izolati *Eutypa* sp. na PDA podlozi razvijaju manje - više ujednačene kolonije. Ivice kolonije su cele do blago fibrinozne, ravne. Ivična zona je od prozirne do prljavobele boje i prelazi u bledožutu. Kolonija je pamučasta, sa vazdušnom micelijom u središnjem delu, dok je ka ivici micelija priljubljena za podlogu, pamučnobeke boje. Stromatične tvorevine se ne formiraju nakon deset dana razvoja. Ivična zona naličja kolonije je od bezbojne do bledožute boje, a sam centar je beličaste boje. Posle 30 dana naličje kolonije je kremžute boje i sa slabo uočljivim stromatičnim tvorevinama. Lice kolonije je pamučnobeke boje. Iz stromatičnih tvorevina oslobađa se

sluzasti matriks bledokrem boje u kome se nalaze konidije. Kod izolata EL27, EL29, BX1.10, EL153 i EL158 nakon 15 dana dolazi do formiranja crnog pigmenta u podlozi, koji je rasut po celoj površini Petri kutije (Slika 25). Izolati EL17, EL27, EL29, EL151, EL199, 8f i BX1.10 posle 30 dana stvaraju sluzasti matriks žućkaste boje iz kojeg se izlučuju konidije. Kod izolata EL150, EL152, EL153, EL154, EL155, EL156, EL157 i EL158 konidije se izlučuju iz bledožućkastog matriksa nakon 90 dana.



Slika 25. *Eutypa* sp.: Kolonija izolata EL29 na PDA podlozi nakon 60 dana razvoja.

Na podlozi MA kod svih proučavanih izolata formiraju se vazdušaste kolonije, pamučnobeke boje koja postepeno prelazi u bledo sivu. Na licu kolonije ivična zona je ili neprimetna ili se slabo razlikuje od centralnog dela. Ivična zona naličja kolonije je bezbojna do bledosivo boje, a sam centar je sive boje. Nije uočeno formiranje stromatičnih tvorevina nakon 10 dana od zasejavanja. Posle 30 dana naličje kolonije u centru dobija žućkastu boju, a ka periferiji ostaje beličasto, paperjaste strukture (Slika 26). Kod izolata EL17, EL27, EL29, EL30, EL151, 8F i BX1.10 uočena je pojava kapljica beličastog matriksa iz kojih se oslobađaju konidije. Ostali ispitivani izolati sporulišu tek nakon 90 dana.



Slika 26. *Eutypa* sp.: Kolonija izolata EL29 na MA podlozi nakon 60 dana razvoja.

Na GWA podlozi kod svih ispitivanih izolata ivice kolonije su nepravilne i paperjaste. Micelija je belopaperjasta u centru kolonije. Usled crvenkaste boje podloge naličje kolonije je bledooker, bez formiranja crnih stromatičnih tvorevina. Kod izolata EL27, EL29, EL30, 8F, EL155, EL156 i EL199 na naličju kolonija se naziru koncentrični prstenovi. Izolati EL17, EL27, EL29, EL30, 8F i BX1.10 nakon 30 dana na paperjastoj miceliji formiraju krembeli sluzasti matriks, nepravilno razbacan po površini kolonije, iz kojeg se izlučuju konidije. Ostali izolati sporulišu nakon 90 dana (Slika 27).



Slika 27. *Eutypa* sp.: Kolonija izolata EL27 na GWA podlozi nakon 60 dana razvoja.

Na WA podlozi ivice kolonije svih ispitivanih izolata su cele, blago talasaste. Kolonije su sastavljene od slabo razvijene supstratne micelije, zrakaste strukture, bele boje. Vazдушna micelija je retka, paperjasta i uočava se na celoj površini kolonije. Naličje kolonije nema promenu u boji. Nakon 10 dana nije utvrđeno formiranje

stromatičnih tvorevina, niti jedan izolat ispunjava Petri kutiju. Kod izolata EL17, EL27, EL29, EL30, 8F i BX1.10 posle 60 dana dolazi do formiranja beličastoprozirnog sluzastog matriksa, nepravilno razbacanog po koloniji, iz kojeg se izlučuju konidije. Ostali izolati sporulišu nakon 90 dana (Slika 28).



Slika 28. *Eutypa* sp.: Kolonija izolata EL30 na WA podlozi nakon 90 dana razvoja.

Na YA podlozi ivice kolonije svih proučavanih izolata su cele, blago talasaste, neravne. Vazдушna micelija je razvijena, pamučasta po celoj površini kolonije, bele boje. Naličje kolonije nema promenu u boji. Kod svih izolata ivičnu zonu kolonije čini supstratna micelija, a u središtu kulture se razvija vazдушna micelija, puderaste strukture, bele boje. Nakon 10 dana razvoja ni kod jednog izolata nije ispunjena Petri kutija. Takođe, ni kod jednog izolata nije utvrđeno formiranje stromatičnih tvorevina ni posle 90 dana (Slika 29).



Slika 29. *Eutypa* sp.: Kolonija izolata EL30 na YA podlozi nakon 10 dana razvoja.

Na podlozi TA kod nijednog ispitivanog izolata nije uočen razvoj kolonije na podlozi nakon 10 dana od zasejavanja, kao ni posle 60 i 90 dana od zasejavanja (Slika 30). Na TA podlozi nije utvrđeno formiranje stromatičnih tvorevina na nakon 90 dana (Slika 30).



Slika 30. *Eutypa* sp.: Kolonija izolata EL199 na TA podlozi nakon 10 dana razvoja.

Uticaj hranljivih podloga na radijalni porast kolonija i sporulaciju izolata *E. lata* pokazuju da se kolonije dobro razvijaju na PDA, MA, GWA, a nešto slabije na WA, YA, dok na podlozi TA ni jedan ispitivani izolat nije razvio kolonije.

Radijalni porast kolonije praćen je merenjem prečnika kolonije tokom 10 dana od zasejavanja, dok prvi izolat nije u potpunosti prekrpio Petri kutiju, pri temperaturi od 25 °C, bez prisustva svetlosti.

Na radijalni porast kolonija svih 16 proučavanih izolata statistički značajno su uticale različite podloge (Tabela 18). Dobijeni rezultati obrađeni su analizom varijanse, kao dvofaktorijalni ogled, gde su prvi faktor podloge, a drugi izabrani izolati.

Tabela 18. Prosečni radijalni porast kolonija na 6 podloga proučavanih izolata *Eutypa* sp., nakon 10 dana od zasejavanja, primenom Dankanovog testa značajnosti $p = 0,05$

Izolati	Prečnik kolonije (mm)					
	Podloge					
	PDA	MA	GWA	KA	WA	TA
EL17	89,00a	87,20ab	90,00a	66,80abc	74,20de	0,00a
EL27	89,20a	84,40b	90,00a	59,80cdef	64,20g	0,00a
EL 29	88,00a	90,00a	90,00a	61,20bcdef	78,00cd	0,00a
EL30	88,20a	88,20ab	81,20b	59,60defg	69,20f	0,00a
EL150	89,00a	87,20ab	86,00ab	65,20bcd	76,00de	0,00a
EL151	88,60a	88,00ab	85,00ab	62,60bcd	62,40g	0,00a
EL152	89,40a	86,40ab	90,00a	63,80abcd	82,80abc	0,00a
EL153	88,80a	89,00ab	88,00a	70,40a	86,00ab	0,00a
EL154	88,80a	86,00ab	76,80d	61,60bcde	72,00ef	0,00a
EL155	89,20a	88,80ab	89,00a	68,60ab	76,00de	0,00a
EL156	89,00a	88,80ab	89,00a	54,00fg	76,00de	0,00a
EL157	89,00a	84,00b	87,00ab	52,40g	86,00ab	0,00a
EL158	89,00a	89,00ab	89,00a	60,20cdef	81,00c	0,00a
EL199	89,00a	86,40ab	89,00a	60,40cdef	81,00c	0,00a
8F	89,00a	87,00ab	88,80a	59,00cdef	83,00abc	0,00a
BX1.10	89,00a	90,00a	89,00a	65,60abc	82,00bc	0,00a

*Podaci u kolonama obeleženi istim slovima nisu statistički značajno različiti na osnovu Dankanovog testa $p = 0,05$.

Primenom dvofaktorijalne analize varijanse (ANOVA) za značajnost utvrđenih razlika između podloga, dobijena je p vrednosti od 0,000, koja je manja od 0,05, što znači da su te razlike statistički značajne (Tabela 19).

Kod značajnosti razlika prosečnih ocena za izolate, p vrednost je 0,000 i manja je od 0,05. Ovakva p vrednost ukazuje na postojanje značajne statističke razlike između prosečnih ocena pojedinih izolata. Ono što je bitno uočiti je da je p vrednost za interakciju podloge i izolata manja od 0,05 (Tabela 18, 19), što znači da se izolati ne ponašaju isto po pojedinim podlogama, a isto tako se podloge ne ponašaju na isti način po pojedinim izolatima. Nakon izračunavanja analize varijanse pristupilo se parnim poređenjima izolata pomoću Dankanovog testa, dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 19.

Tabela 19. Rezultati dvofaktorijalne analize varijanse uticaja 6 podloga na porast kolonija proučavanih izolata *Eutypa* sp., primenom Dankanovog testa značajnosti $p=0,05$

Izvor varijacije	Suma kvadrata	Stepeni slobode	Varijanse	F količnik	p vrednosti
Izolati	1565,717	15	104,381	11,527	0,000
Podloge	460660,749	5	92132,150	10173,978	0,000
Izolati+Podloge	5262,221	75	70,163	7,748	0,000
Greška	3477,376	384	9,056		
Ukupno	470966,063	479			

Takođe je utvrđeno da na PDA podlozi, na osnovu p vrednosti od 0,363 koja je veća od 0,05 ne postoje značajne statističke razlike u porastu između izolata i formirana je jedna homogena grupa (Tabela 18, 19, 20). Na MA podlozi nakon parnog poređenja prosečnih vrednosti radijalnog porasta kolonija ispitivanih izolata uočava se formiranje se 3 homogene grupe. U prvu homogenu grupu smešteni su sledeći izolati EL157, EL27, EL154, EL152, EL199, 8F, EL17, EL150, koji ne pokazuju značajnu statističku razliku u grupi sem izolata EL157, koji je jasno odven od ostalih. Izolati EL27, EL154, EL152, EL199, 8F, EL17, EL150 su smešteni u drugu i treću homogenu grupu, što znači da ne postoji značajna statistička razlika ovih izolata u porastu na ovoj podlogzi. Izolati EL151 i EL30 smešteni su u drugu i u treću homogenu grupu, što znači da nisu jasno grupisani i ne ispoljavaju značajne statističke razlike u prosečnom radijalnom porastu kolonija. U trećoj homogenoj grupi jasno su izdvojeni izolati EL155, EL156, EL153, EL158, EL29 i BX1.10, a to znači da oni ispoljavaju značajnu statističku razliku u prosečnom radijalnom porastu kolonija u odnosu na ostale izolate iz grupe. Isto tako na osnovu parnog poređenja prečnika kolonije na GWA podlozi, pokazala su izdvajanje 4 homogene grupe, pri čemu se prva (EL154) i druga grupa (EL30) jasno odvajaju od treće i četvrte homogene grupe, odnosno ispoljavaju statistički značajno manji radijalni porast kolonije u odnosu na druge izolate. Treća i četvrta homogena grupa takođe ne ispoljavaju značajne statističke razlike u prosečnom radijalnom porastu između izolata, što se vidi iz p vrednosti, koje su 0,061, odnosno 0,66. U treću i četvrtu homogenu grupu spadaju ostali proučavani izolati i oni imaju znatno veći prosečni radijalni porast u odnosu na izolate EL154 i EL30 iz prve i druge homogene grupe, ali izolati u okviru

ovih grupa između sebe ne ispoljavaju značajne statističke razlike u radijalnom porastu kolonija (Tabela 18, 20).

Tabela 20. Homogene grupe dobijene analizom varijanse prosečnih vrednosti porasta proučavanih izolata *Eutypa* sp. na 6 podloga, primenom Dankanovog testa značajnosti $p=0,05$

Podloge	<i>p</i> vrednosti						
	Homogene grupe						
	1	2	3	4	5	6	7
PDA	0,363						
MA	0,114	0,062	0,056				
GWA	1,000	1,000	0,061	0,066			
KA	0,573	0,053	0,054	0,050	0,66	0,106	
WA	0,437	0,228	0,127	0,147	0,060	0,060	0,063
TA	0,000						

Nakon parnog poređenja prečnika kolonija proučavanih izolata na podlozi KA na osnovu p vrednosti uočava se izdvajanje 6 homogenih grupa. Prva homogena grupa u koju spadaju izolati EL157 i EL156 ostvaruje najslabiji porast u odnosu na druge izolate što se vidi iz p vrednosti 0,573 koja je veća od 0,05 i samim tim se ne ispoljava značajna statistička razlika u okviru grupe. Druga, treća, četvrta i peta homogena grupa u koje su smešteni većina izolata, nisu značajno statistički različite, što se vidi iz p vrednosti koje su 0,053, 0,054, 0,050 i 0,066, to znači da ova podloga ne utiče na razdvajanje izolata, odnosno da je radijalni porast kolonija približnih vrednosti. U šestu grupu jasno se izdvaja samo izolat EL153 koji ostvaruje statistički najveći porast na ovoj hranljivoj podlozi (Tabela 20).

Na podlozi WA nakon parnog poređenja prosečnih vrednosti prečnika kolonija proučavanih izolata utvrđeno je izdvajanje 7 homogenih grupa. Statističkom analizom p vrednosti (Tabela 18, 20) vidi se da postoje razlike među homogenim grupama, što se ogleda u brzini porasta kolonija na ovoj hranljivoj podlozi. Pa tako, p vrednost prve homogene grupe je 0,437 u koju spadaju izolati EL151 i EL27 koji ostvaruju najslabiji porast na podlozi WA u odnosu na druge homogene grupe. Treća i četvrta homogena grupa statistički se ne razlikuju, što se vidi iz p vrednosti (Tabela 20). Isto tako peta, šesta i sedma homogena grupa ne ispoljavaju statistički značajne razlike u porastu. U

sedmoj homogenoj grupi izolati EL153 i EL157 ispoljavaju statistički značajano veći radijalni porast kolonije u odnosu na izolate iz te grupe. Što znači da ispitivana podloga ne utiče na jasno razdvajanje ispitivanih izolata po grupama, odnosno da nema značajne statističke razlike među izolatima.

Na podlozi TA nije došlo do razvoja micelije ni jednog proučavanog izolata. Analizom rezultata došlo se do zaključka da vrsta podloge, kao poseban kriterijum, ne može potpuno da podrži sva predhodno uočena grupisanja ispitivanih izolata gljive.

Na osnovu gore navedene statističke analize utvrđeno je da su izolati EL29, EL30, 8F, EL154 i EL158 imali veću statističku razliku u prosečnom radijalnom porastu na podlozi MA, dok su ostali izolati imali veći radijalni porast na podlozi PDA. Nešto slabiji radijalni porast izolata bio je na podlogama GWA, WA i KA (Slika 25-30, Tabela 18).

Takođe je praćen uticaj tipa podloga na nivo sporulacije proučavanih izolata. Određivanje nivoa sporulacije vršeno je brojanjem konidija/ml suspenzije (Tabela 21).

Tabela 21. Uticaj 6 podloga na broj konidija (mm^2) proučavanih izolata *Eutypa* sp. nakon 90 dana, primenom Dankanovog testa značajnosti $p=0,05$

Izolati	Podloge					
	Broj konidija (mm^2)					
	PDA	MA	GWA	KA	WA	TA
EL17	78,25a	48,19a	40,00a	0,00a	6,25a	0,00a
EL27	78,94a	46,88a	39,56a	0,00a	5,88ab	0,00a
EL29	46,50ab	39,69a	45,00a	0,00a	4,13c	0,00a
EL30	41,88ab	51,06a	40,75a	0,00a	4,63bc	0,00a
EL150	20,38b	8,88b	7,50cd	0,00a	1,13d	0,00a
EL151	22,06b	37,44a	12,69c	0,00a	1,19d	0,00a
EL152	14,88b	11,56b	9,44cd	0,00a	1,19d	0,00a
EL153	13,50b	11,00b	8,44cd	0,00a	1,19d	0,00a
EL154	16,69b	10,81b	3,94d	0,00a	1,00d	0,00a
EL155	12,25b	9,44b	9,94cd	0,00a	1,25d	0,00a
EL156	16,06b	9,25b	11,50c	0,00a	1,25d	0,00a
EL157	15,13b	12,56b	8,69cd	0,00a	1,25d	0,00a
EL158	14,13b	10,63b	7,25cd	0,00a	1,38d	0,00a
EL199	14,88b	10,94b	7,75cd	0,00a	1,25d	0,00a
8F	39,88bc	41,69a	31,06b	0,00a	4,94abc	0,00a
BX1.10	37,06bc	39,19a	25,81b	0,00a	3,75c	0,00a

*Podaci u kolonama obeleženi istim slovima nisu statistički značajno različiti na osnovu Dankanovog testa $p=0,05$.

Broj konidija je parametar koji je pojedinačno statistički analizan u cilju određivanja njegove pogodnosti kao kriterijuma za razlikovanje proučavanih izolata *Eutypa* sp. Broj konidija je jedan od prvih mernih parametara i dobijeni rezultati su obrađivani analizom varijanse kao dvofaktorijalni ogled, gde su jedan faktor broj konidija po izolatima a drugi podloge (Tabela 22).

Tabela 22. Rezultati dvofaktorijalne analize varijanse broja konidija ispitivanih izolata *Eutypa* sp. na 6 proučavanih podloga, primenom Dankanovog testa značajnosti $p=0,05$

Izvor varijacije	Suma kvadrata	Stepeni slobode	Varijanse	F količnik	<i>p</i> vrednosti
Izolati	115556,374	15	7703,758	246,622	0,000
Podloge	236301,745	5	47260,349	1512,955	0,000
Izolati+Podloge	126561,723	75	1687,490	54,022	0,000
Greška	44981,438	1440	31,237		
Ukupno	523401,281	1535			

Poređenjem F količnika je utvrđeno da između broja konidija na izolatima postoje značajne statističke razlike. Nakon izračunavanja analize varijanse pristupilo se parnim poređenjem izolata Dankanovim testom 0,05 (Tabela 22).

Broj konidija, kao zaseban morfološki kriterijum, grupisao je u izvesnoj meri izolate. Tako su se na osnovu broja konidija na PDA podlozi jasno izdvojile 6 homogene grupe proučavanih izolata, koje pokazuju značajnu statističku razliku između sebe. U prvu homogenu grupu jasno se izdvaja izolat EL155, koji ispoljava statistički značajno manji broj konidija od ostalih izolata. Isto tako izolati EL153, EL158, EL152, EL199, EL157, EL156, EL154 su raspoređeni u 2 homogene grupe i ne ispoljavaju značajnu statističku razliku u broju konidija između sebe (Tabela 23).

U treću homogenu grupu spadaju izolati EL156 i 154 koji ne pokazuju značajnu statističku razliku između prve i druge grupe i izolati EL150 i EL151. U četvrtu homogenu grupu su smešteni referentni izolati 8F, BX1.10, koji pokazuju značajnu statističku razliku u odnosu na druge izolate. Dok izolati iz 6 homogene grupe EL17 i EL27 formiraju statistički značajno veći broj konidija od ostalih izolata (Tabela 23).

Tabela 23. Homogene grupe dobijene analizom varijanse prosečnog broja konidija ispitivanih izolata *Eutypa* sp. na PDA podlozi, primenom Dankanovog testa značajnosti $p=0,05$

Izolati	Homogene grupe					
	1	2	3	4	5	6
EL155	12,25b					
EL153	13,50b	13,50b				
EL158	14,13b	14,13b				
EL152	14,88b	14,88b				
EL199	14,88b	14,88b				
EL157	15,13b	15,13b				
EL156	16,06b	16,06b	16,06b			
EL154	16,69b	16,69b	16,69b			
EL150		20,38b	20,38b			
EL151			22,06b			
BX1.10				37,06bc		
8F				39,88bcd		
EL30				41,88ab	41,88ab	
EL29					46,50ab	
EL17						78,25a
EL27						78,94a
p vrednost	0,228	0,057	0,076	0,142	0,134	0,824

*Podaci u kolonama obeleženi istim slovima nisu statistički značajno različiti na osnovu Dankanovog testa $p=0,05$.

Na drugim podlogama uočava se veći broj homogenih grupa, pa tako na podlogama MA i WA uočavaju se po 4 homogene grupe a na podlozi GWA čak 7. Ove homogene grupe ukazuju na postojanje značajne statističke razlike. Kod podloga MA, WA i GWA jasno se izdvajaju homogene grupe u koje su smešteni izolati EL17, EL27, EL29, EL30, 8 F, BX1.10, EL151 koji imaju statistički značajno veći broj konidija u odnosu na ostale testirane izolate. Broj konidija, kao zaseban odgajivački kriterijum, ne može potpuno da podrži sva predhodno uočena grupisanja ispitivanih izolata *Eutypa* sp.

5.6.2. Uticaj svetlosti na razvoj i sporulaciju proučavanih izolata *Eutypa* sp.

Tokom ovih istraživanja proučavan je radijalni porast kolonija i sporulacija svih ispitivanih izolata pod uticajem 12 h UV i 12 h tame (Slika 31), pri uticaju 12 h svetlosti i 12 h tame (Slika 32) i pri uticaju 24 h UV (Slika 33) u periodu od 30 dana.

Ispitivanja pokazuju da svi proučavani tipovi svetlosti ne utiču statistički značajno na radijalni porast ispitivanih izolata, ali zato izazivaju značajnu statističku razliku u sporulaciji istih.

Radijalni porast ispitivanih kolonija je zasebno statistički analiziran u cilju određivanja njegove pogodnosti kao kriterijuma za razlikovanje ispitivanih izolata *Eutypa* sp. (Tabela 24).

Tabela 24. Uticaj 3 tipa svetlosti na radijalni porast kolonija ispitivanih izolata *Eutypa* sp. nakon 10 dana od zasejavanja, primenom Dankanovog testa značajnosti $p=0,05$

Izolati	Prečnik kolonije (mm)		
	Tip Svetlosti		
	24 h UV 30 dana	12 h UV+12 h tama	12 h svetlo+12 h tama
EL17	86,00a	88,00ab	88,00a
EL27	88,00a	89,20ab	86,00ab
EL29	87,80a	88,40ab	87,60ab
EL30	87,80a	88,00ab	87,00ab
EL150	86,00a	87,20b	87,00ab
EL151	88,00a	87,80b	88,00a
EL152	87,40a	89,00ab	84,00abc
EL153	87,00a	86,60c	85,40abc
EL154	88,00a	88,00b	86,40ab
EL155	84,00a	88,00b	86,00ab
EL156	87,40a	87,00b	84,40abc
EL157	86,60a	88,40ab	86,00ab
EL158	84,40a	88,80ab	85,40abc
EL199	86,80a	88,40abc	85,40abc
8F	87,00a	87,20b	86,00ab
BX1.10	85,00a	87,20b	85,40abc

*Podaci u kolonama obeleženi istim slovima nisu statistički značajno različiti na osnovu Dankanovog testa $p=0,05$.



Slika 31. *Eutypa* sp.: Izgled kolonije izolata EL27 na PDA podlozi izloženog uticaju 12 h UV svetla i 12 h tama (UV-T) u periodu od 30 dana.

Radijalni porast kolonija je prvi merni parametar i dobijeni rezultati su obrađivani analizom varijanse kao dvofaktorijalni ogled, gde su jedan faktor ispitivani izolati a drugi različiti tipovi svetlosti (Tabela 25).

Poređenjem F količnika je utvrđeno da između izolata ne postoje statistički značajne razlike u prosečnom radijalnom porastu pod uticajem različitih tipova svetlosti. Parnim poređenjem izolata pomoću Dankanovog testa 0,05 može se uočiti da radijalni porast kolonija pod uticajem različitih tipova svetlosti nije grupisao ispitivane izolate, a to znači da ne postoji statistička razlika u prosečnom radijalnom porastu ispitivanih izolata pod uticajem različitih tipova svetlosti.

Tabela 25. Rezultati dvofaktorijalne analize varijanse prosečnih vrednosti radijalnog porasta (mm) proučavanih izolata pod uticajem 3 tipa svetlosti, primenom Dankanovog testa značajnosti $p= 0,05$

Izvor varijacije	Suma kvadrata	Stepeni slobode	Varijanse	F količnik	p vrednosti
Izolati	160,783	15	10,719	1,082	0,375
Tip svetlosti	265,300	2	132,650	13,396	0,000
Izolati + Tip svetlosti	259,367	30	8,646	0,873	0,660
Greška	1901,200	192	9,902		
Ukupno	2586,650	239			



Slika 32. *Eutypa* sp.: Izgled kolonije izolata EL151 na PDA podlozi izloženog uticaju 12 h svetla i 12 h tame (S-T) u periodu od 30 dana.



Slika 33. *Eutypa* sp.: Izgled kolonije izolata EL199 na PDA podlozi izloženog uticaju 24 h ultravioletne svetlost (UV) u periodu od 30 dana.

Broj konidija obrazovanih po mm² kolonije statistički je značajno uslovljen varijantom veštačke svetlosti i tame (24 h UV, 12 h UV i 12 h tame i 12 h svetlosti i 12 h tame u periodu od 30 dana) kod svih 14 proučavanih izolata *Eutypa* sp. i 2 kontrolna izolata *E. lata*. Dobijeni rezultati obrađeni su analizom varijanse kao dvofaktorijani ogled, gde su jedan faktor ispitivani izolati a drugi tipovi svetlosti (Tabela 26).

Poređenjem F količnika utvrđeno je da između izolata postoje statistički vrlo značajne razlike. Nakon izračunavanja analize varijanse pristupilo se parnim poređenjem rezultata pomoću Dankanovog testa 0,05. Ustanovljeno je da prosečan broj konidija pod uticajem tipova svetlosti 24 h UV, 12 h UV i 12 h tame i 12 h svetlosti i 12 h tame u periodu od 30 dana grupisao u izvesnoj meri ispitivane izolate.

Tabela 26. Rezultati dvofaktorijalne analize varijanse prosečnog broja konidija proučavanih izolata *Eutypa* sp. pod uticajem 3 tipa svetlosti, primenom Dankanovog testa značajnosti $p = 0,05$

Izvor varijacije	Suma kvadrata	Stepeni slobode	Varijanse	F količnik	<i>p</i> vrednosti
Izolati	152356,092	15	10157,073	141,679	0,000
Tip svetlosti	13274,784	2	6637,392	92,584	0,000
Izolati + Tip svet.	16891,591	30	563,053	7,854	0,000
Greška	51617,313	720	71,691		
Ukupno	234139,780	767			

Takođe je ustanovljeno da pri izlaganju 14 proučavanih izolata *Eutypa* sp., kao i 2 kontrolna izolata *E. lata*, 24 h UV svetlu u trajanju od 30 dana obrazuje se najveći broj konidija (Tabela 27). Dok su se tipovi svetla 12 h UV i 12 h tame i 12 h svetla i 12 h tame pokazale manje pogodnim za sporulaciju proučavanih izolata *Eutypa* sp., kao i 2 kontrolna izolata *E. lata*.

Tako se na osnovu broja konidija pod uticajev 24 h UV svetla, jasno izdvojile 4 homogene grupe izolata (Tabela 27). U prvoj homogenoj grupi izolat EL152 ispoljava statistički značajno manji broj konidija u odnosu na izolate u svojoj grupi. Dok su izolati EL153, EL154, EL150, EL158, EL199, EL157, EL156 i EL155 iz prve grupe grupisani i u drugu grupu, što znači da između njih ne postoji značajna statistička razlika. U drugu grupu se jasno izdvaja izolat EL151, a u treću izolat EL30, ostali izolati iz treće grupe BX1.10 i 8F i EL29 se ne odvajaju jasno od četvrte homogene grupe, to jest između njih ne postoji značajna statistička razlika u broju konidija. Dok se u četvoroj grupi jasno izdvajaju izolati EL27 i EL17 koji ispoljavaju značajnu statističku razliku u broju konidija u odnosu na druge ispitivane izolate.

Tabela 27. Homogene grupe dobijene analizom varijanse prosečnog broja konidija ispitivanih izolata *Eutypa* sp. pod uticajem 24 h UV svetla u trajanju od 30 dana, primenom Dankanovog testa značajnosti $p=0,05$

Izolati	Homogene grupe			
	1	2	3	4
EL152	11,88e			
EL153	12,13e	12,13e		
EL154	13,06de	13,06de		
EL150	13,75de	13,75de		
EL158	13,94de	13,94de		
EL199	15,00de	15,00de		
EL157	15,38de	15,38de		
EL156	16,06de	16,06de		
EL155	17,69de	17,69de		
EL151		20,44d		
EL30			29,44c	
BX1.10			33,31bc	33,31bc
8F			33,934abc	33,934abc
EL29			35,19abc	35,19abc
EL27				40,38ab
EL17				40,94a
<i>p</i> vrednost	0,186	0,054	0,154	0,062

*Podaci u kolonama obeleženi istim slovima nisu statistički značajno različiti na osnovu Dankanovog testa $p=0,05$.

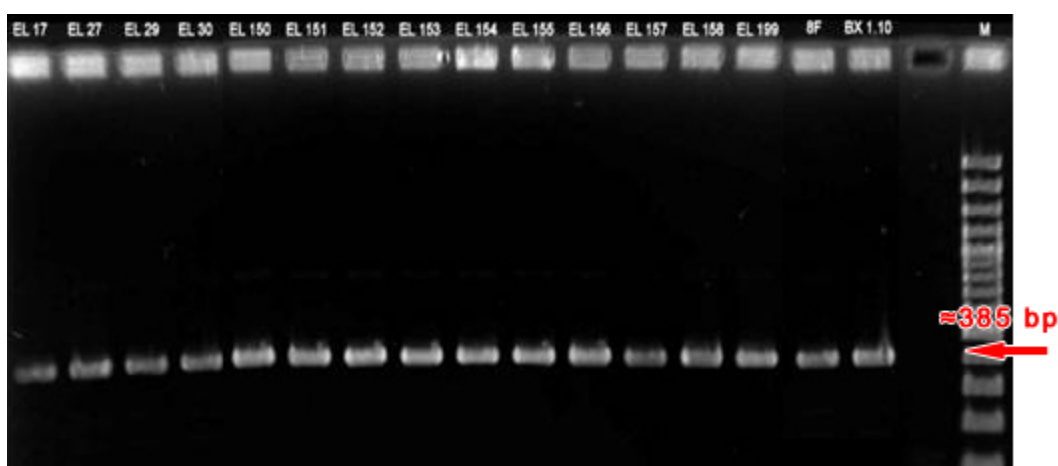
Parnim poređenjem izolata pri 12 h UV i 12 h tame formira se 6 homogenih grupa, dok pri uticaju 12 h svetlosti i 12 h tame se formira 5 homogenih grupa. S tim da su se izolati EL17, EL27, EL29, EL30, 8F i BX1.10 sa ststistički značano većim brojem konidija kod oba tipa svetlosti jasno izdvojili od ostalih proučavanih izolata. Takodje, može se uočiti da broj konidija, kao zaseban odgajivački kriterijum, ne može u potpunosti da podrži sva predhodno uočena grupisanja ispitivanih izolata *Eutypa* sp.

5.7. Molekularna detekcija i identifikacija proučavanih izolata

Molekularna metoda lančane reakcije polimeraze i sekvenciranje umnoženih fragmenata DNK uspešno su primenjeni za detekciju, identifikaciju i karakterizaciju proučavanih izolata *Eutypa* sp. Nakon ekstrakcije ukupne DNK ispitivanih izolata obavljene su PCR reakcije sa jednim parom specifičnih prajmera (Lata 1-Lata 2.2) u

cilju detekcije ispitivanih izolata do nivoa vrste. Isto tako obavljena je RFLP-PCR analiza sa univerzalnim parom prajmera ITS1-ITS4 i *AluI* restrikcijom. Potom su obavljene PCR reakcije sa 3 para univerzalnih prajmera (ITS1-ITS4, T1/Bt2b i RPB2-7F-RPB2-11aR) za identifikaciju i karakterizaciju ispitivanih izolata.

Specifični par prajmera Lata 1-Lata 2.2 za determinaciju vrste *E. lata* omogućuje amplifikaciju ITS regiona ribozomalne DNK i 5.8 rRNA (ITS1/ITS2 regiona). Poređenjem amplifikovanih fragmenata testiranih izolata, sa korišćenim markerom (M), ustanovljeno je prisustvo amplikona očekivane veličine oko 385 bp kod svih izolata. Kod negativne kontrole nije došlo do amplifikacije (Slika 34).



Slika 34. Amplifikovani fragmenti DNK *Eutypa* sp. veličine oko 385 bp dobijeni korišćenjem para prajmera Lata 1-Lata 2.2. Kolone: EL17, EL27, EL29, EL30, EL150, EL151, EL152, EL153, EL154, EL155, EL156, EL157, EL158, EL199 – proučavani izolati; 8F i BX1.10 – referentni izolati; – negativna kontrola; M-50 bp DNK Step Ladder.

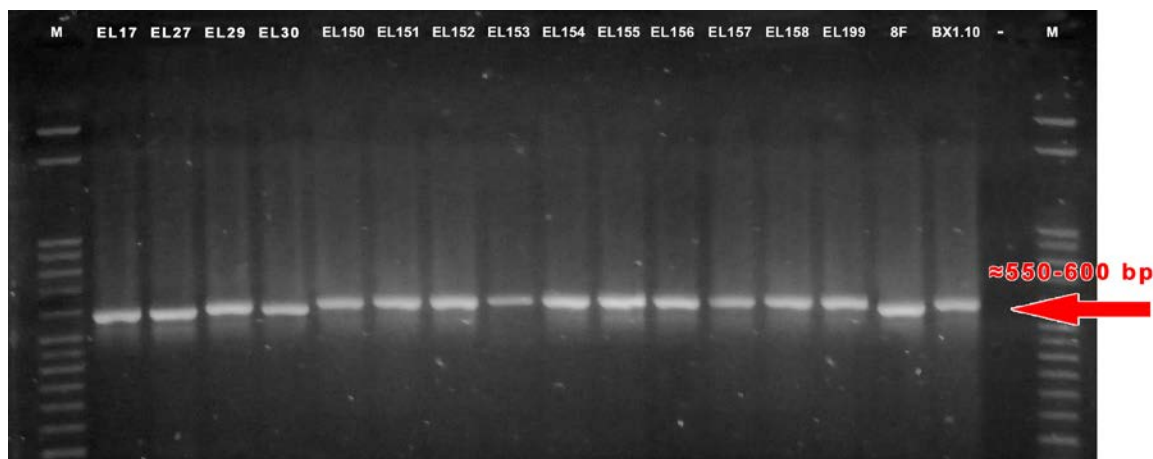
Za RFLP-PCR analizu korišćeno je 14 izolata *Eutypa* sp.: EL17, EL27, EL29, EL30, EL150, EL151, EL152, EL153, EL154, EL155, EL156, EL157, EL158 i EL199. Takođe, kao referentni izolati korišćeni su i izolati 8F i BX1.10 *E. lata*.

PCR produkti dobijeni primenom para prajmera ITS1-ITS4 koji umnožavaju ITS region ribozomalne DNK, tretirani su sa *AluI* restrikcijom (Slika 35). Nakon digestije formirane su tri restrikcione trake od 100, 200 i 300 bp kod svih proučavanih i referentnih izolata. Kod negativne kontrole nije došlo do amplifikacije.



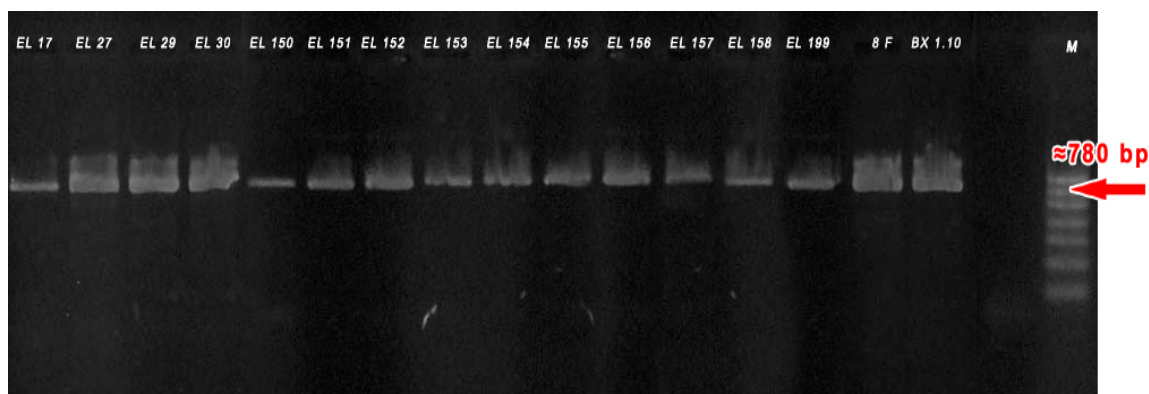
Slika 35. Elektroforetska analiza PCR proizvoda *Eutypa* sp. dobijenih korišćenjem para prajmera ITS1-ITS4. Umnoženi PCR proizvod (≈ 574 bp) tretiran je *AluI* enzimom. Kolone: EL17, EL27, EL29, EL30, EL150, EL151, EL152, EL153, EL154, EL155, EL156, EL157, EL158, EL199 – proučavani izolati, 8F i BX1.10 – referentni izolati, – negativna kontrola, M – marker, 50 bp DNK Ladder.

Molekularna identifikacija i karakterizacija 14 izolata *Eutypa* sp. poreklom iz vinove loze, kao i 2 referentna izolata *E. lata* 8F i BX1.10, obavljena je korišćenjem univerzalnih prajmera ITS1-ITS4, koji omogućavaju umnožavanje ITS regiona ribozomalne DNK Eukariota. Amplifikovani fragmenati ispitivanih izolata iz vinove loze poređeni su sa korišćenim markerom (M). Prisustvo fragmenata očekivane veličine od oko 550 - 600 bp utvrđeno je kod svih izolata (Slika 36). Do amplifikacije nije došlo kod negativne kontrole.



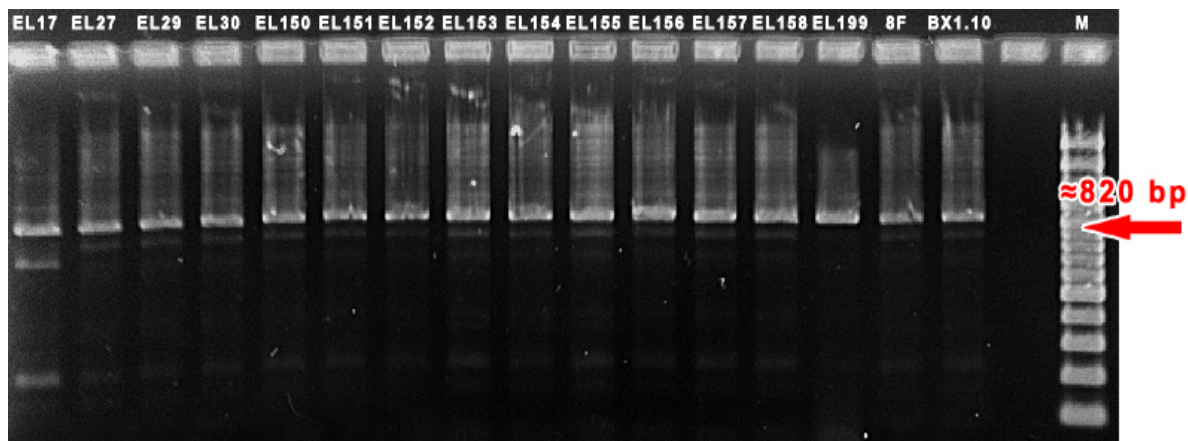
Slika 36. Amplifikovani fragmenati DNK *Eutypa* sp. veličine oko 550 – 600 bp dobijeni korišćenjem para prajmera ITS1-ITS4. Kolone: M – 50 bp DNK Step Ladder; EL17, EL27, EL29, EL30, EL150, EL151, EL152, EL153, EL154, EL155, EL156, EL157, EL158, EL199 – proučavani izolati; 8F i BX1.10 – referentni izolati, – negativna kontrola.

Primenom para prajmera T1/Bt2b, koji omogućuje amplifikaciju proteinskog nuklearnog gena β -tubulin-a i poređenjem amplifikovanih fragmenata testiranih izolata sa korišćenim markerom (M) ustanovljeno je prisustvo amplikona očekivane veličine oko 780 bp. Prinosi ovih reakcija bili su niži kod izolata EL17 i EL150, što se ogleda u vidu prisustva tanjih traka (Slika 37).



Slika 37. Amplifikovani fragmenti DNK *Eutypa* sp. veličine oko 780 bp dobijeni korišćenjem para prajmera T1/Bt2b. Kolone: EL17, EL27, EL29, EL30, EL150, EL151, EL152, EL153, EL154, EL155, EL156, EL157, EL158, EL199 – proučavani izolati; 8F i BX1.10 – referentni izolati, – negativna kontrola; M – 50 bp DNK Step Ladder.

Primenom para prajmera RPB2-7F-RPB2-11aR, omogućena je amplifikacija proteinskog nuklearnog gena RPB2. Poređenjem amplifikovanih fragmenata testiranih izolata sa korišćenim markerom (M), ustanovljeno je prisustvo amplicona očekivane veličine oko 820 bp kod svih ispitivanih izolata (Slika 38).



Slika 38. Amplifikovani fragmenti DNK *Eutypa* sp. veličine oko 820 bp dobijeni korišćenjem para prajmera RPB2-7F-RPB2-11aR. Kolone: EL17, EL27, EL29, EL30, EL150, EL151, EL152, EL153, EL154, EL155, EL156, EL157, EL158, EL199 – proučavani izolati; 8F i BX1.10 – referentni izolati; – negativna kontrola, M-50 bp DNK Step Ladder.

5.7.1. Molekularna identifikacija izolata *Eutypa* sp. poreklom iz vinove loze

Tokom molekularne identifikacije proučavanih izolata uspešno je sekvencirano više genomnih regiona 14 izolata *Eutypa* sp. Sekvencirani su PCR produkti dobijeni primenom prajmera koji omogućavaju amplifikaciju ITS regiona. Takođe, za sekvenciranje i proučavanje genetičke sličnosti sekvenci izolata korišćeni su PCR produkti dobijeni primenom prajmera koji omogućavaju amplifikaciju proteinskog nuklearnog gena β -tubulin kao i RPB2 gena. Dobijene sekvence ITS regiona rDNA i gena β -tubulin i RPB2 prijavljene su u GenBank i dobijeni pristupni brojevi prikazani su u tabeli 28. Identifikacija proučavanih izolata izvršena je višestrukim uparivanjem i proračunom genetičke sličnosti dobijenih sekvenci međusobno, kao i sa sekvencama drugih izolata dostupnih u GenBank bazi podataka.

Za identifikaciju na osnovu ITS regiona odabrano je pet izolata: EL17, EL27, EL29, EL153 i EL199. Svi odabrani izolati prethodno su, na osnovu morfoloških i patogenih osobina, identifikovani kao *Eutypa* sp. Nakon sekvenciranja PCR produkata

dobijenog amplifikacijom iz micelije uzoraka korišćenjem para prajmera ITS1-ITS4, konsenzus nukleotidne sekvence deponovane su u GenBank bazi podataka i dodeljeni su njihovi pristupni brojevi: JQ041699, JQ041700, JQ041701, JQ041702, JQ041703 (Tabela 28).

Tabela 28. Pregled GenBank pristupnih brojeva ispitivanih izolata *Eutypa* sp.

Oznaka izolata	Proučavani region/gen		
	ITS	β -tubulin	RPB2
EL17	JQ041699	-	-
EL27	JQ041700	JX978578	KJ922152
EL29	JQ041701	-	-
EL30	-	JX978579	-
EL150	-	-	KJ922153
EL151	-	JX978580	-
EL152	-	-	KJ922154
EL153	JQ041702	-	-
EL154	-	JX978581	-
EL155	-	JX978582	-
EL156	-	-	KJ922155
EL157	-	JX978583	-
EL158	-	-	KJ922156
EL199	JQ041703	-	-

Međusobnim poređenjem i upotrebom MEGA 5.0 softvera izvršen je proračun genetičke sličnosti sekvenci izolata. Utvrđen je najviši stepen identičnosti koji je iznosio 100%. BLAST analiza sekvence produkata u dužini od oko 555 bp, pokazala je 99,7% nukleotidne identičnosti sa ITS rDNK sekvencama 33 izolata *E. lata* iz GenBank baze podataka. Višestruko uparivanje i proračun genetičke sličnosti odabranih sekvenci obavljen je nakon trimovanja sekvenci na dužinu od 554 bp.

Za sekvenciranje proteinskog gena β -tubulin odabrani su amplifikovani fragmenti 6 izolata izolovanih iz vinove loze: EL27, EL30, EL151, EL154, EL155 i EL157. Konsenzus nukleotidne sekvence deponovane su u GenBank bazu podataka i dodeljeni su njihovi pristupni brojevi: JX978578, JX978579, JX978581, JX978581, JX978582 i JX978583 (Tabela 28). Međusobnim poređenjem sekvenci izolata EL27, EL30, EL151, EL154, EL155 i EL157 korišćenjem MEGA 5.0 softvera, utvrđen je najviši stepen identičnosti od 100%. BLAST analiza sekvence produkta dužine od 800 bp, pokazala je 100% nukleotidne identičnosti sa više izolata *E. lata* deponovanih u GenBank bazi podataka. Primenjeni statistički program je rekonstruisao filogenetsko stablo, na osnovu sekvenci proteinskog nuklearnog gena β -tubulin, na kome se uočavaju

2 grupe izolata u okviru klastera *E. lata* i pored toga što je analiza proračuna genetičke sličnosti pokazala 100% nukleotidne sličnosti. Objašnjenje za ovo grupisanje izolata je da nastaje kao posledica primenjenog statističkog metoda u rekonstrukciji evolutivne povezanosti izolata. Za proračun genetičke sličnosti sve sekvence su svedene na dužinu od 685 bp, koliko je iznosila dužina najkraće sekvence korišćene u analizi.

Izolati EL27, EL150, EL152, EL156 i EL158 nakon amplifikovanja, poslužili su za sekvenciranje gena za DNK zavisnu RNK polimerazu (RPB2). Za međusobno poređenje sekvenci 5 proučavanih izolata korišćen je MEGA 5.0 softver. Nakon sekvenciranja fragmenata umnoženog u PCR reakciji obavljena je molekularna identifikacija sekvence produkta u dužini od oko 820 bp međusobne sličnosti izolata od 100%.

5.7.2. Molekularna karakterizacija *Eutypa lata* patogena vinove loze

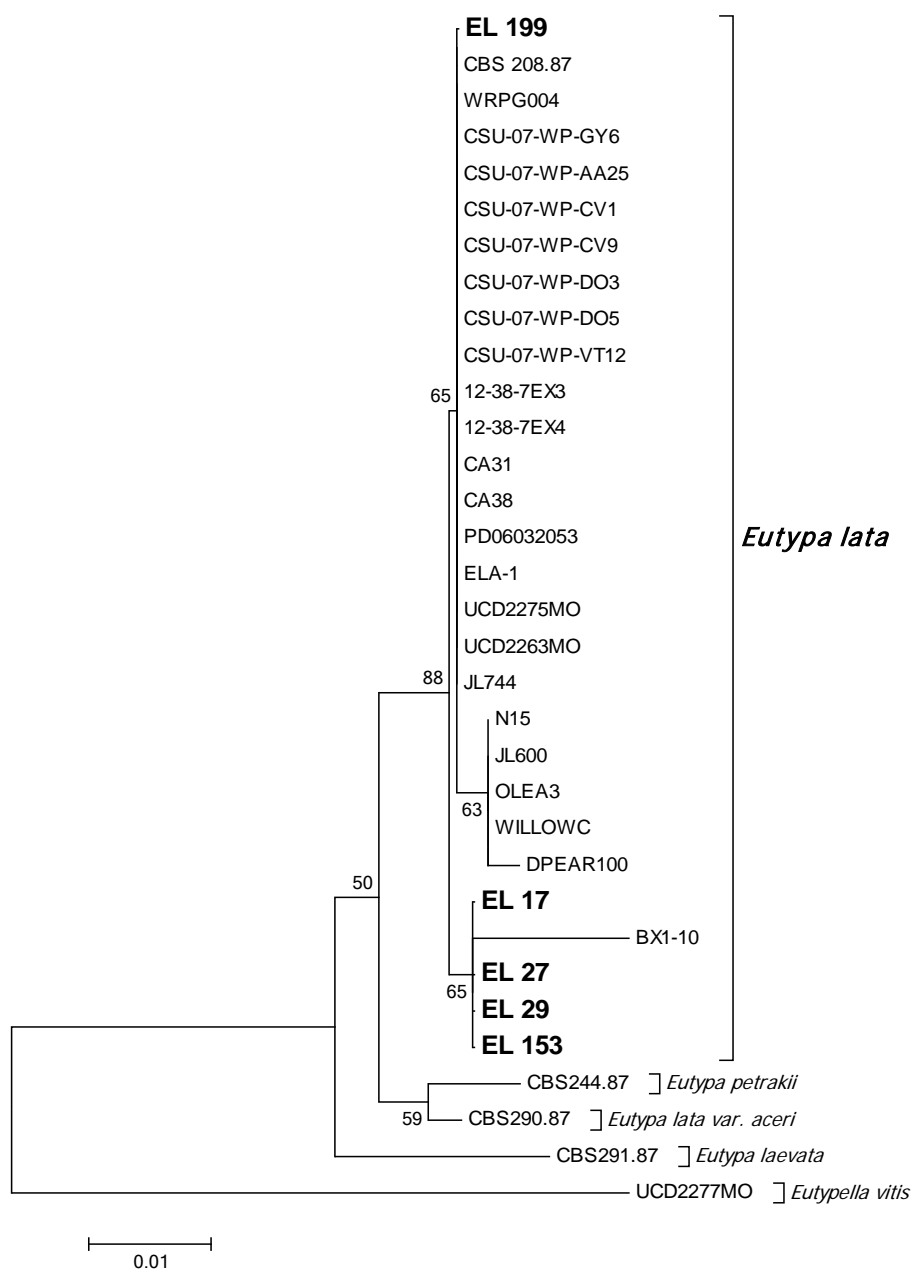
Za filogenetske analize *E. lata*, patogena vinove loze, korišćene su nukleotidne sekvence 3 različita genomna regiona: ITS rDNK, proteinski deo za gen β -tubulin i RPB2 gen. U ova ispitivanja uključeno je više sekvenci sledećih izolata: EL17, EL27, EL29, EL30, EL150, EL151, EL152, EL153, EL154, EL155, EL156, EL157, EL158 i EL199.

Dobijene sekvence vrste *E. lata* uparene su sa odgovarajućim sekvencama *Eutypa* vrsta dostupnim u GenBank bazi podataka i rekonstruisana su tri filogenetska stabla na osnovu odgovarajućih delova genoma.

Filogenetska analiza na osnovu ITS regiona rDNK

Sekvence ITS regiona rDNK izolata EL17, EL27, EL29, EL153, EL199 iz vinove loze poreklom iz Srbije, i 33 dostupne sekvence *Eutypa* vrsta međusobno su uparene i rekonstruisano je filogenetsko stablo, primenom Maximum Parsimony metode sa bootstrap podrškom od 1000 ponavljanja.

Analizom filogenetskog stabla (Slika 39) rekonstruisanog na osnovu sekvenci ITS regiona rDNK, uočljiva je podela na 5 klastera. Utvrđeno je da su proučavani izolati EL17, EL27, EL29, EL153 i EL199 smešteni unutar petog klastera *E. lata*.



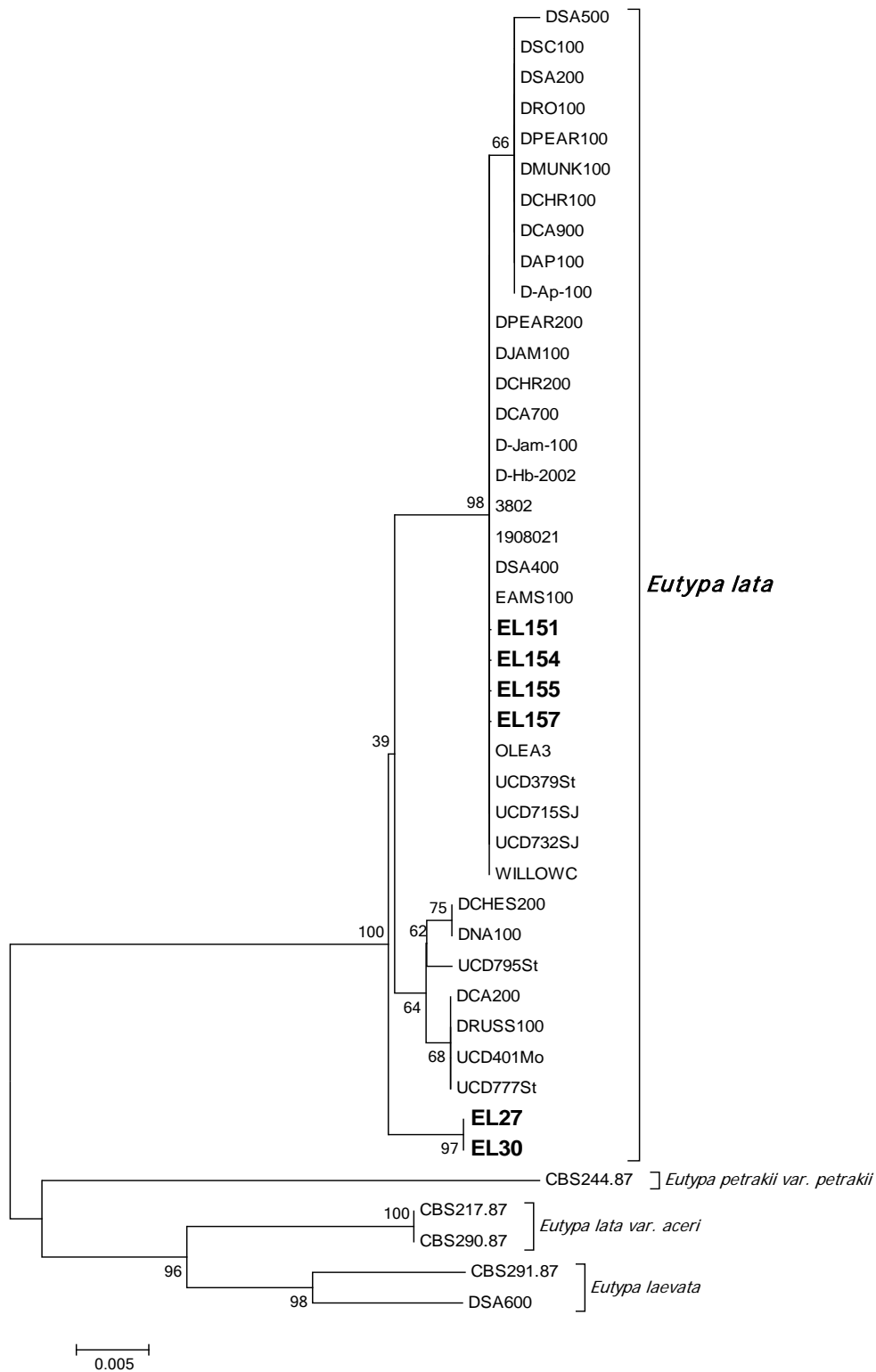
Slika 39. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci ITS regiona rDNK 33 izolata *Eutypa* vrsta, korišćenjem MEGA 5 softvera upotrebom Maximum Parsimony metode sa bootstrap analizom u 1000 ponavljanja, gde su bootstrap vrednosti (>50%). Izolati sekvencirani u ovom radu istaknuti su boldovanim slovima.

U okviru ovog klastera grupisano je 24 izolata *E. lata* (Tabela 4) u 3 grupe, pri čemu su ispitivani izolati grupisani u 2 grupe.

U grupi sa izolatom BX1.10 grupisano je 4 izolata (EL17, EL27, EL29 i EL153). Dok se izolat EL199 nalazi u grupi sa većinom ostalih izolata *E. lata* iz NCBI.

Filogenetska analiza na osnovu proteinskog dela gena β -tubulina

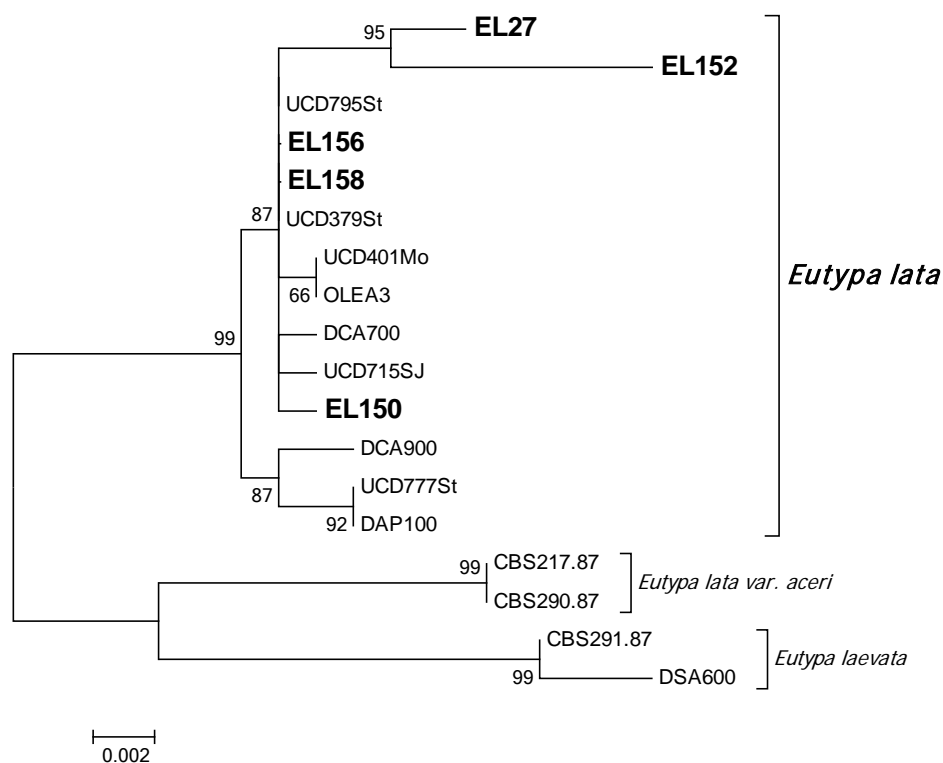
Analizom filogenetskog stabla rekonstruisanog na osnovu nukleotidnih sekvenci proteinskog dela β -tubulina izolata EL27, EL30, EL151, EL154, EL155 i EL157 poreklom iz vinove loze iz Srbije, kao i 41 dostupne sekvence *Eutypa* sp., odabrani izolati su razdvojeni u 4 klastera (Slika 40). Utvrđeno je da su proučavani izolati EL27, EL30, EL151, EL154, EL155 i EL157 smešteni unutar klastera *E. lata* u kome se uočavaju 3 grupe, od kojih su u 2 smešteni ispitivani izolati. Četiri izolata (EL151, EL154, EL155 i EL157) grupisani su u grupi sa većinom ostalih izolata *E. lata* iz NCBI i to je podržano visokom bootstrap vrednošću od 99% i od statističkog je značaja. Izolati EL27 i EL30 grupišu se odvojeno od ostalih izolata *E. lata* i to je podržano sa nešto nižom bootstrap vrednošću od 97%. U okviru ovog klastera grupisano je 33 izolata *E. lata* (Tabela 4). Grupisanje u okviru klastera snažno je podržano sa "bootstrap" analizom od 100%.



Slika 40. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci proteinskog dela β -tubulin regiona genoma 41 izolata *Eutypa* vrsta korišćenjem MEGA 5 softvera i Maximum Parsimony metode sa bootstrap analizom u 1000 ponavljanja gde su bootstrap vrednosti (>50%). Izolati iz sekvencirani u ovom radu istaknuti su boldovanim slovima.

Filogenetska analiza na osnovu sekvenci RPB2 gena

Na osnovu nukleotidnih sekvenci gena RPB2 izolata EL27, EL150, EL152, EL156 i EL158 iz vinove loze poreklom iz Srbije, kao i 13 dostupnih sekvenci *Eutypa* vrsta (Tabela 4), rekonstruisano je filogenetsko stablo u kome su se grupisala 2 klastera (Slika 41).



Slika 41. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci RPB2 gena 13 izolata vrsta *Eutypa*, korišćenjem MEGA 5 softvera i Maximum Parsimony metode sa bootstrap analizom u 1000 ponavljanja gde su bootstrap vrednosti (>50%). Izolati sekvencirani u ovom radu istaknuti su boldovanim slovima.

Sekvence svih ispitivanih izolata iz Srbije smeštene su u klaster *E. lata*. U okviru klastera *E. lata* izdvojile su se 2 grupe izolata. Ispitivani izolati EL27 i EL152 posebno su grupisani u okviru jedne od uočenih grupa klastera *E. lata* koja je podržana visokom bootstrap vrednošću od 93% i od statističkog je značaja. Izolati EL156, EL150 i EL158 se nalaze unutar grupe *E. lata* iz NCBI i to je podržano sa nešto nižom bootstrap vrednošću od 87%. Grupisanje u okviru klastera snažno je podržano sa "bootstrap" analizom od 99%.

5.8. Osetljivost različitih sorti vinove loze prema izolatima *Eutypa lata*

Za ispitivanje osetljivosti različitih sorti vinove loze prema gljivi *E. lata* u uslovima staklenika korišćeno je 14 izolata (Tabela 2) poreklom iz Srbije i 2 referentna izolata ovog parazita, poreklom iz Francuske i Italije. Svi izolati prethodno su okarakterisani proučavanjem morfoloških, odgajivačkih i molekularnih odlika. Ocena osetljivosti/otpornosti, sprovedena je primenom dve metode i to: inokulacija neukorenjenih reznica i inokulacije ukorenjenih reznica vinove loze.

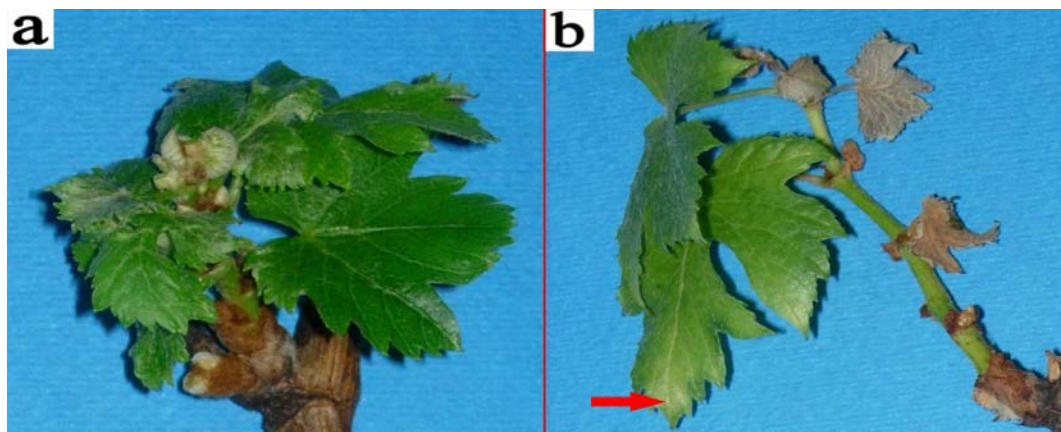
Inokulacija neukorenjenih reznica vinove loze

Za testiranje je odabrano 27 sorti vinove loze. Na reznicama vinove loze svi ispitivani izolati izazvali su simptome odumiranja različitog intenziteta (Slika 42, 43, 44, 45 i 46).



Slika 42. Hloroza i povijanje ivice liske na dole na veštački inokulisanoj reznici vinove loze sorte Radmilovački muskat u prvom vegetacionom ciklusu, 10 nedelja nakon inokulacije, izolat EL199.

Uočeno je da su simptomatični listovi na svim sortama manji od listova na neinokulisanim reznicama. Listovi veštački inokulisanih reznica imaju povijene ivice lisne ploče prema naličju, kao i hlorotične i nekrotične zone po obodu lista koje se kasnije šire po celoj površini lista (Slika 42, 43, 44, 45 i 46). Na kraju dolazi do sušenja i opadanja listova. Lastari su svetlo zelene boje, imaju skraćen izgled usled usporenog porasta i „cik-cak“ porast internodija. U ovom ogledu je uočeno da proučavani izolati ispoljavaju različiti stepen agresivnosti prema testiranim sortama.



Slika 43. Lastari inokuliranih reznica vinove loze sorte Afuz ali u prvom vegetacionom ciklusu, 10 nedelja nakon inokulacije. a) izolat EL17, skraćeni lastar, sa deformisanim listovima nejednake veličine, b) izolat EL150, značajno skraćeni lastar sa listovima na kojima se uočavaju hlorotična polja i osušenim listovima.

Intenzitet simptoma na 27 ispitivanih sorti vinove loze sa svim korišćenim izolatima *E. lata* prikazani su u tabeli 29. Dobijeni podaci obrađivani su u statističkom programu ANOVA, primenom Dankanovog testa stepena značajnosti (p) 0,05.

Tabela 29. Parametri korišćeni pri oceni osetljivosti inokulisanih neukorenjenih reznica 27 sorti vinove loze na ispitivane izolate *E. lata*, 10 nedelja nakon inokulacije u prvom vegetacionom ciklusu, primenom Dankanovog testa značajnosti $p= 0,05$

Izolati	EL17	EL27	EL29	EL30	EL150	EL151	EL152	EL153
Sorta	Intenzitet simptoma (%)							
Rajnski rizling	65,63 fghij	56,25 fghi	98,88a	98,88a	50,00ab	37,5abc	58,33a	37,5ab
Opuzenska rana	74,31 defgh	61,46 efgh	76,04bcde	77,09cde	45,83abc	37,5abc	29,17abc	41,67ab
Sovinjon beli	87,00 abcd	84,38 ab	77,78bcd	78,47cde	20,83abc	20,83abc	37,5abc	41,67ab
Rad. muskat	89,58 abc	67,71 cdef	98,96a	94,80ab	53,83a	33,33abc	54,17a	58,33a
Beog. besemena	62,50hijk	71,88bcde	71,88cde	67,71defg	41,67abc	37,5abc	25,00abc	29,17abc
Negotinski rubin	61,81hijk	68,75 cdef	72,52 cde	76,74cde	25,00abc	45,83ab	25,00abc	37,5ab
Šardone	61,4 hijk	61,46 efghi	49,65gh	57,81fghi	20,83abc	33,33abc	29,17abc	29,17abc
Ban. muskat	78,48bcdefg	57,30efghi	55,56fg	63,89efgh	33,33abc	33,33abc	20,83abc	25,00abc
Game crni	77,08 cdefg	54,17 fghi	75,69 bcde	75,35cde	16,67abc	37,5abc	16,67abc	25,00abc
Demir kapija	59,03 ijkl	55,21 fghi	50,70 gh	52,78ghi	20,83abc	33,00abc	16,67abc	25,00abc
Kab. sovinjon	78,82 bcdef	71,18 bcde	75,69 bcde	70,84cdef	25,00abc	41,67abc	37,5abc	29,17abc
Italijanski rizling	76,74 cdefg	64,15 defg	85,39 bc	75,35cde	25,00abc	41,67abc	25,00abc	41,67ab
Gudurički klon	91,32 ab	71,88 bcde	87,50 ab	87,15abc	20,83abc	45,83ab	33,33abc	25,00abc
Hamburg	80,21 bcde	71,88 bcde	71,88 cde	58,34 fghi	25,00abc	25,00abc	29,17abc	25,00abc
Rizling rani	51,39 kl	60,77 efghi	63,13 efg	69,34def	29,17abc	25,00abc	29,17abc	45,83ab
Burgundac beli	70,84efghi	82,29bc	79,86 bcd	71,18cdef	45,83abc	33,33abc	12,5bc	53,83a
Afuz Ali	96,18a	98,96a	98,61 a	87,15abc	53,83a	25,00abc	50,00abc	58,33a
Smederevka	70,49efghi	77,43 bcd	87,15 ab	70,49def	33,33abc	45,50ab	41,33abc	20,83abcd
Frankovka	59,03ijkl	46,88i	57,21 fg	66,32efg	33,33abc	29,17abc	20,83abc	25,00abc
Kardinal	70,49efghi	62,50efgh	68,40def	63,19efgh	20,83abc	29,17abc	20,83abc	20,83abcd
Burgundac crni	51,71jkl	56,25fghi	74,65 bcde	48,61hi	29,17abc	33,33abc	25,00abc	50,00a
Neoplanta	81,25bcde	79,17bc	65,97 def	82,2 bcd	33,33abc	33,00abc	25,00abc	25,00abc
Prokupac	45,84l	48,96hi	40,63 h	44,80i	12,5bc	16,67bc	12,50bc	16,67abcde
Smed. muskat	59,03ijkl	81,95bc	63,19 efg	72,48cdef	12,5bc	20,83abc	16,67abc	29,17abcd
Erli muskat	64,59ghijk	50,00ghi	52,43 gh	56,17fghi	29,17abc	33,33abc	33,33abc	29,17abcd
Tamnjanika	26,04 m	29,17 j	17,36 i	23,96 j	8,33c	8,33bc	8,33c	12,5b
Drenak	29,86 m	25,35 j	27,78 i	27,78 j	6,25c	4,17c	8,33c	12,5b
Kontrola	0,00 n	0,00 k	0,00 j	0,00 k	0,00c	0,00c	0,00c	0,00b

*Podaci u kolonama obeleženi istim slovima nisu statistički značajno različiti na osnovu Dankanovog testa $p= 0,05$.

Tabela 29. Parametri korišćeni pri oceni osetljivosti inokulisanih neukorenjenih reznica 27 sorti vinove loze na ispitivane izolate *E. lata*, 10 nedelja nakon inokulacije u prvom vegetacionom ciklusu, primenom Dankanovog testa značajnosti $p=0,05$ (nastavak)

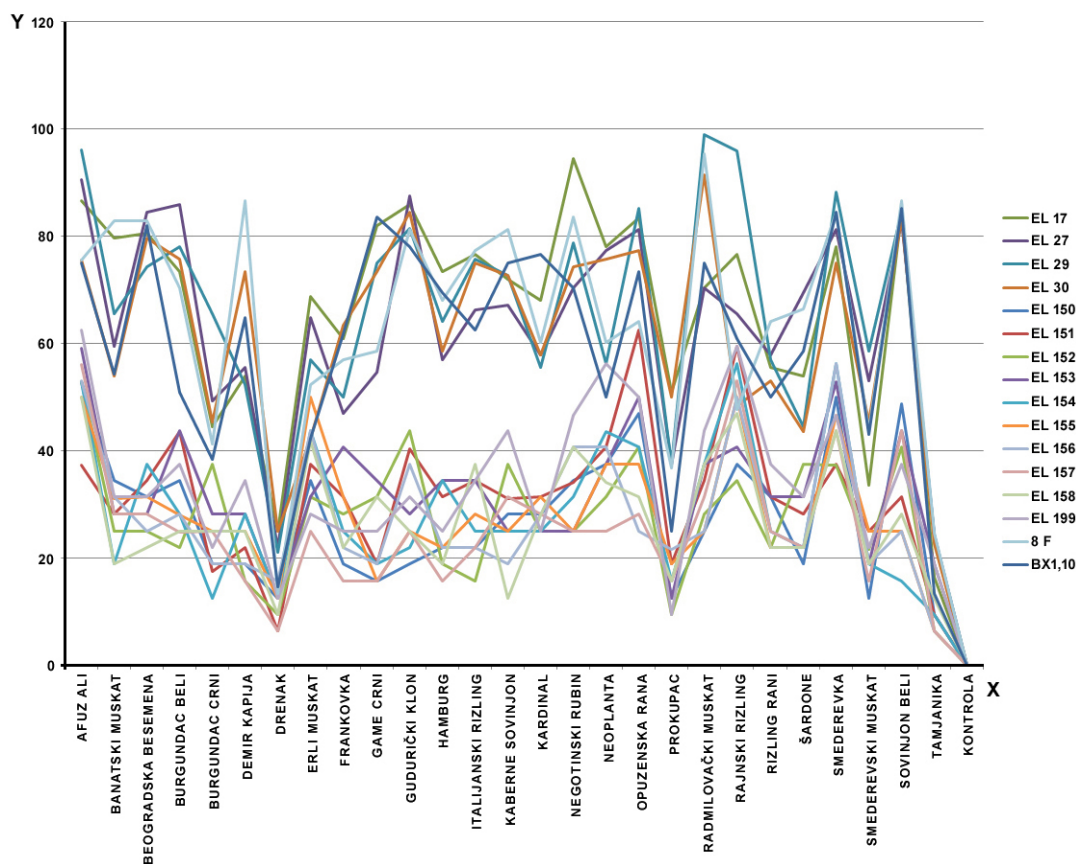
Izolati	EL154	EL155	EL156	EL157	EL158	EL199	8F	BX1.10
Sorta	Intenzitet simptoma (%)							
Rajnski rizling	45,83ab	54,17a	50,00a	50,00abc	58,33a	45,85ab	59,03fgh	56,25ghij
Opuzenska rana	37,5ab	20,83abc	29,17abcd	33,33abc	20,83abc	45,83ab	58,68fgh	70,49cdef
Sovinjon beli	16,67ab	20,83abc	20,83bcd	20,83abc	33,33abc	33,33ab	87,85ab	81,94bc
Rad. muskat	41,67ab	25,00abc	58,33a	45,83abc	29,17abc	62,50a	95,83 a	98,94a
Beog. besemena	33,33ab	33,33abc	37,5abcd	37,5abc	29,17abc	45,83ab	66,32defg	79,86bcd
Negotinski rubin	25,00ab	50,00ab	25,00abcd	25,00abc	37,50abc	45,83ab	75,35bcde	76,39 bcd
Šardone	16,67ab	16,67abc	29,17abcd	25,00abc	20,83abc	33,33ab	62,7 efg	45,83ijkl
Ban. muskat	33,33ab	41,67abc	20,83bcd	25,00abc	16,67abc	45,83ab	71,53cdef	55,21ghijk
Game crni	25,00ab	29,17abc	12,5cd	16,67abc	29,17abc	29,17ab	65,28defg	77,08bcd
Demir kapija	25,00ab	37,50abc	25,00abcd	29,17abc	25,00abc	41,67ab	75,69bcde	71,88cde
Kab. sovinjon	25,00ab	20,83abc	29,17abcd	29,17abc	16,67abc	29,17ab	85,76abc	81,25bc
Italijanski rizling	33,33ab	41,67abc	37,5abcd	25,00abc	25,00abc	29,17ab	66,93defg	71,88cde
Gudurički klon	33,33ab	33,33abc	25,00abcd	25,00abc	16,67abc	33,33ab	95,83a	87,50ab
Hamburg	37,5ab	16,67abc	20,83bcd	25,00abc	25,00abc	29,17ab	79,86bcd	75,00bcde
Rizling rani	16,67ab	20,83abc	16,67bcd	25,00abc	25,00abc	37,50ab	70,14def	52,78hijk
Burgundac beli	25,00ab	33,33abc	20,83bcd	16,67abc	50,00ab	45,83ab	72,57cdef	44,79jkl
Afuz Ali	25,00ab	50,00ab	58,33a	62,17a	58,33a	62,50a	79,17bcd	79,86bcd
Smederevka	53,83a	41,67abc	41,67abc	53,83ab	33,00abc	54,17a	75,00bcde	87,15ab
Frankovka	53,88a	28,83abc	20,83bcd	33,33abc	33,33abc	25,00ab	60,42efg	66,67defg
Kardinal	50,00a	20,83abc	25,00abcd	20,83abc	25,00abc	33,33ab	73,9bcdef	75,35bcd
Burgundac crni	33,00ab	25,00abc	20,83bcd	25,00abc	16,67abc	33,33ab	53,13 ghi	50,00 hijk
Neoplanta	29,17ab	33,33abc	33,33abcd	33,33abc	25,00abc	50,00ab	71,58 cdef	58,33 fghi
Prokupac	25,00ab	28,83abc	12,50cd	8,33bc	8,33bc	16,67ab	45,48hi	42,79kl
Smed. muskat	33,33ab	25,00abc	16,67bcd	25,00abc	16,67abc	25,00ab	67,7defg	61,8efgh
Erli muskat	12,5ab	33,33abc	41,67abc	25,00abc	26,50abc	41,67ab	39,93ij	33,34l
Tamjanika	4,17b	8,33bc	4,17d	8,33bc	12,50bc	16,67ab	29,86jk	20,49m
Drenak	4,17b	12,50abc	4,17d	4,17c	12,50bc	4,17b	23,96k	18,75m
Kontrola	0,00b	0,00c	0,00d	0,00c	0,00c	0,00b	0,00l	0,00n

*Podaci u kolonama obeleženi istim slovima nisu statistički značajno različiti na osnovu Dankanovog testa $p=0,05$.

Dobijeni rezultati obrađeni su analizom varijanse, kao dvofaktorijalni ogled, gde su prvi faktor sorte, a drugi izabrani izolati. Primenom dvofaktorijalne analize varijanse (ANOVA) za značajnost utvrđenih razlika između sorti, dobijena je p vrednost od 0,000, koja je manja od 0,05, što znači da su te razlike statistički značajne (Tabela 30, Grafik 1).

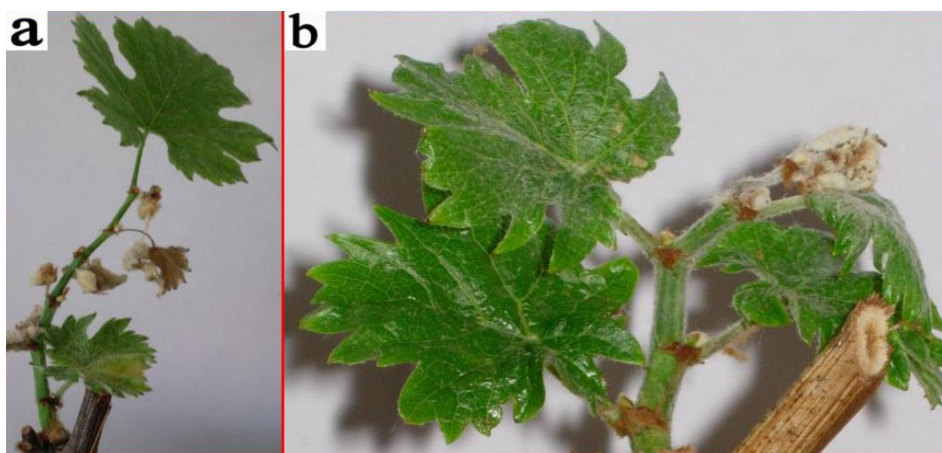
Tabela 30. Rezultati dvofaktorijalne analize varijanse ocene intenziteta simptoma na 27 sorti vinove loze 10 nedelja nakon inokulacije proučavanih izolata *E. lata* u prvom vegetacionom ciklusu, primenom Dankanovog testa značajnosti $p=0,05$

Izvor varijacije	Suma kvadrata	Stepeni slobode	Varijansa	F količnik	P vrednosti
Korigovani model	742670,252b	447	1661,455	2,843	0,000
Intercept	2302106,484	1	2302106,484	3938,937	0,000
Sorte	293299,298	27	10862,937	18,587	0,000
Izolati	325747,231	15	21716,482	37,157	0,000
Sorte + Izolati	130817,213	405	323,005	0,553	1,000
Greška	533601,643	913	584,449		
Ukupno	3533901,993	1361			
Korigovana greška	1276271,895	1360			



Grafik 1. Intenzitet simptoma 27 sorti vinove loze prema proučavanim izolatima *E. lata* u prvom vegetacionom ciklusu, 10 nedelja nakon inokulacije. X osa: – sorte, Y osa: – intenzitet simptoma na listovima po skali **Peros and Berger (1994)**.

Kod značajnosti razlika prosečnih ocena za izolate, p vrednost je 0,000 i manja je od 0,05. Ovakva p vrednost ukazuje na značajnost razlike između prosečnih ocena proučavanih izolata. Ono što je bitno uočiti je da je p vrednost za interakciju sorte i izolata manja od 0,05 (Tabela 29, 30), što znači da se izolati ne ponašaju isto po pojedinim sortama, a isto tako se sorte ne ponašaju na isti način po pojedinim izolatima. Parnim poređenjem intenziteta simptoma ispitivanih sorti na testirane izolate nakon 10 nedelja od inokulacije u prvom vegetacionom ciklusu (Slika, 42, 43, 44), kao zasebni kriterijum za ocenu osetljivosti ispitivanih sorti vinove loze, ne može potpuno da podrži sva uočena grupisanja ispitivanih sorti vinove loze.



Slika 44. a i b) Skraćeni lastari usled usporenog porasta inokulisanih reznica vinove loze u prvom vegetacionom ciklusu, 10 nedelja od inokulacije: a – sorta Burgundac crni, izolat EL30, listovi su sitni, deformisani, hlorotični, najveći broj liski je osušen, b – sorta Šardone, izolat EL199, lastar sa hlorotičnim, deformisanim listovima iskrzanih ivica i osušenim listovima na vrhu.

Naime, nakon parnog poređenja prosečnih vrednosti intenziteta simptoma na 27 sorti vinove loze po pojedinim izolatima, ustanovljeno je da izolati EL 29 i 8F grupišu ispitivane sorte u čak 13 homogenih grupa, potom EL17 grupiše sorte u 12 homogenih grupa, a izolati EL27 i BX1.10 svrstavaju sve ispitivane sorte u 11 homogenih grupa. Izolat EL30, formira 8 a izolat EL150, 5 homogenih grupa ispitivanih sorti. Izolat EL199 formira 4, a EL153, EL154, EL155, EL156 i EL157 formiraju po 3 homogene grupe. Potom izolati EL151, EL152, EL158 formiraju po 2 homogene grupe ispitivanih sorti. Kod svih izolata poređenjem p vrednosti između grupa ispitivanih sorti uočava se da postoji značajna statistička razlika, a to znači da dobijeni rezultati ukazuju na veliku

varijabilnost u osetljivosti ispitivanih sorti vinove loze prema testiranim izolatima *E. lata*.

U toku ovih istraživanja utvrđeno je da su domaće sorte vinove loze Tamnjanika, Drenak, Prokupac, ispoljile veoma veliku statističku razliku u intenzitetu simptoma prema ispitvanim izolatima, što znači da su pokazale otpornijim od drugih testiranih sorti. Potom su Banatski muskat, Smederevski muskat, Burgundac crni (Slika 44a), Šardone (Slika 44b), Game crni, Kaberne sovinjon, Kardinal pokazale značajnu statističku razliku u odnosu na ostale testirane sorte sem predhodno pomenutih. Dok su sorte Afuz ali (Slika 43), Radmilovački muskat (Slika 42), Opuzenska rana, Beogradska besemena, Italijanski rizling, Negotinski rubin, Sovinjon beli, Gudurički klon, Demir kapija ispoljile veoma veliku osetljivost na ispitivane izolate (Tabela 29, 30,31,32).

Tabela 31. Parametri korišćeni pri oceni osetljivosti inokulisanih neukorenjenih reznica 27 sorti vinove loze na ispitivane izolate *E. lata*, 10 nedelja od kretanja vegetacije u drugom vegetacionom ciklusu, primenom Dankanovog testa značajnosti $p= 0,05$

Izolati	EL17	EL27	EL29	EL30	EL150	EL151	EL152	EL153
Sorta	Intenzitet simptoma (%)							
Rajnski rizling	76,57bcde	86,72 ab	96,03ab	48,43ghi	37,5abcde	59,38ab	34,38ab	40,63abc
Opuzenska rana	83,35abc	75,79 bcdef	85,16bcd	77,35bc	48,75abcd	62,5a	40,63ab	50,00ab
Sovinjon beli	84,38abc	78,91 bcdef	84,38ncde	83,60bc	25,00abcde	34,38abcde	28,12ab	43,75abc
Rad. muskat	93,75a	85,94 abc	98,44a	95,32a	48,75abcd	62,5a	40,63ab	37,5abc
Beog. besemena	80,47bcd	84,38 abcd	74,22 def	79,69bc	31,25abcde	34,38abcde	25,00ab	28,13abc
Negotinski rubin	94,53a	70,32cdefgh	78,84 de	74,22cd	34,38abcde	34,13abcde	25,00ab	25,00abc
Šardone	48,44ij	69,53defgh	44,53 jk	43,75i	18,75cde	28,13abcde	37,5ab	31,25abc
Ban. muskat	79,69bcd	59,38ghijk	65,63 fg	53,91fghi	34,38abcde	28,13abcde	25,00ab	28,13abc
Game crni	82,03abc	44,53 k	75,00 def	73,44cd	18,75cde	18,75cde	31,25ab	34,38abc
Demir kapija	53,91hij	55,47 hijk	52,35 hij	73,44cd	18,75cde	21,88bcde	15,63ab	28,13abc
Kab. sovinjon	71,88cdef	67,19 efgh	72,66 ef	70,32cde	28,13abcde	31,00abcde	37,5ab	25,00abc
Italijanski rizling	76,57 bcde	66,35 efghi	75,78 def	75,00cd	18,75cde	34,38abcde	15,63ab	34,38abc
Gudurički klon	85,94ab	74,22bcdefg	81,44 de	78,13bc	18,75cde	53,13abc	40,63ab	43,75abc
Hamburg	73,44bcdef	57,04 hijk	64,06 fgh	58,54efg	21,88bcde	31,25abcde	18,80ab	34,38abc
Rizling rani	55,47 ghij	57,82 hijk	57,03 ghi	53,13fghi	31,25abcde	31,25abcde	21,88ab	31,25abc
Burgundac beli	73,44bcdef	80,47 abcde	78,13 de	75,78 cd	34,38abcde	43,50abcd	21,88ab	43,75abc
Afuz Ali	86,72ab	90,63 a	96,88 a	89,32 ab	52,63a	59,38ab	52,88a	59,13a
Smederevka	78,13bcde	78,91abcdef	93,75abc	75,00 cd	50,00ab	46,63abc	37,25ab	52,88ab
Frankovka	60,94 fghi	46,88 k	50,00 ij	63,28 def	18,75cde	31,25abcde	28,13ab	40,63abc
Kardinal	67,91 defg	57,82 hijk	55,47ghij	57,82 fgh	28,13abcde	31,25abcde	21,88ab	25,00abc
Burgundac crni	44,53j	49,22 jk	65,63 fg	45,32 hi	18,75cde	18,75cde	31,25ab	28,13abc
Neoplanta	78,13 bcde	71,10bcdefgh	56,25ghij	75,78cd	37,5abcde	40,63abcde	31,25ab	37,5abc
Prokupac	50,79 ij	50,78 ijk	37,50 kl	48,38ghi	6,25 e	18,75cde	9,38b	12,5c
Smed. muskat	49,22 ij	63,28 fghij	45,32 ijk	58,60efg	25,00abcde	25,00abcde	21,88ab	18,75bc
Erli muskat	65,63 efgh	64,85 efghij	57,04 ghi	42,19i	34,38abcde	37,50abcde	21,88ab	31,25abc
Tamnjanika	18,75k	19,53 l	24,16 m	22,66j	6,25e	9,38de	6,25b	12,5c
Drenak	25,00k	23,44 l	28,07 lm	19,21j	6,25e	6,25e	9,38b	9,38c
Kontrola	0,00l	0,00j	0,00n	0,00k	0,00e	0,00e	0,00b	0,00c

*Podaci u kolonama obeleženi istim slovima nisu statistički značajno različiti na osnovu Dankanovog testa $p= 0,05$.

Tabela 31. Parametri korišćeni pri oceni osetljivosti inokulisanih neukorenjenih reznica 27 sorti vinove loze na ispitivane izolate *E. lata*, 10 nedelja od kretanja vegetacije u drugom vegetacionom ciklusu, primenom Dankanovog testa značajnosti $p=0,05$ (nastavak)

Izolati	EL154	EL155	EL156	EL157	EL158	EL199	8F	BX1.10
Sorta	Intenzitet simptoma (%)							
Rajnski rizling	56,25a	50,00a	50,00ab	51,88ab	46,88ab	59,38a	47,66kl	67,97efg
Opuzenska rana	40,63abc	40,63ab	31,25abcd	28,13abcde	31,25abc	50,00abc	64,07ghi	73,44cdef
Sovinjon beli	15,63bc	25,00abc	25,00abcd	43,75abc	28,13abc	37,50abcde	86,72abc	85,16abc
Rad. muskat	37,5abc	50,00a	56,25a	56,00a	46,88ab	56,25ab	95,32a	93,75a
Beog. besemena	37,5abc	31,25abc	25,00abcd	34,38abcde	31,25abc	31,25abcde	82,82bcd	82,03abcd
Negotinski rubin	31,25abc	25,00abc	40,63abc	25,00abcde	34,38abc	46,88abcd	83,60bcd	70,31defg
Šardone	21,88abc	21,88abc	21,88bcd	21,88abcde	21,88abc	31,25abcde	66,41fghi	58,60ghij
Ban. muskat	18,75abc	31,00abc	31,25abcd	28,13abcde	18,75abc	31,25abcde	82,81bcd	54,17hij
Game crni	18,75abc	15,63abc	18,75cd	15,63cde	31,25abc	25,00abcde	58,60hij	78,13 bcde
Demir kapija	28,13abc	25,00abc	18,75cd	15,63cde	28,13abc	34,38abcde	86,72abc	64,79efgh
Kab. sovinjon	25,00abc	25,00abc	18,75cd	31,25abcde	12,50bc	43,75abcde	81,25bcd	74,94cdef
Italijanski rizling	25,00abc	28,13abc	21,88cd	21,88abcde	37,5abc	37,50abde	77,34cde	62,4 fghi
Gudurički klon	28,13abc	21,88abc	25,00abcd	37,50abcd	25,00abc	31,25abcde	89,85ab	90,63ab
Hamburg	34,38abc	31,00abc	21,88bcd	15,63cde	21,88abc	28,13abcde	67,97efgh	71,10defg
Rizling rani	25,00abc	21,88abc	25,00abcd	18,75bcde	21,88abc	21,88bcde	64,07 ghi	50,00 ij
Burgundac beli	52,88ab	27,88abc	28,13abcd	43,75abc	25,00abc	25,00abcde	70,32 efg	50,78 ij
Afuz Ali	56,25a	50,00a	53,13ab	56,00a	50,00a	50,00abc	75,52 def	86,66 abc
Smederevka	28,13abc	46,63ab	56,25a	31,25abcde	43,75abc	43,75abcde	84,38 bcd	84,38 abc
Frankovka	25,00abc	31,25abc	21,88bcd	15,63cde	18,75abc	25,00abcde	56,97 ijk	61,72 fghi
Kardinal	25,00abc	31,25abc	27,88abcd	28,13abcde	31,25abc	25,00abcde	60,16ghij	76,57 cde
Burgundac crni	43,5abc	25,00abc	18,75cd	25,00abcde	25,00abc	21,88bcde	50,00 jk	52,35 hij
Neoplanta	15,63bc	37,5abc	40,63abc	25,00abcde	34,13abc	56,25ab	60,16ghij	50,00 ij
Prokupac	18,75abc	18,75abc	21,88bcd	15,63cde	15,63abc	9,38e	39,06 lm	32,04 k
Smed. muskat	18,75abc	25,00abc	18,75cd	18,75bcde	18,75abc	21,88bcde	58,60 hij	53,13 hij
Erli muskat	43,75abc	50,00a	43,75abc	21,88abcde	43,75abc	28,13abcde	52,35 jk	46,88 j
Tamnjanika	9,38c	6,25c	6,25d	3,13de	15,63abc	9,38e	24,48 n	26,30 k
Drenak	12,5c	12,5bc	6,25d	0,00e	9,38c	9,38e	30,21 mn	25,00 k
Kontrola	0,00c	0,00c	0,00d	0,00e	0,00c	0,00e	0,00 o	0,00 l

*Podaci u kolonama obeleženi istim slovima nisu statistički značajno različiti na osnovu Dankanovog testa $p=0,05$.

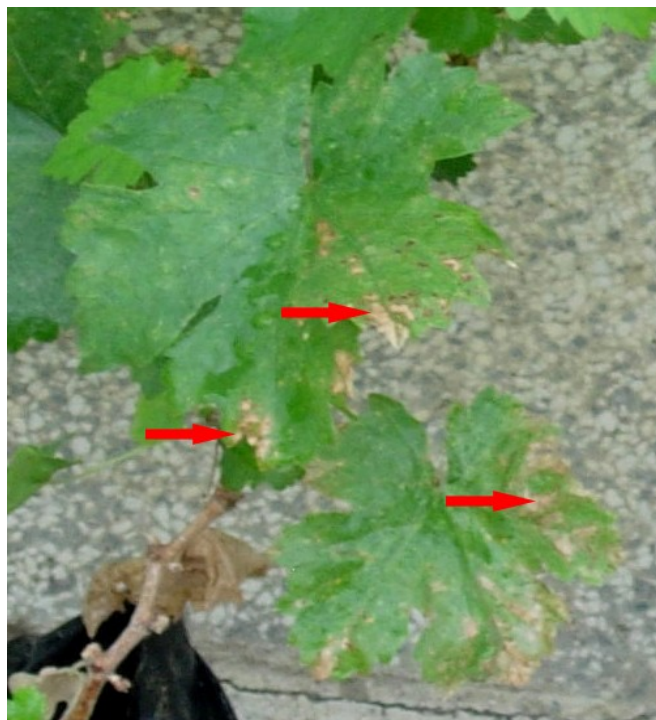
Tabela 32. Rezultati dvofaktorijalne analize varijanse ocene intenziteta simptoma na 27 sorti vinove loze 10 nedelja nakon kretanja vegetacije proučavanih izolata *E. lata* u drugom vegetacionom ciklusu, primenom Dankanovog testa značajnosti $p=0,05$

Izvor varijacije	Suma kvadrata	Stepeni slobode	Varijanse	F količnik	P vrednosti
Korigovani model	999269,778b	447	2235,503	5,038	0,000
Intercept	2990140,265	1	2990140,265	6738,486	0,000
Sorte	353712,325	27	13100,456	29,523	0,000
Izolati	481107,927	15	32073,862	72,281	0,000
Sorte + Izolati	162861,206	405	402,126	0,906	0,885
Greška	596387,433	1344	443,741		
Ukupno	4584581,619	1792			
Korigovana greška	1595657,211	1791			



Slika 45. Deformacija i hloroza listova, 10 nedelja nakon početka drugog vegetacionog ciklusa, sorta Sovinjon beli, izolat EL29.

Na inokulisanim reznicama svih proučavanih sorti vinove loze, ispoljili su statistčki značajno manji intenzitet simptoma izolati EL152 i EL157, značajno veću statističku razliku u intenzitetu simptoma na ispitivanim sortama pokazali su izolati EL150, EL151, EL153, EL154, EL155, EL156, EL158 i EL199. Izolati EL17, EL27, EL29, EL30, 8F i BX1.10 su se pokazali kao najagresivniji na svim testiranim sortama vinove loze, što se jasno vidi na graficima 1 i 2.

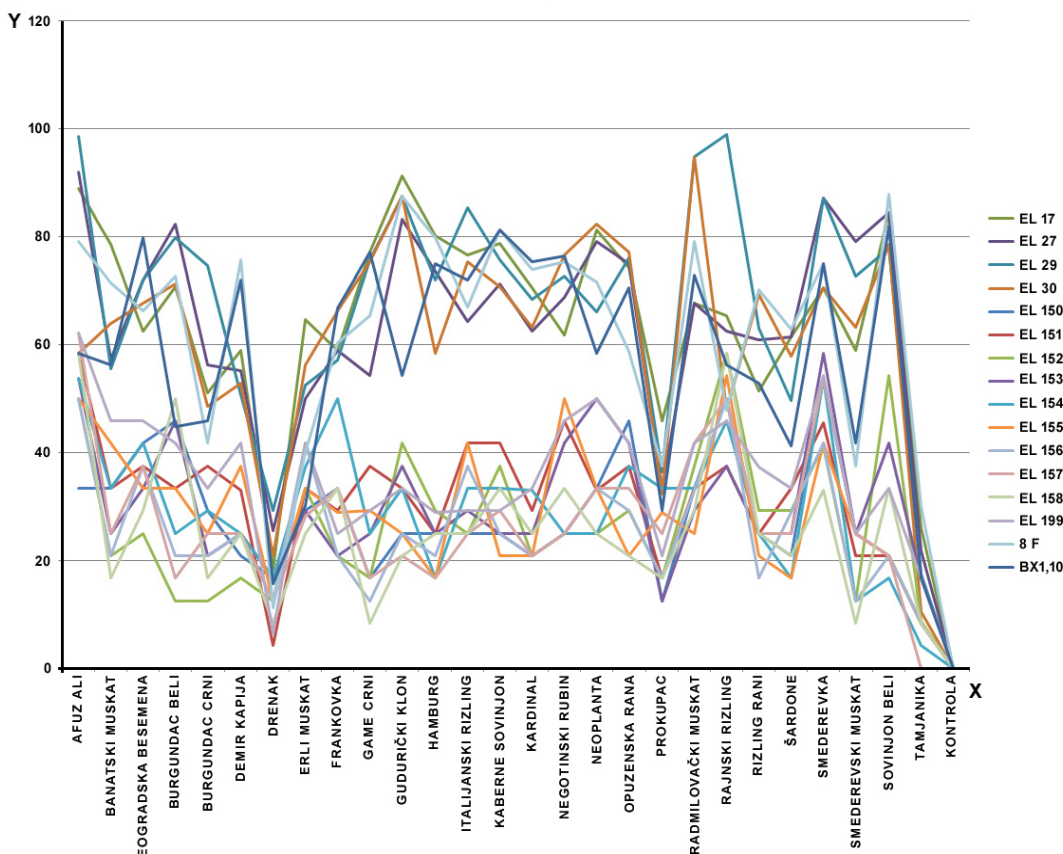


Slika 46. Nekroza ivice listova, 10 nedelja nakon početka drugog vegetacionog ciklusa, sorta Kardinal, izolat EL153.

Parnim poređenjem prosečnih vrednosti intenziteta simptoma na ispitivanim sortama vinove loze po pojedinim izolatima u drugom vegetacionom ciklusu (Slika 45, 46), takođe dolazi do grupsanja sorti u veći broj homogenih grupa po pojedinim izolatima, zato kao zaseban kriterijum za ocenu osetljivosti ispitivanih sorti vinove loze, ne može potpuno da podrži sva uočena grupisanja ispitivanih sorti vinove loze (Tabela 31, 32). Tako izolati EL17, EL27 i EL29 grupišu ispitivane sorte u 11 homogenih grupa. Izolat EL30 formira 12 homogenih grupa, a 8F grupiše ispitivane sorte u 8 i BX1.10 u 10 homogenih grupa. Potom izolati EL153, EL154, EL155, EL157, EL158 i EL199 formiraju 2, a izolati EL150, EL151 i EL156 po 1 homogenu grupu ispitivanih sorti. Analizirajući p vrednosti po grupama za svaki izolat odvojeno, sem za izolate koji formiraju 1 i 2 homogene grupe, uočava se značajna statistička razlika između grupa, što znači da ispitivane sorte ispoljavaju različiti nivo osetljivoati prema ispitivanim izolatima. Kod izolata koji formiraju samo 1 homogenu grupu ispitivanih sorti, analizom p vrednosti uočava se da nema značajnih statističkih razlika u okviru grupe. Odnosno, pokazali su se najmanje virulentnim. Isto tako kod izolata koji formiraju 2 homogene grupe jedino se izdvajaju sorte u prvoj grupi Tamnjanika, Drenak i Prokupac, koje pokazuju značajno manju statističku razliku u intenzitetu simptoma na testirane

izolate u odnosu na druge sorte u grupi, što znači da su otpornije. Dok u drugoj homogenoj grupi Afuz ali i Radmilovački muskat, ispoljavaju statistički značajno veći intenzitet simptoma na ispitivane izolate, a to znači da su osjetljivije. Kod ostalih sorti se ne ispoljava značajna statistička razlika u intenzitetu simptoma prema testiranim izolatima u okviru grupe i između grupa.

Upoređivanjem dobijenih vrednosti iz Tabela 29, 30, 31 i 32 (Grafik 1 i 2), nakon analize p vrednosti, vidi se da su sorte Tamjanika i Drenak pokazale najmanji stepen osjetljivosti prema svim korišćenim izolatima. Najvirulentniji izolati EL17, EL27, EL29, EL30, 8F i BX1.10 formirali su zasebnu homogenu grupu koja odvajava ove sorte od ostalih, a to znači da su ovi izolati bili najmanje virulentni prema sortama Tamjanika i Drenak u odnosu na intenzitet simptoma koji izazivaju na drugim testiranim sortama. Praćenje koje je sprovedeno deset nedelja nakon inokulacije u prvom vegetacionom ciklusu i deset nedelja posle kretanja porasta lastara u drugom vegetacionom ciklusu pokazuje da nije došlo do značajne promene intenziteta pojave simptoma na listovima i lastarima na reznicama sorti Tamjanika i Drenak. Sorta Prokupac pokazala se osjetljivijom u odnosu na sorte Tamjanika i Drenak. Isto tako najagresivniji izolati izdvajaju sortu Prokupac u zasebnu homogenu grupu, što znači da je i ova sorta otpornija u odnosu na ostale ispitivane sorte sem Tamjanike i Drenka (Grafik 1 i 2).



Grafik 2. Intenzitet simptoma 27 sorti vinove loze prema korišćenim izolatima *E. lata* u drugom vegetacionom ciklusu, 10 nedelja od početka kretanja vegetacije. X osa: – sorte, Y osa: – intenzitet simptoma na listovima po skali **Peros and Berger (1994)**.

Parnim poređenjem vrednosti iz drugog vegetacionog ciklusa potvrđuju se rezultati iz prvog vegetacionog ciklusa da su se ostale testirane sorte vinove loze u ovom ogledu pokazale osetljivijim na ispitivane izolate *E. lata*, što se uočava parnim poređenjem intenziteta simptoma sorti prema ispitivanim izolatima.

Inokulacija ukorenjenih reznica vinove loze

U ovim istraživanjima korišćene su ukorenjene reznice 6 sorti vinove loze i to : Italijanski rizling, Kaberne sovinjon, Kardinal, Rkaciteli, Burgundac crni i Prokupac. Ocena inteziteta simptoma vršena je na osnovu skale od 0-4 (Slika 47). Intenzitet simptoma ispitivanih sorti vinove loze (Slika 48, 49, 50) nakon inokulacije sa odabranim izolatima *E. lata* prikazani su u tabeli 33.

Tabela 33. Parametri korišćeni pri oceni osetljivosti inokulisanih ukorenjenih reznica 6 sorti vinove loze na ispitivane izolate *E. lata* 8 i 27 meseci nakon inokulacije, primenom Dankanovog testa značajnosti $p=0,05$

Izolat/ Sorta	Razlika u dužini lastara inokulisanih i kontrolnih biljaka (cm)											
	8 meseci						27 meseci					
	Italijanski rizling	Kaberne sovinjon	Kardinal	Rkaciteli	Prokupac	Burgundac crni	Italijanski rizling	Kaberne sovinjon	Kardinal	Rkaciteli	Prokupac	Burgundac crni
EL 17	14,30a	8,80a	21,30ab	21,30b	10,00bcd	10,00abc	23,80a	16,30ab	21,30ab	36,30a	27,60a	13,90b
EL 27	14,70a	8,90a	15,00abc	26,30ab	15,00b	13,80ab	21,30a	22,50a	26,30a	35,00a	27,60a	17,60ab
EL 29	14,00a	6,40ab	16,50ab	31,30a	21,30a	16,30a	22,50a	17,60a	22,50ab	38,80a	26,30a	25,00a
EL 30	12,40ab	3,90ab	15,00abc	26,30ab	8,90cde	12,40ab	23,50a	12,60ab	26,30a	31,30a	16,30b	25,00a
EL 150	2,60bcd	1,30b	7,50cde	6,30d	5,00def	2,60de	3,80b	2,60cd	5,00c	13,90bc	8,90cd	3,90c
EL 151	2,8bcd	2,60ab	9,00bcd	13,80c	13,90bc	8,90bcd	10,00b	6,30bcd	15,00b	19,00b	13,80bc	5,20c
EL 152	1,50cd	1,50b	1,30de	2,50d	13,90bc	4,00cde	2,60b	2,50cd	5,00c	5,00de	5,00de	1,30c
EL 153	0,00d	2,60ab	0,00e	1,30d	0,00g	2,70de	3,70b	6,30bcd	1,30c	2,60de	3,00de	4,00c
EL 154	2,70bcd	0,60ab	0,00e	6,30d	0,00g	2,70de	3,70b	6,30bcd	1,30c	5,00de	4,00de	1,30c
EL 155	2,70bcd	0,00b	3,00de	3,90d	5,00def	3,90cde	11,70b	2,60cd	0,30c	5,00de	5,00de	13,90b
EL 156	0,00d	0,00b	2,60de	5,00d	0,00g	3,20cde	6,50b	6,30bcd	0,40c	3,90de	2,60de	4,00c
EL 157	0,00d	0,60ab	0,00e	0,00e	0,00g	0,00e	13,60b	2,60cd	1,30c	6,00de	3,00de	2,00c
EL 158	0,00d	0,00b	1,30de	13,80c	0,00g	0,00e	4,30b	2,60cd	5,60c	6,30de	5,00de	2,00c
EL 199	11,60abc	2,60ab	1,30de	6,30d	0,00g	3,90cde	9,50b	2,60cd	0,40c	8,80de	4,00de	3,80c
8F	12,90ab	0,60ab	13,80abc	27,70ab	10,00bcd	15,00ab	21,30a	13,90ab	27,50a	32,50a	16,30b	25,00a
BX1.10	11,90abc	3,80ab	16,30ab	22,60b	8,80cde	16,30a	20,00a	5,90bcd	25,00a	31,50a	16,30b	23,80a
Kontrola	0,00d	0,00b	0,00e	0,00c	0,00g	0,00e	0,00b	0,00d	0,00e	0,00e	0,00e	0,00c

*Podaci u kolonama obeleženi istim slovima nisu statistički značajno različiti na osnovu Dankanovog testa $p=0,05$.



Slika 47. Simptomi na lastarima veštački inokulisanih reznica vinove loze sa označenom skalom od 0 do 4 za ocenjivanje intenziteta simptoma prema proučavanim izolatima *E. lata*

Dobijeni rezultati obrađeni su analizom varijanse, kao dvofaktorijalni ogled, gde su prvi faktor sorte, a drugi izabrani izolati. Primenom dvofaktorijalne analize varijanse (ANOVA) za značajnost utvrđenih razlika između sorti, dobijena je p vrednost od 0,000, koja je manja od 0,05, što znači da su te razlike statistički značajne (Tabela 34, Grafik 1).

Tabela 34. Rezultati dvofaktorijalne analize varijanse ocene intenziteta simptoma na 6 sorti vinove loze nakon inokulacije proučavanih izolata *E. lata*, primenom Dankanovog testa značajnosti $p = 0,05$

Sorte	p vrednosti		
	Razlika u dužini lastara inokulisanih i kontrolnih biljaka nakon 8 meseci	Razlika u dužini lastara inokulisanih i kontrolnih biljaka nakon 27 meseci	Nekroza oko mesta inokulacije
Ital. rizling	0,000	0,001	0,000
Kab. sovinjon	0,000	0,000	0,005
Kardinal	0,000	0,000	0,000
Rkaciteli	0,000	0,000	0,802
Prokupac	0,000	0,000	0,000

Kod značajnosti razlika prosečnih ocena za izolate, p vrednost je 0,000 i manja je od 0,05. Ovakva p vrednost ukazuje na značajnost razlike između prosečnih ocena pojedinih izolata. Ono što je bitno uočiti je da su p vrednosti za interakciju sorte i

izolata manja od 0,05, što znači da se izolati ne ponašaju isto po pojedinim sortama, a isto tako se sorte ne ponašaju na isti način po pojedinim izolatima (Tabela 34).

Jedino kod sorte Rkaciteli analizom varijanse prosečnih vrednosti dužine nekroze oko mesta inokulacije p vrednost je 0,802 i veća je od 0,05 što znači da ne postoji statistički značajna razlika između izolata (Tabela 34).

Parnim poređenjem rezultata intenziteta simptoma 6 sorti vinove loze nakon inokulacije proučavanim izolatima *E. lata*, uočeno je da se kod sorte Italijanski rizling nakon 8 meseci od inokulacije, korišćenjem p vrednosti (Tabela 35) jasno izdvajaju 2 homogene grupe.

Tabela 35. Prosečna ocena intenziteta simptoma 6 sorti vinove loze na inokulaciju izolatima *E. lata* nakon 8 meseci, primenom Dankanovog testa značajnosti $p=0,05$

Sorte	p vrednosti					
	Homogene grupe					
	1	2	3	4	5	6
Italijanski rizling	0,440	0,390				
Kaberne sovinjon	0,680	0,510	0,186			
Kardinal	0,550	0,080	0,076	0,101	0,051	
Rkaciteli	0,190	0,055	0,083	0,162	0,054	
Prokupac	1,000	0,102	0,630	0,102	0,616	1,000
Burgundac crni	0,167	0,057	0,057	0,057	0,157	

U prvu homogenu grupu smešteni su izolati EL153, EL156, EL157, EL158, EL152, EL150, EL154, EL155 i EL151, koji su se pokazali najmanje virulentnim, a u drugu homogenu grupu su smešteni najvirulentniji izolati EL199, EL30, BX1.10, 8F, EL29, EL17 i EL27. Na sorti Kaberne sovinjon se jasno izdvajaju 3 homogene grupe izolata, koje međusobno pokazuju značajne statističke razlike u virulentnosti na ovoj sorti. Pa tako u prvu homogenu grupu spadaju izolati EL155, EL156, EL158, EL154, EL157, EL150, EL152, koji pokazuju najmanje značajnu statističku razliku, s tim da se izolati EL151, EL153 i EL199 ne odvajaju jasno od treće homogene grupe. U treću homogenu grupu spadaju izolati 8F, BX1.10, EL30 i EL29, s tim da se poslednji izolat ne odvajaju jasno od izolata četvrte homogene grupe EL27 i EL17, koji su i najvirulentniji.

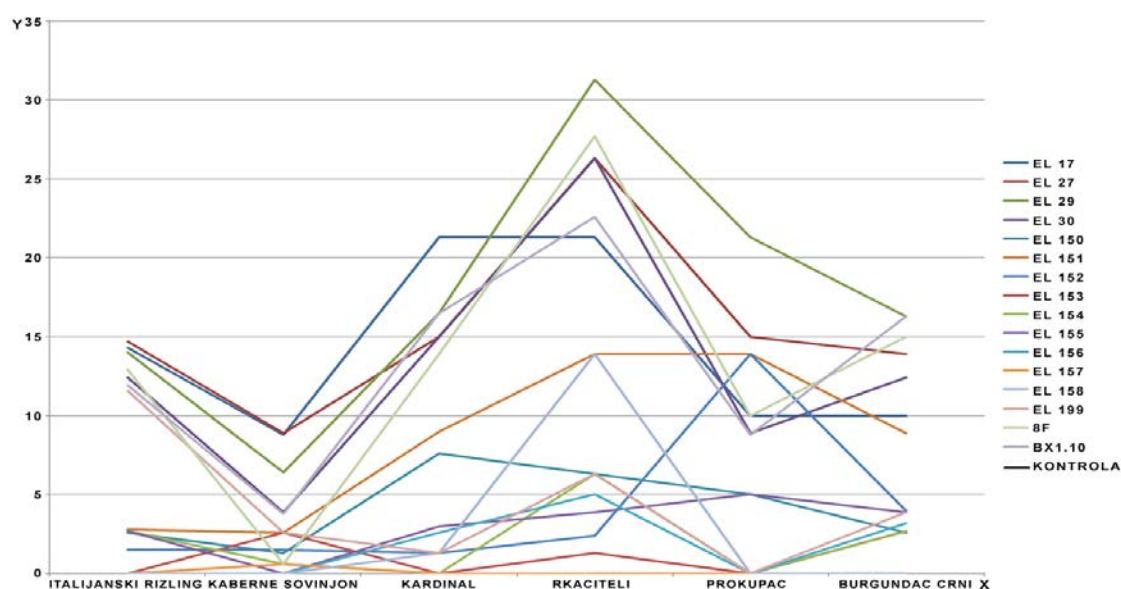


Slika 48. Deformacija listova i pojava rasutih nekrotičnih pega po površini lisne ploče, 8 meseci nakon inokulacije, sorta Rkaciteli, izolat EL 152.

Na sortama Kardinal i Rkaciteli (Slika 48) i Burgundac crni izdvajaju se po 5 homogenih grupa, koje među sobom ispoljavaju značajne statističke razlike u agresivnosti izolata.

Kod ovih sorti je ustanovljeno jasno grupiranje najagresivnijih izolata EL17, EL27, EL29, 8F i BX1.10 u zasebne homogene grupe. Parnim poređenjem rezultata reakcije sorte Prokupac jasno se izdvajaju 6 homogene grupe izolata koje pokazuju značajnu statističku razliku. Tako izolat EL29 se jasno izdvaja u šestu homogenu grupu, što znači da je ispoljio značajnu statističku razliku u intenzitetu simptoma, a to znači da se pokazao najvirulentnijim na sorti Prokupac od svih testiranih izolata. Izolat EL27 je smešten u petu homogenu grupu i jasno se odvaja od izolata EL152 i EL151. U četvrtu homogenu grupu pored EL151 i EL152, smešteni su i izolati EL17 i 8F, koji nisu jasno odvojeni od treće homogene grupe u koju su smešteni izolati EL30 i BX1.10, potom EL150 i EL155, koji su jasno odvojeni od ostalih iz grupe jer pokazuju značajno manju statističku razliku u intenzitetu simptoma na sorti Prokupac. U prvu homogenu grupu svrstani su izolati EL153, EL154, EL157, EL158 i EL199, koji su ispoljili najmanje značajnu statističku razliku u intenzitetu simptoma na sorti Prokupac, što znači da su bili njeamanje virulentni. Analizirajući sve homogene grupe izolata na 6 testiranih sorti, može se zaključiti da izolati EL17, EL27, EL29, EL30, 8F, BX1.10 ispoljavaju veoma značajne statističke razlike, odnosno da su to najvirulentniji izolati (Slika 48, Tabela 33, 34, 35, 36).

Na osnovu gore navedenih rezultata vidi se da se izolati *E. lata* razlikuju po svojoj sposobnosti da izazovu simptome na lastarima na inokulisanim biljkama vinove loze. Nakon 8 meseci od inokulacije kod sorte Italijanski rizling nisu izazvali pojavu simptoma izolati EL153, EL156, EL157 i EL158 a na sorti Kaberne sovinjon EL155, EL156 i EL158. Na sorti Kardinal nisu ispoljili simptome izolati EL153, EL154 i EL157, a na sorti Rkaciteli samo izolat EL157 nije prouzrokovao simptome na lastarima. Na sorti Prokupac najveći broj izolata (EL153, EL154, EL156, EL157, EL158 i EL199) nije prouzrokovao pojavu simptoma, dok na sorti Burgundac crni samo 2 izolata nisu izazvala pojavu simptoma na lastarima i to EL157 i EL158 (Tabela 33, 34, 35, 36, Grafik 3).



Grafik 3. Ocena osetljivosti testiranih sorti vinove loze na osnovu razlike u dužini lastara inokulisanih i kontrolnih biljaka nakon 8 meseci od inokulacije. X osa: – sorte, Y osa: – intenzitet simptoma.

Razlika u dužini lastara inokulisanih i kontrolnih biljaka nakon 8 meseci, kao zasebni kriterijum za ocenu osetljivosti ispitivanih sorti vinove loze, ne može potpuno da podrži sva predhodno uočena grupisanja ispitivanih izolata *E. lata*, što je prikazano u tabelama 33, 34, 35 i 36.

Tabela 36. Prosečna ocena intenziteta simptoma 6 sorti vinove loze na inokulaciju proučavanim izolatima *E. lata* nakon 27 meseci, primenom Dankanovog testa značajnosti $p=0,05$

Sorte	<i>p</i> vrednosti				
	Homogene grupe				
	1	2	3	4	5
Italijanski rizling	0,050	0,051	0,061		
Kaberne sovinjon	0,249	0,084			
Kardinal	0,286	0,087	0,192		
Rkaciteli	0,058	0,055	0,194		
Prokupac	0,313	0,098	0,122	0,496	0,711
Burgundac crni	0,238	0,209	0,680		

Druga ocena intenziteta simptoma 6 sorti na ispitivane izolate obavljena je 27 meseci nakon inokulacije (Tabela 33, 36). Svi proučavani izolati prouzrokovali su simptome na lastarima (Slika 49, Grafik 4, Tabela 33). Parnim poređenjem rezultata intenziteta simptoma na 6 sorti nakon 27 meseci na osnovu p vrednosti uočava se da sorte Italijanski rizling, Kardinal, Rkaciteli i Burgundac crni (Slika 49) formiraju po 3 homogene grupe testiranih izolata koje između sebe pokazuju značajne statističke razlike. S tim da se kod sve 4 sorte jasno izdvajaju homogene grupe najvirulentijih izolata EL17, EL27, EL29, 8F i BX1.10, dok raspored ostalih izolata varira od sorte do sorte. Pa tako, kod sorte Italijanski rizling najmanje virulentni izolati EL152, EL153, EL154, EL158, EL156 i EL151 smešteni su u prvu homogenu grupu i jasno se odvajaju od druge homogene grupe. Izolati EL199, EL150, EL155, EL157 su smešteni u prvu i drugu homogenou grupu i ne ispoljavaju jasnu statističku razliku. Sorta Kaberne sovinjon formira 2 jasne homogene grupe, gde su statističke razlike značajno izražene, odnosno jasno se odvajaju druga grupa veoma virulentnih izolata (EL30, EL17, 8F i EL29), dok su ostali izolati manje virulentni. Sorta Prokupac obrazuje 5 homogene grupe, koje ispoljavaju značajnu statističku razliku. U prvoj homogenoj grupi jasno se izdvajaju izolati EL158, kao najmanje virulentni, dok su ostali izolati EL156, EL153, EL157, EL154, EL199, EL152 i EL155 grupisani u drugu homogenou grupu, a to znači da se između ovih izolata ne ispoljava značajna statistička razlika.



Slika 49. Listovi sa iskrzanim ivicama, 27 meseci nakon inokulacije, sorta Burgundac crni, izolat EL199.

U drugoj grupi se izdvaja izolat EL150 koji se ne odvaja jasno od treće homogene grupe, a izolat EL151 iz četvrte homogene grupe je grupisan i u petoj grupi. U petu grupu su još smešteni izolati EL30, 8F i BX1.10, koji ispoljavaju značajnu statističku razliku u odnosu na izolat EL151 iz grupe. Dok su izolati EL29, EL17 i EL27, iz pete grupe najvirulentniji (Tabela 33, 36).

Nakon 27 meseci od inokulacije, praćena je pojava nekroze oko mesta inokulacije (Tabela 37, Slika 50).



Slika 50. Nekroza tkiva iznad i ispod mesta inokulacije: a – sorta Kardinal, izolat EL 17, b – sorta Rkaciteli, izolat EL 27, c – sorta Italijanski rizling, izolat EL 157.

Svi izučavani izolati izazvali su pojavu nekroze tkiva oko mesta inokulacije na svim testiranim sortama vinove loze (Grafik 5, Tabela 37).

Zavisno od izolata, prosečna dužina nekroze na stablima vinove loze bila je od 3 mm (sorta Prokupac, izolat EL153) do 96,5 mm (sorta Rkaciteli, izolat EL27). Kao najagresivniji izolati na svim ispitivanim sortama pokazali su se EL17, EL27, EL29, EL30, 8F i BX1.10.

Tabela 37. Parametri korišćeni pri oceni osetljivosti (dužina nekroze (mm)) inokulisanih ukorenjenih reznica 6 sorti vinove loze na ispitivane izolate *E. lata* 27 meseci nakon inokulacije, primenom Dankanovog testa značajnosti $p= 0,05$

Izolat/ Sorta	Dužina nekroze (mm)					
	Italijanski rizling	Kaberne sovinjon	Kardinal	Rkaciteli	Prokupac	Burgundac crni
EL 17	35,00a	28,00ab	36,00bcde	88,30bc	4,00b	38,00ab
EL 27	35,80a	39,00a	72,30a	96,50a	7,00a	43,00a
EL 29	32,80ab	34,00a	43,00bcd	91,00b	5,00ab	36,00ab
EL 30	29,00ab	24,00ab	51,00ab	72,00bc	5,00ab	30,00bcd
8F	35,00a	23,00bc	49,00ab	78,00bc	5,00ab	32,00abc
BX1.10	29,00ab	29,00ab	55,00ab	85,00bc	4,00b	31,10abc
EL 150	32,90ab	23,00bc	20,00de	38,50g	4,00b	19,10defgh
EL 151	33,80ab	21,00bc	19,30de	52,00def	4,00b	24,60defg
EL 152	33,40ab	11,00cd	21,00cde	48,00def	4,00b	26,00cdef
EL 153	20,90bcd	17,00bcd	19,80de	39,00efg	3,00bc	22,4defg
EL 154	19,50bcd	25,00ab	22,00cde	29,00fg	4,00b	16,90fgh
EL 155	24,40bc	22,00bc	18,50de	44,00efg	5,00ab	19,00efgh
EL 156	24,40bc	17,00bcd	23,00cde	47,00def	4,6ab	20,00defgh
EL 157	24,80bc	14,00cd	21,00cde	53,00def	5,00ab	24,60defg
EL 158	15,10cd	17,00bcd	11,00e	67,00cd	4,00b	11,60 h
EL 199	29,50ab	17,60bcd	21,00sde	52,00de	4,00b	16,00 gh
kontrola	0,00e	0,00d	0,00f	0,00h	0,00c	0,00i

*Podaci u kolonama obeleženi istim slovima nisu statistički značajno različiti na osnovu Dankanovog testa $p= 0,05$.

Parnim poređenjem prosečnih dužina nekroze oko mesta inokulacije na sortama Italijanski rizling i Rkaciteli uočavaju se 6 homogenih grupa koje ispoljavaju međusobnu značajnu statističku razliku. Sorta Kaberne sovinjon formira 4 homogene grupe izolata. Poređenjem p vrednosti uočava se značajna statistička razlika između grupa. Kardinal obrazuje 5 homogenih grupa, a sorta Prokupac samo 2. Kod sorte Burgundac crni formira se 7 homogenih grupa izolata (Tabela 38). Analizom p vrednosti vidi se da postoji značajna statistička razlika između grupa.

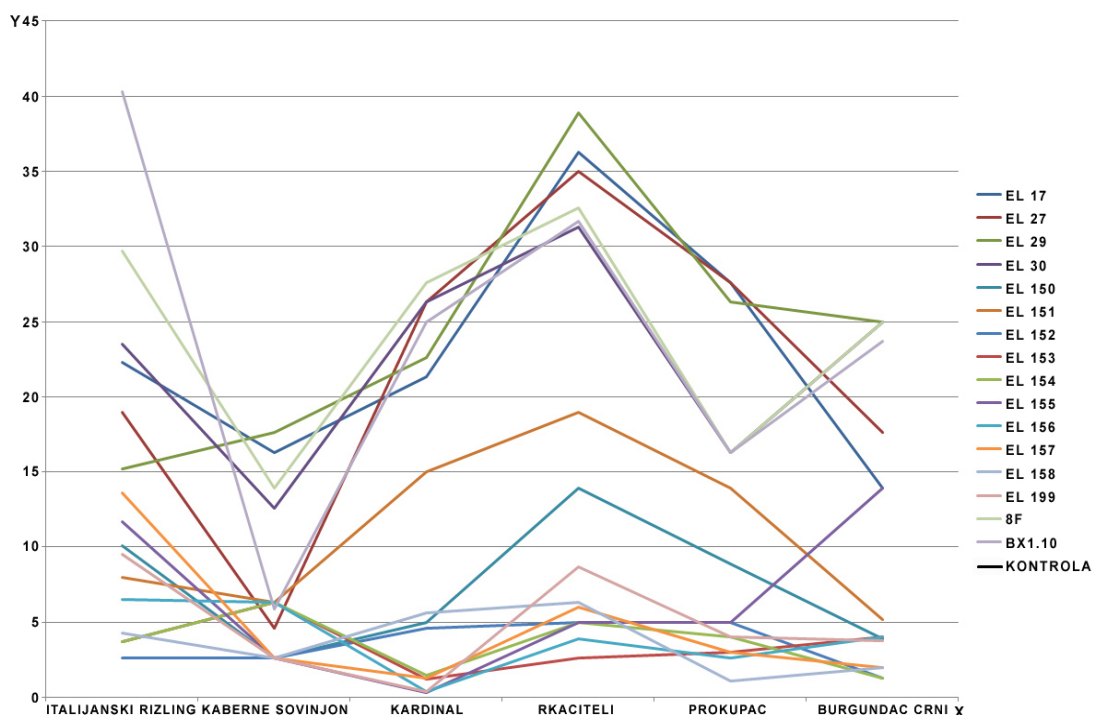
Tabela 38. Prosečna ocena dužine nekroze oko mesta inokulacije 6 sorti vinove loze na inokulaciju proučavanim izolatima *E. lata* nakon 27 meseci, primenom Dankanovog testa značajnosti $p=0,05$

Sorte	<i>p</i> vrednosti						
	Homogene grupe						
	1	2	3	4	5	6	7
Italijanski rizling	0,149	0,217	0,080	0,217	0,053	0,70	
Kaberne sovinjon	0,062	0,051	0,072	0,109			
Kardinal	0,050	0,146	0,163	0,316	1,000		
Rkaciteli	0,165	0,061	0,117	0,063	0,144	0,113	
Prokupac	0,293	0,112					
Burgundac crni	0,079	0,087	0,058	0,066	0,117	0,087	0,113

Parnim poređenjem prosečnih dužina nekroze oko mesta inokulacije sorti po pojedinim izolatima, uočava se da izolati EL17, EL150, EL153, EL154, EL155, EL156 i EL158 grupišu ispitivane sorte u 3 jasno odvojene homogene grupe. Dok izolati EL29, EL30, EL151, EL152, EL157 i EL199 formiraju po 4 homogene grupe sorti, a izolati EL27, 8F, BX1.10 formiraju po 5 jasno izdvojenih homogenih grupa. Kod svih ispitivanih izolata nakon parnog poređenja prosečne dužine nekroze oko mesta inokulacije sorti po pojedinim izolatima u prvu homogenu grupu smeštena je sorta Prokupac, koja pokazuje statistički značajno manju prosečnu dužinu nekroze u odnosu na sve ostale grupe, što znači da je ova sorta najotpornija. U poslednju homogenu grupu kod svih testiranih izolata smeštena je sorta Rkaciteli, koja pokazuje statistički najveću dužinu nekroze, a to znači da je ova sorta najosetljivija. Nešto manju statistički značajnu razliku od sorte Rkaciteli ispoljava sorta Kardinal i ona je kod izolata EL27, EL29, EL30, 8F i BX1.10 jasno izdvojena u četvrtu homogenu grupu. Ostale sorte Kaberne sovinjon, Italijanski rizling i Burgundac crni smeštane su u razne homogene grupe zavisno od izolata, pa iz tog razloga kriterijum parnog poređenja prosečne dužine nekroze ne može se kao samostalan uzeti za grupisanje istih (Grafik 4).

Parnim poređenjem rezultata primenom Dankanovog testa, korišćenjem *p* vrednosti došlo se do zaključka da izolati EL17, EL27, EL29, EL30, 8F i BX1.10 (Tabela 33, 34, 35, 36, 37, 38) ispoljavaju značajnu statističku razliku u odnosu na

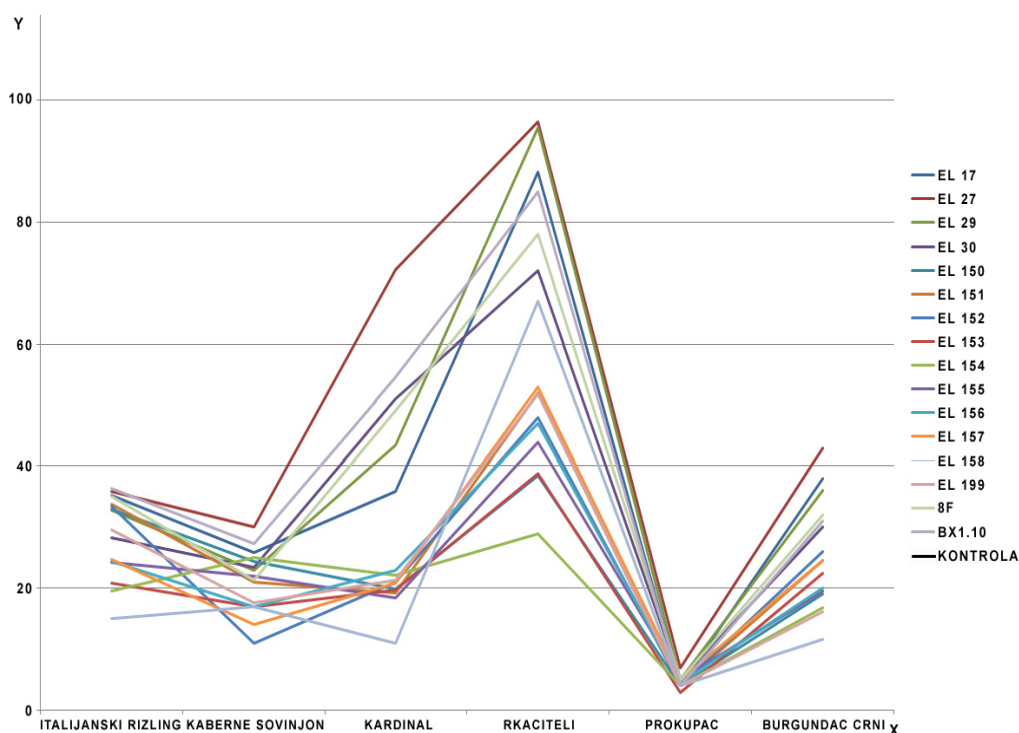
druge izolate na svim ispitivanim sortama, što znači da su agresivniji od ostalih testiranih izolata (Slika 47).



Grafik 4. Ocena osetljivosti testiranih sorti vinove loze na osnovu razlike u dužini lastara inokulisanih i kontrolnih biljaka nakon 27 meseci od inokulacije. X osa: – sorte, Y osa: – intenzitet simptoma.

Takođe je primećeno da pojava simptoma na lastarima nije u korelaciji sa pojavom nekroze tkiva oko mesta inokulacije, što se vidi iz grafika 3, 4 i 5. Na primer, inokulacijom ukorenjenih reznica izolatom EL157, nakon 8 meseci, pojavljuju se simptomi na lastarima jedino na sorti Kaberne sovinjon (Grafik 3, Tabela 33, 37).

Tek posle 27 meseci dolazi do pojave simptoma na lastarima na ostalim sortama (Grafik 4, Tabela 33). Bez obzira na pojavu i intenzitet simptoma, nakon 27 meseci izolat EL157 je prouzrokovao nekrozu tkiva oko mesta inokulacije na svim testiranim sortama (Grafik 5, Tabela 37). Na sorti Kardinal, izolati EL153, EL154, EL157 nakon 8 meseci nisu izazvali pojavu simptoma na lastarima. Tek posle 27 meseci dolazi do pojave simptoma. Međutim, nakon 27 meseci ovi izolati su prouzrokovali statistički veoma značajnu dužinu nekroze oko mesta inokulacije (Tabela 37, Grafik 5).



Grafik 5. Ocena osetljivosti testiranih sorti vinove loze na osnovu dužine nekroze okomesta inokulacije nakon 27 meseci. X osa: – sorte, Y osa: – dužina nekroze (mm).

Razlika u dužini lastara inokuliranih i kontrolnih biljaka 6 ispitivanih sorti nakon 8 i 27 meseci i dužina nekroze oko mesta inokulacije, kao zasebni kriterijumi za ocenu osetljivosti ispitivanih sorti vinove loze, ne mogu potpuno da podrže sva predhodno uočena grupisanja ispitivanih izolata *E. lata*, što je prikazano u tabelama 33, 34, 35, 36, 37 i 38.

Svaka od metoda ocene osetljivosti sorti vinove loze na ispitivane izolate *E. lata* ima prednosti. Prednost metode inokulacije neukorenjenih reznica je što se za postavljanje ogleda koriste reznice jednogodišnjih lastara vinove loze u fazi mirovanja. To znači da se na inokuliranim reznicama istovremeno razvijaju lastari i micelija gljive, te se tako za 5 do 10 nedelja pojavljuju simptomi na lastarima. Ovo je veoma bitno za relativno brzo testiranje osetljivosti većeg broja sorti vinove loze. Ogled se relativno lako postavlja i postavljeni ogled ne zauzima veliki prostor.

Druga metoda inokulacija ukorenjenih reznica je zahtevnija jer se koriste ukorenjene biljke stare godinu dana i zahteva mnogo više prostora i vremena za izvođenje od prve metode.

Takodje, druga metoda je pouzdanija, jer se prati razlika u dužini lastara inokulisanih i kontrolnih biljaka, kao i dužina nekroze oko mesta inokulacije. Dok se kod prve metode ocena intenziteta simptoma vrši samo na osnovu broja obolelih liski na inokulisanim neukorenjenim reznicama vinove loze.

Isto tako analizom rezultata utvrđeno je da su se izolati isto ponašali u pogledu osetljivosti u obe metode.

6. DISKUSIJA

Vinogradarstvo predstavlja važnu granu poljoprivredne proizvodnje u Srbiji. Značaj vinogradarstva se ističe i zbog uloge koju grožđe ima u ishrani stanovništva. Pored upotrebe grožđa u svežem stanju, najveći deo grožđa se preradi u vino, koje treba tretirati više kao hranu, a manje kao alkoholno piće.

U Srbiji ukupan prosečan prinos grožđa u 2016. iznosio je blizu 145.829,00 tona. U našoj zemlji oko 21.201 ha nalazi se pod vinovom lozom. Ukupan prosečan prinos za 2016. iznosio je 6.900 kg/ha (**Republički zavod za statistiku**, 2016).

Veliki broj biljnih bolesti može značajno uticati na smanjenje prinosa i kvaliteta u vinogradarskoj proizvodnji. Među svim prouzrokovateljima bolesti na vinovoj lozi, fitopatogene gljive se po važnosti nalaze na prvom mestu ispred fitopatogenih prokariota i virusa (**Agrios, 2005**).

Predstavnici roda *Eutypa*, kao prouzrokovatelji odumiranja čokota vinove loze - eutipoze, obično nisu monofagni paraziti, već često parazitiraju više biljnih vrsta u okviru nekoliko familija. Na vinovoj lozi opisano je više prouzrokovatelja odumiranja čokota vinive loze, od kojih je vrsta *E. lata* najpoznatija i smatra se ekonomski najznačajnijom.

6.1. Simptomi odumiranja čokota vinove loze u vinogradima

Tokom višegodišnjeg perioda (2004-2012) praćenja u vinogradima u 14 lokaliteta, ali i na pojedinačnim čokotima vinove loze oko okućnica na području Srbije, utvrđeno je da gljiva *E. lata* prouzrokuje simptome na lastarima dužine 25 do 50 cm, a kasnije kako bolest napreduje i na stablu i krakovima obolelih biljaka. To je i dokazano izolacijom patogena, a potom i veštačkim inokulacijama na reznicama većeg broja sorti vinove loze. Tokom navedenog perioda praćenja u vinogradima u 14 lokaliteta u Srbiji konstantovano je prisustvo simptoma koje vrsta *E. lata* prouzrokuje i na cvastima i bobicama grozda.

Prema **Carter and Price (1973)**, i **Day and Carter (1976)**, simptomi na lastarima mogu se opaziti kada lastari imaju 3 ili 4 internodije. Simptomi se kasnije, tokom vegetacije, veoma teško mogu uočiti i otkriti zato što oboleli listovi bivaju

zaklonjeni zdravim lastarima i listovima. Oboleli listovi prestaju sa porastom, hlorotični su i povijaju se prma naličju. Internodije su skraćene i često su sa cik-cak rasporedom, a grozdovi su slabo razvijeni i proređeni (**Munkvold et al., 1993, 1994**). Rak rane nastaju usled rasta zdravog tkiva na prelazu zdravog i obolelog tkiva, smeđe su boje i obično su pokrivenne korom drveta. Vinova loza umire kada se nekroza proširi na celo stablo (**Péros and Berger 1994; Sosonowski et al. 2007a, b**).

Simptomi na lastarima vinove loze mogu da ukažu na prisustvo ove gljive u stablu ili krakovima vinove loze, a kako bolest napreduje, simptomi se šire na celu biljku. Rast gljive u drvetu je spor, 10-20 cm godišnje, zbog čega se nakon infekcije, simptomi odumiranja na zeljastim organima ne pojavljuju u prve 2 do 3 vegetacione sezone (**Munkvold et al., 1993**). Prvi simptomi se uočavaju tek treće ili četvrte godine od infekcije. Ovako duga inkubacija gljive u stablu i krakovima čini ovu bolest "podmuklom", a zbog sporog razvoja bolesti ekonomski gubici se ispoljavaju u vinogradima starijim od osam godina. Isto tako, gljiva ne inficira novu lozu mlađu od 5 godina, a simptomi se retko vidaju na vinovoj lozi mlađoj od 8 godina (**Gubler et al., 2005; Delibašić i sar., 2006a, b**).

Nekroza tkiva se vremenom kružno širi, zahvatajući sve veći deo preseka, a istovremeno se prostire i duž stabla, na gore i na dole i dopire do korenovog vrata. Sušenje krakova, glave čokota i rukavaca, koje nastaje kao posledica napredovanja bolesti, najbolje se uočava u toku zime (**Glawe et al., 1982; Munkvold et al., 1993**).

Preseci nastali redovnom prolećnom rezidbom predstavljaju mesta kroz koje patogen može da prodre i da ostvari zarazu (**Sosnowski et al, 2007b**). Često se iz ovako zaraženih delova čokota razvijaju lastari na kojima se tek naredne godine pojavljuju simptomi u vidu skraćenih internodija, često bez listova (**Gubler et al., 2005; Ivanović i Ivanović, 2002, 2005a**).

Zbog sve ozbiljnijih zahteva tržišta poslednjih godina u vinogradarskoj proizvodnji veliki značaj se pridaje kvalitetu prinosa, koji može biti umanjen zbog različitih bolesti (**Van Niekerk et al., 2003**). Odumiranje čokota vinove loze upravo spada u grupu biljnih bolesti koja u značajnoj meri može da smanji kvalitet grožđa. Grožđe koje potiče sa obolelih čokota ne može se koristiti za spravljanje vina. Vidljivi simptomi ove bolesti na vinovoj lozi uočavaju se na lastarima dužine 25 do 50 cm. Kao posledica toksina koje luči ova gljiva može doći do pojave simptoma na listovima u

vidu nekroze po obodu liske i smanjenog porasta i hloroze listova. Ivice lista često su iskrzane i savijene prema naličju, a kod jačih infekcija površina listova je većim delom prekrivena nekrotičnim pegama. Centralni deo lisne ploče ima naboran izgled, a zaraženi listovi se suše i prevremeno opadaju. Lastari su skraćeni usled usporenog porasta, svetlozelene boje, često sa cik-cak internodijama. Pojava simptoma i opis odumiranja na vinovoj lozi u Srbiji je u sagalsnosti sa opisanim u literaturi. Takođe, nije uočena razlika u opisu simptoma između lokaliteta i na različitim sortama. Sve komercijalne sorte vinove loze osetljive su na ovu bolest (**Sosnowski et al., 2007 b; Gajić i sar., 2008; Živković et al., 2012a, b**). Poslednjih godina u našoj zemlji, odumiranje čokota vinove loze redovno se pojavljuje u našim vinogorjima i nanosi ozbiljne ekonomske gubitke (**Gajić i sar., 2008; Živković et al., 2012a, b**).

Na osnovu patogenih, morfoloških i odgajivačkih odlika 14 izolata *Eutypa* sp. poreklom iz delova, sa simptomima odumiranja, prikupljenih sa područja Srbije, i njihovim upoređivanjem sa dva referentna izolata *E. lata*, poreklom iz Italije i Francuske, utvrđeno je da odumiranje čokota vinove loze kod nas prouzrokuje vrsta iz roda *Eutypa*, i to: *Eutypa lata* (syn. *Eutypa armeniaca*), anamorf *Libertella blepharis*.

6.2. Patogene osobine izolata *Eutypa lata*

Izolacijom iz zaraženih biljaka vinove loze dobijeno je ukupno 47 izolata, a za dalja istraživanja odabrano je 14 izolata *E. lata*. Patogenost proučavanih izolata *E. lata* proverena je primenom 2 metode, koje su se pokazale podjednako uspešne: inokulacijom neukorenjenih reznica vinove loze, i inokulacijom ukorenjenih reznica vinove loze. Svih 14 proučavanih izolata prouzrokovali su odumiranje inokulisanih reznica vinove loze sorte Kaberne sovignon. Nakon inokulacije neukorenjenih reznica u uslovima staklenika u fazi mirovanja, došlo je do pojave simptoma 8 nedelja nakon inokulacije u prvom vegetacionom ciklusu. Simptomi su se uočavali na listovima inokulisanih biljaka u vidu zakržljalih, hlorotičnih listova sa povijenim ivicama prema naličju i hlorotičnim i nekrotičnim pegama po obodu istih, koje se kasnije šire po celoj površini a potom prouzrokuju sušenje i opadanje listova. Lastari se značajno skraćuju usled usporenog porasta, imaju svetlo zelenu boju i tzv. cik-cak izgled internodija. Simptomi na lastarima koji su se pojavili u uslovima staklenika u ovom radu slični su

simptomima na vinovoj lozi u prirodi. Prema literaturnim podacima nekroza listova koja se pojavljuje na inokuliranim reznicama identična je sa nekrozom liske izazvanom filtratom kulture gljiva ili sa toksinom eutipinom, dobijenim ekstrakcijom iz listova zaraženih biljaka vinove loze iz vinograda (**Tey-Rulh et al., 1991**, loc. cit. **Péros and Berger, 1994**; **Wicks, 1999**; **Mahoney et al., 2005**; **Jimenez-Teja et al., 2006**). Prema **Petzold et al. (1981)** i **Mur (1988)** pojava simptoma na listovima nastaje kao posledica toksičnih proizvoda koji se kreću od mesta inokulacije ka rastućim lastarima (**Travadon et al., 2013**).

Ramos et al. (1975) i **Carter et al. (1985)** pratili su razlike u agresivnosti izolata *E. lata* na kruški, kajsiji i bademu, a na vinovoj lozi **Péros and Berger (1994)**, **Sosnowski et al. (2007a, b)** i **Trouillas and Gubler (2010)**. Tako su **Ramos et al. (1975)** i **Carter et al. (1985)** ispitivali patogenost 50 izolata *E. lata* izolovanih iz kruške, vinove loze i badema, inokulacijom grana na kruški (1 sorta), kajsiji (4 sorte) i bademu (6 sorti). Prvo očitavanje rezultata vršeno je nakon 4, a drugo nakon 28 meseci. Ovi autori su ustanovili da ispitivani izolati pokazuju različiti stepen agresivnosti prema testiranim sortama kruške, kajsije i badema. Takođe su ustanovili da je potrebno različito vreme za pojavu nekroze oko mesta inokulacije. Tako na kajsiji i bademu nekrotirano tkivo oko mesta inokulacije pojavljuje se 4 do 6 meseci od inokulacije, a kod vinove loze treba da prođe 2 godine da bi došlo do pojave nekroze oko mesta inokulacije (**Carter et al., 1985**; **Munkvold, 2001**). Slične rezultate dobili su **Péros and Berger (1994)**, **Sosnowski et al. (2007a, b)** i **Trouillas and Gubler (2010)** testirajući agresivnost više izolata *E. lata* na vinovoj lozi.

Vreme potrebno za razvoj simptoma u ovom radu odgovara rezultatima provere patogenosti vrste *E. lata*, koje navode **Carter (1985)**, **Péros and Berger (1994)**, **Sosnowski et al. (2007a)**. U radu **Péros and Berger (1994)** navode da su se simptomi na lastarima pojavili 8 nedelja nakon inokulacije u prvom vegetacionom ciklusu. Drugo očitavanje pojave simptoma sprovedli su 8 nedelja posle kretanja porasta lastara vinove loze u drugom vegetacionom ciklusu. Ovi autori su ustanovili da intenzitet pojavljivanja simptoma na lastarima zavisi od izolata *E. lata*. Naime, u ogledu **Péros and Berger (1994)** od 12 ispitivanih izolata *E. lata* poreklom iz vinove loze i kajsije, na sorti Kaberne sovignon, 8 izolata su prouzrokovala pojavu simptoma na lastarima u većem procentu, a 4 izolata nisu izazvala simptome. Izolat BX1.10 prouzrokovao je pojavu

simptoma na najvećem broju testiranih reznica vinove loze (**Péros and Berger 1994**). Ispitivani izolati ispoljavaju različitu sposobnost stvaranja toksina eutipina i naseljavanja drveta. Verovatno su ove dve komponente povezane jer toksini mogu da potpomognu kolonizaciju, a veća količina gljivične mase može sintetisati ogromnu količinu toksina (**Péros and Berger, 1994; Travadon et al., 2013**).

U eksperimentima **Sosnowski et al. (2007a)** simptomi su reprodukovani nakon 8 meseci. Od 28 izolata *E. lata*, 24 izolata su prouzrokovali pojavu simptoma na lastarima sorte Grenaš, s tim da su 4 izolata izazvala pojavu simptoma na više od 50% inokuliranih biljaka ove sorte. Drugu procenu pojave simptoma **Sosnowski et al. (2007a)** sproveli su nakon 20 meseci. Dvadesetčetiri meseca od postavljanja ogleda merili su dužinu nekrotiranog dela tkiva ispod i iznad mesta inokulacije. Prema **Sosnowski et al. (2007a)** postoje značajne razlike između izolata, koje se ispoljavaju u intenzitetu pojave simptoma na lastarima i dužini nekrotiranog dela tkiva iznad i ispod mesta inokulacije. Nakon analize dobijenih rezultata **Sosnowski et al. (2007a)** došli su do zaključka da ne postoji zavisnost između pojave simptoma na lastarima i pojave nekroze tkiva oko mesta inokulacije. Tako na primer, 8 meseci od inokulacije na sorti Grenaš nisu svi izolati prouzrokovali pojavu simptoma na lastarima, dok su posle 24 meseca svi proučavani izolati izazvali nekrozu dela tkiva oko mesta inokulacije (**Sosnowski et al., 2007a**).

U ovom radu primenom druge metode, inokulacijom ukorenjenih reznica vinove loze, nakon 8 meseci od inokulacije nisu svi izolati izazvali simptome na lastarima. Međutim, posle 27 meseci od inokulacije, svi proučavani izolati *E. lata* prouzrokovali su pojavu već opisanih simptoma na lastarima inokuliranih biljaka vinove loze sorte Kaberne sovinjon. Takođe je ustanovljeno da svi proučavani izolati izazivaju pojavu nekroze dela tkiva iznad i ispod mesta inokulacije nakon 27 meseci od inokulacije. Najmanja dužina nekrotiranog dela tkiva na stablima biljaka vinove loze izazvao je izolat EL158, a najveću površinu nekroze dela tkiva oko mesta inokulacije produkovao je izolat EL27.

U ovom ogledu prvi simptomi na lastarima pojavili su se 8 meseci nakon inokulacije biljaka vinove loze sorte Kaberne sovinjon, što se slaže sa navodima **Sosnowski et al. (2007a i b)**. Međutim, drugo očitavanje obavljeno je 7 meseci kasnije u odnosu na ogled koji su postavili **Sosnowski et al. (2007a)**. Naime, u našem ogledu

nije došlo do pojave simptoma na lastarima 20 meseci nakon inokulacije. Ova pojava može se objasniti prema **Sosnowski et al. (2007a i b)** postojanjem korelacije između intenziteta pojave simptoma inokulisanih biljaka vinove loze i porekla izolata. Naime, poreklo izolata može da utiče na stepen agresivnosti izolata. Primera radi, izolati poreklom iz vinove loze iz oblasti gde postoji duga tradicija gajenja kajsije i vinove loze, a samim tim i prisustvo odumiranja čokota vinove loze, bolje se prilagođavaju klimatskim uslovima u stakleniku (**Sosnowski et al., 2007a, b; Pitt et al., 2013**). Takođe, klimatske promene mogu uticati na pojavu i intenzitet simptoma na lastarima. Tačnije klima utiče tako što domaćin postaje osetljiviji prema određenim izolatima koji produkuju simptome u uslovima staklenika (**Sosnowski et al., 2007a, b; Rolshausen et al., 2014**). S obzirom da se simptomi u našem eksperimentu nisu pojavili 20 meseci od inokulacije ogleđ se pratio sve do pojave simptoma na lastarima.

6.3. Morfološke odlike izolata *Eutypa lata*

6.3.1. Makroskopske morfološke odlike proučavanih izolata *Eutypa lata*

Za uporedna morfološka proučavanja odabrano je 14 izolata *E. lata* i dva referentna izolata *E. lata*, poreklom iz međunarodnih kolekcija. Izolati *E. lata* na PDA podlozi razvijaju manje - više slične kolonije. Ivica kolonije je cela do blago fibrinozna. Ivična zona je od prozirne do prljavobele boje i prelazi u bleđožutu. Kolonija je pamučasta, sa vazdušnom micelijom u središnjem delu, dok je ka ivici micelija priljubljena za podlogu. Boja kolonije je pamučnobela i postepeno prelazi u svetložutu. Stromatične tvorevine se ne formiraju nakon 10 dana razvoja. Ivična zona naličja kolonije je od bezbojne do bleđožute boje. Centar kolonije je beličaste boje. Posle 30 dana naličje kolonije je kremžute boje i sa slabo uočljivim stromatičnim tvorevinama, a lice kolonije je pamučnobeke boje. Iz stromatičnih tvorevina oslobađa se sluzasti matriks bleđokrem boje iz kojeg se izlučuju konidije.

Makroskopskim pregledom kolonija izolata *E. lata* nisu uočene razlike u morfološkim osobinama micelije.

Dye and Carter (1976), Glawe et al. (1982) i McKemy et al. (1993) opisuju pamučno bele kolonije izolata *E. lata* na PDA podlozi. Vremenom boja kolonija prelazi

u krem. Pod uticajem smene 12 h svetla - 12 h mraka i pri naizmeničnim temperaturama od 19 °C i 15 °C, nakon 30 dana dolazi do sporulacije, što se slaže sa navodima **Carter (1994)** i **Munkvold (2001)**. Isti autori navode da se u nekim kulturama nakon 15 dana stvara sivi pigment a naličje pocrni. Tri do četiri nedelje od zasejavanja pod uticajem konstantnog UV svetla u kulturi se pojavljuju mali crni piknidi. Iz piknida se izlučuju konidije u vidu krem do narandžaste želatinozne mase (**Rolshusen et al., 2006; Trouillas and Gubler, 2010**).

6.3.2. Mikroskopske morfološke odlike proučavanih izolata *Eutypa lata*

Na osnovu podataka iz literature morfološke osobine anamorfnog stadijuma roda *Eutypa* nisu dovoljno pouzdana obeležja u identifikaciji izolata do nivoa vrste, iako imaju veliki značaj u klasifikaciji familije Diatrypaceae (**Rappaz, 1987; Trouillas et al., 2010; Rolshausen et al., 2014**).

Rod *Eutypa* ispoljava veoma veliku sličnost u izgledu konidija, ontogenezi konidija, karakteristikama kultura, kao i sličnosti teleomorfnog stadijuma sa drugim rodovima u okviru fam. Diatrypaceae, kao što su rod *Eutypella*, *Diatrype* i *Diatrypella*. To otežava razdvajanje i identifikaciju roda *Eutypa* (**Glawe and Rogers, 1982; Rolshausen et al., 2006; 2014**). S druge strane, morfološke osobine teleomorfnog stadijuma ovih gljiva, usled velike ujednačenosti, veoma su bitne za determinaciju patogena do nivoa roda. Međutim, u toku obilaska terena u vinogradima ni na jednom lokalitetu gde su uočeni simptomi odumiranja čokota vinove loze nije pronađen teleomorf. Zbog toga osobine teleomorfa nisu korišćene u determinaciji ovog patogena. Ispitivanja morfoloških osobina anamorfa gljive poslužila su za identifikaciju prouzrokovala odumiranja čokota vinove loze do nivoa roda. Morfološke i biometrijske vrednosti anamorfa bile su u saglasnosti i u potpunosti su odgovarale referentnim vrednostima iz literature za patogena *E. lata*. Od morfoloških osobina anamorfa uočene su jednoćelijske, končaste, hijalinske i blago savijene konidije sa spljoštenom osnovom, dužine 17,82-(32,00)-35,52 µm i širine 1,39-(1,45)-2,74 µm na PDA podlozi, što je karakteristično za vrstu *E. lata*. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima koje su prezentovali i drugi autori. **Glawe et al. (1982)** opisuje konidije *E. lata* kao jednoćelijske, končaste, blago povijene i hijalinske, dimenzija 25-74 µm × 1-2 µm.

Carter (1994) navodi da su konidije dimezija $18-45 \mu\text{m} \times 0,8-1,5 \mu\text{m}$. **Munkvold (2001)** opisuje konidije izolata *E. lata* kao končaste, prave ili povijene, veoma brojne, dimezija $20-45 \mu\text{m} \times 0,8-1,5 \mu\text{m}$. **Rolshausen et al. (2006, 2014)** navode da su dimezije konidija izolata *E. lata* izolovanih sa različitih domaćina $23,6-35,00 \mu\text{m} \times 1,8-4,7 \mu\text{m}$.

Morfologija konidija. Konidije ovog parazita oslobađaju se iz piknida u kulturi u lepljivoj, želatinoznoj masi, od krem do bledonaranžaste boje. Konidije su umereno krive sa spljoštenom osnovom, hijalinske i neseptirane. Širenje konidija iz mladih piknida odvija se u kapima vode, dok vetar može širiti suve ljuskaste mase konidija iz starijih piknida (**Glawe and Rogers, 1982; Munkvold, 2001**).

Gljiva *E. lata* se može lako odgajati na uobičajenim laboratorijskim podlogama, ali ne sporulišu svi izolati. Da bi se podstakla sporulacija, kulture se izlažu režimu svetlosti 12 h UV svetlo - 12 h mrak, 12 h svetlo - 12 h mrak ili 24 h UV zračenju i nakon 30 dana dolazi do sporulacije. **McKemy et al. (1993)** su podsticali sporulaciju tako što su kolonije *E. lata* izlagali smeni 12 h svetla - 12 h mraka. U ovom režimu nakon 30 dana dolazi do sporulacije. **Ju et al. (1991)** su za podsticanje sporulacije izolate *E. lata* presejavali na podlogu od 2 % PDA sa 5 g/l kvašćevog ekstrakta. Presejane kulture *E. lata* držali su u periodu od tri nedelje na $20 \text{ }^\circ\text{C}$ i izlagali ih uticaju 12 h fluorescentnog svetla - 12 h mraka. **Glawe and Rogers (1982)** i **Glawe et al. (1982)** su, da bi ubrzali sporulaciju, izolate *E. lata* na PDA podlozi izlagali smeni 12 h fluorescentnog svetla - 12 h mraka u trajanju od 30 dana. **Carter (1994)** je podsticao sporulaciju izolata *E. lata* na PDA podlozi izlaganjem 30 dana 24 h UV svetla ili kombinacijom 12 h UV svetla - 12 h mraka, kao i kombinacijom 12 h svetla - 12 h mraka. **Munkvold (2001)** navodi da se sporulacija konidija izolata *E. lata* na PDA podlozi podstiče konstantnim izlaganjem UV zracima u trajanju 30 dana.

Takođe ustanovljeno je da se na različitim hranljivim podlogama razlikuju i dimezije konidija. Dimezije konidija na MA podlozi su $18,25-(25,85)-33,45 \mu\text{m} \times 0,96-(1,71)-1,78 \mu\text{m}$, na GWA podlozi $15,77-(20,58)-25,38 \mu\text{m} \times 1,42-(2,18)-2,94 \mu\text{m}$, i na podlozi WA $17,66-(25,42)-33,17 \mu\text{m} \times 1,00-(1,42)-1,84 \mu\text{m}$.

Piknidi se obično obrazuju subkonikalno, na stromi, sastavljenoj od nekoliko do više gustih slojeva ćelija. Bazalni deo piknida pokriven je konidioforama na kojima se formiraju konidije (**Glawe and Rogers, 1982; Munkvold et al., 2001**). Kod svih

ispitivanih izolata konidije se formiraju u piknidima, što se slaže sa navodima iz literature.

Međutim, **McKemy et al. (1993)** navode da se konidije mogu obrazovati na dva načina i to iz piknida ili direktno na vazdušnoj miceliji ili hifama. Isti autori, osim toga, navode da konidiofore kod konidija koje se formiraju u piknidima nastaju iz pseudoparenhinskog tkiva, što se slaže sa rezultatima iz našeg oglada. Kod konidija koje se formiraju direktno na vazdušnoj miceliji ili hifama, konidiofore nastaju iz vazdušne micelije ili hifa. U oba slučaja konidiofore su jako razgranate. Kod konidija koje se stvaraju u piknidima konidiogene ćelije su zbijene, dok su kod konidija koje se stvaraju direktno na vazdušnoj miceliji ili hifama manje zbijene.

Klijanje konidija. Raniji pokušaji da se nakliju konidije na agaru obično su rezultirali u formiranju micelija (**Moller and Kasamatis, 1978; Glawe and Rogers, 1982; Rogers and Glawe, 1983**). Moguće je da takva micelija nastaje kao rezultat klijanja konidija, ali se klijala konidija ne može raspoznati u masi micelije (**Glawe and Jacobs, 1987**). Konidije mogu biti veoma efikasne u širenju bolesti na malim rastojanjima, pošto se stvaraju u sluzastoj masi i šire se kapima vode. Iako je stepen klijanja konidija u prirodi veoma mali, slično kao i u eksperimentalnim uslovima, stvaranje ogromnog broja konidija iz svakog piknida može sadržati dovoljan broj klijalih konidija da posluže kao značajan izvor inokuluma (**Ju et al., 1991**). Međutim, **Travadon et al. (2012)** su utvrdili, na osnovu genetske analize više izolata *E. lata* primenom 9 mikrosatelitnih markera, da se ova bolest uglavnom širi askosporama.

Rezultati makroskopskih i mikroskopskih morfoloških istraživanja proučavanih izolata, poreklom iz obolelih čokota vinove loze, nedvosmisleno ukazuju na činjenicu da uzročnik ove pojave pripada rodu *Eutypa*.

6.3.3. Formiranje teleomornog stadijuma

Ni jedan izolat *E. lata*, poreklom iz Srbije, kao i referentni izolati BX1.10 iz Francuske i 8F, poreklom iz Italije, nisu formirali peritecije u kulturi, u uslovima postavljenog eksperimenta. **Glawe and Rogers (1982)** i **Carter (1994)** navode da se u vinogradima starijim od 10 godina u oblastima gde su česte kiše, i u vinogradima gde postoje sistemi za navodnjavanje, razvijaju peritecije na mrtvom tkivu drveta. Takođe,

prema ovim autorima peritecije se ne formiraju u kulturi, što se slaže sa navodima **Munkvold (2001)**.

Na biljkama vinove loze u prirodi, na teritoriji Srbije, nije uočen teleomorfni stadijum. Ovi rezultati se poklapaju sa navodima **Munkvold et al. (1993)**. Naime, u nekim oblastima Kalifornije, gde su godišnje padavine 500 mm, ne dolazi do formiranja peritecija sa askusima i askosporama. Peritecije se razvijaju veoma sporo, potrebno je najmanje da prođe 5 godina od infekcije do pojave zrelih askospora.

Tradicionalni načini determinacije vrste *E. lata*, na osnovu morfologije, izgleda kultura, patologije, su nepouzdana, jer ne postoje standardi po kojima se te osobine ispituju (**Octave et al., 2009**). Potrebna je uniformnost protokola za gajenje vrste *E. lata*. Iz tih razloga dobijeni rezultati nisu pouzdani u identifikaciji ispitivanih izolata *Eutypa* sp. Proučavani izolati su dalje identifikovani i karakterisani primenom molekularnih metoda.

6.3.4. Odgajivačke odlike proučavanih izolata *Eutypa lata*

Boja kolonije proučavanih izolata kretala se od pamučnobeke do sivobeke boje. Rezultati uticaja hranljivih podloga na porast i sporulaciju izolata *E. lata* pokazuju da se kolonije dobro razvijaju na većini ispitivanih supstrata. Svi izolati najveći porast ostvaruju na PDA i MA podlogama, zatim na GWA, WA i YA, a najnepovoljnija podloga za razvoj ove gljive je TA, na kojoj se nije razvila kolonija ni jednog proučavanog izolata. U mnogobrojnim istraživanjima inostranih autora PDA podloga se pokazala kao najbolji izbor za razvoj patogena *E. lata* iz stabla i krakova vinove loze (**Glawe et al., 1982; Carter, 1994; Munkvold, 2001**). Što se tiče sporulacije, najbolje sporulišu izolati EL17, EL 27, EL29, EL30, 8F, BX1.10, EL151 i EL199 na PDA podlozi, dok na podlogama MA, GWA sporulišu izolati EL17, EL27, EL29, EL30, 8F, BX1.10, EL151, a na podlogama YA i TA ne dolazi do sporulacije. U literaturi nema mnogo podataka o odgajivačkim osobinama ove gljive.

Hranljive podloge su u velikoj meri uticale na sposobnost proučavanih izolata *E. lata* da formiraju konidije u većem ili manjem broju. Tako su različite podloge kod svih proučavanih izolata uticale na nivo sporulacije, osim kod podloga od YA i TA, gde nije

došlo do sporulacije ni nakon 3 meseca. Želatinozni matriks nije se stvorio na ovim podlogama ni nakon godinu dana od zasejavanja.

Rezultati ispitivanja pokazuju da svi proučavani tipovi svetlosti ne utiču statistički značajno na radijalni porast ispitivanih izolata, ali zato izazivaju značajnu statističku razliku u sporulaciji istih. Tako su različiti tipovi svetlosti, kod svih ispitivanih izolata, uticale na nivo sporulacije. Izolati EL17, EL27, EL20, EL30, 8F i BX1.10 obrazuju statistički značajno veći broj konidija pri 12 h UV svetla a potom pod dejstvom 12 h UV i 12 h tame (**Glawe and Rogers, 1982; Glawe et al., 1982; Munkvold, 2001**).

6.4. Molekularna detekcija i identifikacija *Eutypa lata* poreklom iz vinove loze

Molekularne metode, kao savremen pristup proučavanja biljnih patogena, imaju veliku prednost kod precizne identifikacije i karakterizacije različitih patogena. Zbog svoje jednostavnosti i pouzdanosti, PCR metoda je postala jedna od najčešće korišćenih metoda u detekciji fitopatogenih gljiva. Molekularna detekcija proučavanih izolata *Eutypa* sp. obavljena je nakon izolacije ukupne DNK. Ekstrahovana DNK bila je neoštećena i pogodna za dalje uspešno umnožavanje u PCR reakciji, omogućavajući uspešnu detekciju svih izolata korišćenih u ovom radu.

Primenom različitih parova prajmera u PCR reakciji ustanovljena je razlika u specifičnosti i pogodnosti detekcije sekvenci tri različita dela genoma: ITS regiona, proteinskog dela gena β -tubulin i DNK zavisna RNK polimeraza (RPB2) gena. Univerzalni par prajmera ITS1-ITS4, koji amplifikuje ITS region svih Eucariota, pokazao se pogodnim za proveru uspešnosti ekstrakcije DNK, a takođe i za korišćenje u okviru protokola za identifikaciju sekvenciranjem dobijenih produkata vrste roda *Eutypa*.

DeScenzo et al. (1999) po prvi put koriste sekvence ITS regiona za proučavanje 115 izolata *E. lata*, izolovanih iz deset biljnih domaćina, različitog geografskog porekla. Ovi autori su ustanovili da kod svih proučavanih izolata *E. lata* identične su 5.8 S rDNK sekvence, bez obzira na domaćina i poreklo izolata.

Potom, **Lecomte et al. (2000)** koriste DNK sekvence za identifikaciju vrste *E. lata*. Na osnovu ITS regiona rDNK, sintetisali su 3 para prajmera Lata1/Lata2-1, Lata1/Lata2-2 i Lata3/Lata2-1, kao i 3 para prajmera na bazi fragmenta RAPD sekvence SCA 10A/SCA 10B, SCB 02A/SCB 02B i SCD 18 A/SCD 18 B. Primenom gore navedenih parova prajmera, testirali su 60 izolata *E. lata* različitog geografskog porekla, izolovanih iz vinove loze. **Rolshausen et al. (2004)** koristeći univerzalni par prajmera ITS1-ITS4 i restrikcioni enzim *AluI*, analizom RFLP proizvoda, u agaroznom gelu odvojili su preko 30 izolata *E. lata* iz različitih domaćina i različitog geografskog porekla, od ostalih vrsta iz familije Diatrypaceae. Broj radova koji koriste molekularne metoda za proučavanje vrste *E. lata* značajno raste od devedesetih godina prošlog veka.

Rolshausen et al. (2006) primenom ITS rDNK i proteinskog dela β -tubulin gena analizirali su sekvence 46 izolata gljiva koje predstavljaju 15 različitih vrsta iz familije Diatrypaceae, među kojima je 25 izolata *E. lata* sakupljenih iz različitih biljnih domaćina i različitog geografskog porekla. Potom su **Trouillas and Gubler (2010)** uspešno determinisali 35 izolata *E. lata* kao i 7 izolata drugih gljiva, poreklom iz različitih biljnih domaćina, primenom univerzalnih prajmera ITS1-ITS4, sekvenciranjem produkata veličine od oko 566 bp kod svih ispitivanih izolata, kao i analizom sekvenci proteinskog dela gena β -tubulina i RPB2 gena.

Catal et al. (2007) su u svojim istraživanjima koristili univerzalni par prajmera ITS1F i ITS4 za sekvenciranje 25 izolata *E. lata* i petnaest *Eutypella vitis* izolata iz vinove loze, poreklom iz SAD. Dužina sekvenciranog ITS regiona za *E. lata* izolate bio je 503 bp a za *Eutypella vitis* izolate 492 bp. Nakon poređenja sa podacima iz GenBank baze isti autori su ustanovili da kod izolata *E. lata* iz različitih regiona postoje razlike u dužini ITS sekvence. Tako, kod izolata koji potiču iz savezne države Mičigen postoji podudarnost od 99 do 100%, dok kod izolata koji potiču iz Pensilvanije i Kalifornije podudarnost je 95 do 98%. Takođe, ITS sekvence *E. lata* pokazuju 88% sličnosti sa sekvencama gljive *Eutypella vitis*. ITS2 region gljive *E. lata* mnogo je varijabilniji od ITS1 regiona, pa je stoga dizajniranje specifičnih prajmera za identifikaciju gljive *E. lata* na osnovu ITS1-ITS2 regiona veoma težak. **Catal et al. (2007)** su na osnovu ITS1-ITS2 regiona dizajnirali specifični par prajmera EL1/EL4, čija primena se pokazala uspešnom za detekciju američkih izolata *E. lata*, dok je kod evropskih i australijskih izolata izostala amplifikacija.

Primenom univerzalnog para prajmer ITS1-ITS4 na osnovu analize sekvenci ITS regiona, 26 izolata *E. lata* iz ribizle i ogrozda i 7 *E. lata* izolata dobijenih iz GenBank baze podataka, **Wenneker et al. (2011)** utvrđuju sličnost između ispitivanih sekvenci od 97%. Takođe, brojni *E. lata* izolati u ovom istraživanju imaju identične sekvence.

Isto tako, **Úrbez-Torres et al. (2012)** koriste za analizu sekvenci ITS region, EFI- α i β -tubulin u cilju razdvajanja kompleksa gljiva odumiranja čokota vinove loze. Na ovaj način je identifikovano čak 17 različitih vrsta iz familije Diatrypaceae, koje doprinose stvaranju raka, među kojima je i vrsta *E. lata*.

Kako populacija *E. lata* iz vinove loze poreklom iz Srbije do sada nije proučavana na molekularnom nivou, nije poznata njihova genetička struktura, kao ni sličnost naših izolata sa izolatim *E. lata* poreklom iz Evrope i drugih delova sveta. Molekularna ispitivanja, osim detekcije, bila su usmerena i na njihovu identifikaciju i karakterizaciju. Dobijeni rezultati predstavljaju prvu detaljnu karakterizaciju ovog patogena u Srbiji.

Primenom specifičnog para prajmera Lata 1/Lata 2-2 (**Lecomte et al., 2000**) uspešno je amplifikovan fragment dužine od oko 385 bp kod svih 14 proučavanih izolata. Ovi prajmeri odabrani su na osnovu preporuke koju su dali **Lecomte et al. (2000)** u protokolu za brzu i efikasnu detekciju ovog patogena.

PCR se može kombinovati sa drugim tehnikama i time determinaciju učiniti još specifičnijom. Nakon PCR reakcije umnožena DNK može se tretirati restrikcionim enzimima (endonukleazama). Princip se zasniva na osobini restrikcionih enzima da razlažu fosfodiesteranu vezu polinukleotidnih lanaca unutar određenih sekvenci koja se zovu restrikciona mesta. Presecanjem lanca DNK nastaju manji fragmenti različitih dužina koji se mogu razdvajati elektroforezom. U zavisnosti od broja i veličine restrikcionih fragmenata nastaju DNK restrikcioni profili koji se mogu koristiti za karakterizaciju vrste. Poređenjem restrikcionih profila, može se utvrditi da li izolati pripadaju istim ili različitim vrstama. RFLP markeri daju realnu sliku polimorfizma i mogu se koristiti za precizno određivanje razlika između vrsta gljiva.

U okviru ovih istraživanja, dobijeni PCR proizvodi tretirani su restrikcionim enzimom *AluI*. Analizom RFLP proizvoda u agaroznom gelu, dobijeni su restrikcioni profili koji su jasno pokazali da nema razlike između analiziranih izolata.

Kod proučavanih izolata dobijeni su profili koji odgovaraju vrsti *E. lata* što u potpunosti odgovara identifikaciji primenom konvencionalnih metoda i sekvenciranjem. Kao referentni izolati u ovim istraživanjima korišćeni su i izolati 8 F poreklom iz Italije i BX1.10 poreklom iz Francuske, predhodno identifikovani kao *E. lata*. **Rolshausen et al. (2004)** su proučavali preko trideset izolata *E. lata* kao i petnaest izolata koji pripadaju fam. Diatrypaceae uključujući *E. laevata*, *E. leptoplaca*, *E. crustata*, *E. lejoplaca*, *E. astroidea*, *E. petrakii* var. *hederae* različitog geografskog porekla izolovanih iz različitih domaćina. Analizom RFLP proizvoda u agaroznom gelu, kod svih ispitivanih uzoraka *E. lata*, **Rolshausen et al. (2004)** jasno uočavaju tri trake sa približnim veličinama 100, 200 i 300 bp. RFLP metodom se potvrđuje specifičnost detekcije *E. lata* i diferenciranje ovog patogena od ostalih ispitivanih izolata. Međutim, restrikcioni profili odgovaraju i drugim patogenima *E. armeniaca*e i *E. laevata*. *E. armeniaca*e je prvi put opisana kao patogen kajsije i morfološki je identična sa *E. lata* pa se zato *E. armeniaca*e koristi kao sinonim za *E. lata* (**Rappaz, 1987; McKemy et al., 1993; Acero et al., 2004; Rolshausen et al., 2006**). Na osnovu uporednih istraživanja **Rolshausen et al. (2004)** preporučuju korišćenje RFLP analize u kombinaciji sa drugim metodama za detekciju gljiva, kao što su morfološke i odgajivačke karakteristike i sekvenciranje, jer se tada dobijaju tačnije i potpunije informacije. Obzirom da se primenjuje univerzalni par prajmera ITS1-ITS4 za PCR postoji mogućnost amplifikacije ITS regiona više gljiva naseljenih u tkivu drveta. Da bi se ovo izbeglo, preporučuje se da se prvo izolati *E. lata* odgaje na hranljivoj podlozi pa da se koristi PCR-RFLP (**Rolshausen et al., 2004**).

Identifikacija i karakterizacija *E. lata* je teška zbog velikih morfoloških sličnosti srodnih vrsta iz roda *Eutypa* (**Rolshausen et al., 2014**). Molekularne metode, PCR-RFLP veoma su korisne za filogenetsku analizu izolata ove vrste. Proučavanja izolata *E. lata* iz vinove loze u Srbiji pokazala su da u okviru izolata nije izražen polimorfizam, bez obzira na različito geografsko poreklo izolata. Proučavani izolati formirali su tri restrikcione trake od 100, 200 i 300 bp nakon digestije restrikcionim enzimom *AluI*. Korišćeni restrikcioni enzim ukazuje na mogućnost razdvajanja *E. lata* od ostalih srodnih vrsta (**Rolshausen et al., 2004**). Kako su molekularna proučavanja *E. lata* na vinovoj lozi u Srbiji započeta u okviru ove disertacije, po prvi put su dobijene sekvence

izolata iz naše zemlje. To je obezbedilo uslov za izbor novih kombinacija enzima koji bi se mogli primeniti u budućim dijagnostičkim proučavanjima.

Višestrukim poređenjem sekvenci odgovarajućih delova rDNK, kao i proteinskog dela gena β -tubulina i RPB2 gena sa dostupnim sekvencama odgovarajućih regiona genoma gljiva u GenBank bazi podataka i proračunom genetičke sličnosti, potvrđena je morfološka identifikacija svih izolata poreklom iz vinove loze.

Tako izolat EL153 kod koga je sekvenciran samo ITS region rDNK, dužina sekvenciranog ITS regiona bila je 453 bp, dok je kod ostalih izolata *E. lata* (EL17, EL27, EL29, EL199) bila 554 bp. Ovaj izolat na vinovoj lozi je nedvosmisleno ispoljio patogenost i morfološke osobine iste kao i kod drugih ispitivanih izolata. Proračunom genetičke sličnosti izolat EL153 imao je stepen nukleotidne identičnosti od 87,7% sa sekvencom sledećih izolata i to: JL744 (JN975359) poreklom iz Španije izolovanim iz vinove loze, UCD 2263MO (HQ288220), UCD 2275MO (HQ288221), poreklom iz SAD iz vinove loze, PD06032053 (GU071110), poreklom iz Holandije iz ribizle (*Ribes rubrum*), CA 38 (AY462541), CA31 (AY462540), poreklom iz SAD, izolovanih iz nepoznate vrste iz roda *Vitis*, 12-38-7EX4.6 (AY662393), 12-38-7EX3 (AY662392), poreklom iz Holandije, iz vinove loze, i WRP004 (DQ006939), poreklom iz Australije izolovanim iz kajsije, CSU-07-WP-VT12 (EU835166), CSU-07-WP-DO5 (EU835163), CSU-07-WP-DO3 (EU835162), CSU-07-WP-CV9 (EU835161), CSU-07-WP-CV1 (EU835160), CSU-07-WP-AA25 (EU835159), CSU-07-WP-GY6 (EU835156), poreklom iz Australije iz vinove loze. Izolat EL153 je nakon analize genetičke sličnosti pokazao stepen nukleotidne identičnosti od 85,9% sa sekvencom izolata BX 1.10 (AF 099911), poreklom iz Francuske iz vinove loze, koji je u ispitivanjima poslužio kao referentni izolat. Dok su izolati EL17, EL27, EL29 pokazali 97,7%, a izolat EL199 pokazao je 97,3% nukleotidne identičnosti sa sekvencom izolata BX1.10 (AF 099911).

Upoređivanje rezultata proračuna genetičke sličnosti odabranih sekvenci sa izolatom EL153 i poređenje sa dobijenim rezultatima za ostale ispitivane izolate, ukazuje na moguće postojanje mutacije ili delecije na delu ITS regiona kod izolata EL153, što je rezultiralo slabom amplifikacijom u tom delu genoma tokom PCR reakcije. Sekvenca je iz tog razloga trimovana na 423 bp i upoređivana sa ostalim izolatima. Identičnost nukleotidnih sekvenci izolata EL153 sa referentnim izolatom je 85,9% i ukazuju da se najverovatnije radi o divergentnom izolatu vrste *E. lata*. Obzirom

da su ostale karakteristike izolata EL153 bile tipične za *E. lata* nisu rađene dodatne sekvencione analize ITS regiona genoma ovog izolata.

Najviši stepen nukleotidne identičnosti od 99,7% pokazuju sekvence ispitivanih izolata EL17, EL27, EL29, EL199, sa sekvencom izolata JL744 (JN975359), poreklom iz vinove loze iz Španije, potom sa sekvencama izolata UCD2263MO (HQ288220), poreklom iz vinove loze sorte Šardone iz SAD; zatim UCD 2275MO (288221), poreklom iz vinove loze sorte Kaberne frank iz SAD; CA 38 (E38) (AY462541), poreklom iz predstavnika roda *Vitis* sp. iz SAD; CA31(E31) (AY462540) iz predstavnika roda *Vitis* sp. iz SAD; sa sekvencom izolata 12-38-7EX4.6 (AY662393), poreklom iz vinove loze sorte Kaberne sovinjon sa Novog Zelanda; potom 12-38-7EX3 (AY662392), poreklom iz vinove loze Kaberne sovinjon sa Novog Zelanda; kao i sa sekvencom izolata WRPG004 (DQ006939), poreklom iz kajsije iz Australije. Takođe, stepen nukleotidne identičnosti od 99,7% gore pomenuti izolati pokazali su sa sekvencama izolata 12-38-7EX4.6 (AY662393), 12-38-7EX3 (AY662392), poreklom sa Novog Zelanda iz vinove loze. Ispitivani izolati pokazali su 99,7% nukleotidne identičnosti sa sekvencama izolata WRPG004 (DQ006939), poreklom iz Australije iz kajsije. Dalje, izolati EL17, EL27, EL29 i EL199 su pokazali 99,7% nukleotidne identičnosti sa sekvencom izolata PD0603205386 (GU071110), poreklom iz Holandije iz ribizle (*Ribes rubrum*). Najviši stepen nukleotidne identičnosti od 100% pokazao je izolat EL199 a izolati EL17, EL27 i EL29 su pokazali 99,5% nukleotidne identičnosti sa sekvencama izolata CSU-07-WP-VT12 (EU835166), CSU-07-WP-DO5 (EU835163), CSU-07-WP-DO3 (EU835162), CSU-07-WP-CV9 (EU835161), CSU-07-WP-CV1 (EU835160), CSU-07-WP-AA25 (EU835159), CSU-07-WP-GY6 (EU835156), poreklom iz Australije iz vinove loze. Prema tome, analizom nukleotidnih sekvenci različitih delova genoma utvrđeno je da odabrani izolati pripadaju vrsti *E. lata*.

Na osnovu analize sekvenci ITS rDNK regiona, ispitivani izolati EL17, EL27, EL29, EL199 pokazali su izraženu uniformnost, pri čemu svi izolati imaju 99,7%. Analizom nukleotidnih sekvenci različitih delova genoma utvrđeno je da odabrani izolati pripadaju vrsti *E. lata*.

Molekularna identifikacija odabranih izolata obavljena BLAST analizom sekvenci produkata sva 3 gena pojedinačno, pokazala je visok stepen nukleotidne

identičnosti sa sekvencama odgovarajućih izolata *E. lata* dostupnim u GenBank bazi podataka.

Genetička sličnost izolata EL27, identifikovanog kao *E. lata* sa izolatima iz roda *Eutypa*, ispitivana je analizom sekvenci tri različita dela genoma (ITS regiona rDNA, gena β -tubulin i DNK zavisne RNK polimeraze (RPB2) gena). Na osnovu sekvenci ITS regiona ispitivani izolat pokazuje od 87,9 do 99,7% nukleotidne identičnosti sa izolatima različitih vrsta roda *Eutypa*.

Najviši nivo homologije od 99,7% ispitivani izolat EL27 pokazao je sa osam sekvenci izolata JL 744 (JN975359) poreklom iz Španije, izolovanim iz vinove loze, UCD2263MO (HQ288220) UCD2275MO (HQ288221), poreklom iz SAD, iz vinove loze, CA38 (AY462541), CA31 (AY462540), poreklom iz SAD, izolovanih iz nepoznate vrste iz roda *Vitis*, 12-38-7EX4.6 (AY662393), 12-38-7EX3 (AY662392), poreklom iz Holandije, iz vinove loze, WRP004 (DQ006939), poreklom iz Australije izolovanim iz kajsije. Isto tako, izolat EL27 pokazuje nukleotidnu identičnost od 96,8% sa izolatima vrste *E. lata* var. *aceri* CBS 290.87 (HM164736) izolovanim iz javora, poreklom iz Švajcarske i vrstom *E. petrakii* var. *petrakii* CBS244.87 (HM164735) iz trnjine, poreklom iz Švajcarske, a sa izolatom *E. laevata* CBS 291.87 (HM164737) iz vrbe, poreklom iz Švajcarske, pokazuje nukleotidnu identičnost od 96,6%.

Na osnovu analize sekvenci proteinskog dela β -tubulin gena ispitivani izolat EL27 pokazao je 99,1% nukleotidne identičnosti sa četiri sekvence vrste *E. lata* DCA200 (HM164752) iz javora, DRUSS100 (HM164759) izolovanim iz badema, UCD 401MO (HM164706), UCD777ST (HM164743) iz vinove loze, poreklom iz SAD. Izolati EL151, EL154, EL155 i EL157 pokazali su najviši stepen nukleotidne identičnosti od 100% sa sekvencama sledećih izolata: 1908021 (HM164746), poreklom iz Švajcarske iz bršljana (*Hedera helix*), 3802 (HM164745), poreklom iz Švajcarske iz krušine (*Frangula alnus*), D-Hb-2002 (AY684215), potom sa sekvencama izolata poreklom iz SAD D-Jam-100 (AY684213) iz trešnje (*Prunus avium*), DCA700 (HM164748) iz vinove loze, DCHR200 (HM164751) iz vrbe (*Salix* sp.), DJAM100 (HM164753) iz trešnje (*Prunus avium*), DPEAR200 (HM164757) iz kruške (*Pyrus communis*), DSA400 (HM164761) iz vrbe (*Salix* sp.), EAMS100 (HM164764) iz vinove loze, OLEA3 (HM164767) iz oleandra (*Nerium oleander*), UCD 379ST (HM164739) iz vinove loze, UCD715SJ (HM164741) iz vinove loze, UCD732SJ

(HM164742) iz vinove loze, WILLOWC (HM164765) iz vrbe (*Salix* sp.). Dok izolati EL27 i EL30 pokazuju stepen nukleotidne identičnosti od 99,10% sa sekvencama sledećih izolata poreklom iz SAD DRUSS100 (HM164759) iz badema (*Prunus dulcis*), UCD401MO (HM164706) iz vinove loze, UCD777ST (HM164743) iz vinove loze i DCA200 (HM164752) iz krupnolisnog javora (*Acer macrophyllum*).

Na osnovu analize sekvenci DNK zavisne RNK polimeraze (RPB2) gena, ispitivani izolat EL27 pokazao je 99,2% nukleotidne identičnosti sa dve sekvence vrste *E. lata* UCD 379 ST(HM164773) i UCD 795ST (HM164744), izolovanih iz vinove loze, poreklom iz SAD. Pomoću BLAST analize utvrđena je sličnost od 99,8% izolata EL156 i EL158 sa razlikom od dva nukleotida, sa izolatima poreklom iz SAD iz vinove loze UCD401MO (HM164774), DCA700 (HM164782), UCD715SJ (HM164775) i OLEA3 (HM164801) iz oleandra (*Nerium oleander*). Izolat EL150 pokazao je 99,8% sličnosti sa izolatima poreklom iz SAD iz vinove loze UCD379ST (HM164773), UCD795ST (HM164778). Najviši stepen nukleotidne identičnosti od 100% pokazuju sekvence izolata EL156 i EL158 sa sekvencama izolata poreklom iz SAD iz vinove loze UCD379ST (HM164773) i UCD795ST (HM164778). Pomoću BLAST analize utvrđena je sličnost od 99,8% izolata EL156 i EL158 sa razlikom od dva nukleotida, sa izolatima poreklom iz SAD iz vinove loze UCD401MO (HM164774), DCA700 (HM164782), UCD715SJ (HM164775) i OLEA3 (HM164801) iz oleandra (*Nerium oleander*).

Dobijeni rezultati analize nukleotidnih sekvenci ITS regiona rDNK, proteinskog dela gena β -tubulina i DNK zavisne RNK polimeraze (RPB2) gena ukazuju na postojanje male genetičke varijacije među proučavanim izolatima iz Srbije. Nukleotidni diverzitet kod ispitivanih sekvenci bio je ujednačen, sem izolata EL153 koji je imao nešto niži stepen nukleotidne sličnosti. Procenat sličnosti između sekvenci, kretao se, redom, u granicama 85,9-99,7%, poređenjem sa sekvencama izolata *E. lata* iz različitih domaćina i geografskog porekla, deponovanih u GenBank bazi podataka. Slična zapažanja po pitanju postojanja genetičkog diverziteta gljive *E. lata* nakon poređenja nukleotidnih sekvenci različitih delova genoma DNK zabeležena su u literaturi (Catal et al., 2007; Trouillas and Gubler, 2010; Wenneker et al., 2011; Trouillas et al., 2010, 2014).

Tako su **Trouillas and Gubler (2010)** analizirajući sekvence 35 izolata *E. lata*, korišćenjem ITS rDNK regiona, proteinskog dela β -tubulin gena i DNK zavisne RNK polimeraze (RPB2) gena, zaključili da je sličnost između sekvenci proučavanih izolata veća od 95%, poređenjem sa sekvencama izolata *E. lata* različitog geografskog porekla i iz različitih domaćina, što ukazuje na izvestan interspecifični genetski diverzitet izolata *E. lata* poreklom iz Kalifornije.

Isto tako, **Wenneker et al. (2011)** su ustanovili poređenjem sekvenci ITS regiona izolata *E. lata* izolovanih iz ribizle i ogrozda, da ispoljavaju male genetske varijacije u okviru vrste. Pa tako položaj izolata *E. lata* CBS 124244 izolovanim iz ribizle, poreklom iz Holandije je blisko povezan sa izolatom *E. lata* var. *aceri* CBS 290.87 iz javora, poreklom iz Švajcarske. To znači da postoje veoma male razlike u ITS sekvencama izolata *E. lata* izolovanih iz različitih gajenih i divljih domaćina iz udaljenih delova Evrope. Drugim rečima, izolati *E. lata* iz različitih domaćina su blisko povezani, što ukazuje da ova vrsta nema specifičan krug domaćina (**Wenneker et al., 2011; Travadon et al., 2013; Pitt et al., 2013**).

Catal et al. (2007) su potvrdili genetsku varijabilnost ITS regiona izolata *E. lata* u tri različita regiona u SAD, što se slaže sa navodima **Péros et al. (1996, 1997)**. Genetska varijabilnost je ustanovljena kod izolata iz istog vinograda pa čak i kod izolata koji potiču iz iste strome (**Péros and Berger, 1999; Péros et al., 1997**). *E. lata* izolati pripadaju vrsti sa visokim stepenom genetskog diverziteta, što je potvrđeno od strane mnogih autora, primenom RFLP-a, RAPD markera, vegetativne kompatibilnosti i testovima patogenosti (**Péros and Berger, 1999, 2003; Cortesi and Milgroom, 2001**).

Trouillas et al. (2010) su uspeli da, kombinacijom morfoloških karakteristika, sekvenciranjem i filogenetskom analizom ITS regiona i proteinskog gena za β -tubulin, identifikuju 11 novih vrsta iz familije Diatrypaceae, izolovanih iz vinove loze u Kaliforniji. Identifikacija ovih vrsta se do nedavno bazirala samo na morfologiji anamorfa i teleomorfa. Međutim, nedostatak klasičnih metoda je taj što je često nemoguće obezbediti autentične izolate, kao i nedostatak referentnih izolata u kolekcijama (**Trouillas et al., 2010**). Veliki broj vrsta iz familije Diatrypaceae na PDA podlozi formiraju belu pamučnu miceliju, veoma sličnu miceliji izolata *E. lata*, što dovodi do pogrešne identifikacije. Sve to otežava identifikaciju novih vrsta iz familije

Diatrypaceae i odvajanje od gljive *E. lata*. Zahvaljujući sekvenciranju i filogenetskoj analizi umnogome je olakšana identifikacija ovih gljiva (Trouillas et al., 2014).

6.4.1. Molekularna karakterizacija *Eutypa lata* poreklom iz vinove loze

Filogenetska analiza sekvenci rDNK poslednjih godina ima ogroman uticaj na taksonomiju i sistematiku gljiva (Acero et al., 2004; Rolshausen et al., 2006, 2014; Slippers et al., 2013). Tako su Acero et al. (2004) proučavali filogenetsku povezanost 53 izolata iz familije Diatrypaceae poređenjem sekvenci ITS regiona. Proučavani izolati predstavljaju 35 vrsta iz pet (*Diatrype*, *Diatrypella*, *Cryptosphaeria*, *Eutypa* i *Eutypella*) od 9 rodova familije Diatrypaceae. Ovi autori su po prvi put koristili filogenetsku analizu za klasifikaciju ove familije gljiva. Acero et al. (2004) nakon poređenja svojih rezultata sa klasifikacijama gljiva zasnovanih na morfološkim karakteristikama, ustanovili su da postoje izvesne razlike. Naime, ni jedan od 5 ispitivanih rodova (*Diatrype*, *Diatrypella*, *Cryptosphaeria*, *Eutypa* i *Eutypella*) nisu monofiletski. Predstavnici roda *Eutypa* su se rasporedili u 2 klastera, jedan obuhvata *E. lata* i srodne vrste (*E. armeniacae*, *E. laevata*, *E. petrakii*), a u drugi klaster su smešteni preostali predstavnici ovog roda (Acero et al., 2004). Takođe, filogenetskom analizom koja je rekonstruisana na osnovu sekvenci ITS rDNK regiona i proteinskog gena za β -tubulin Rolshausen et al. (2006) nisu u potpunosti potvrdili nomenklaturu gljiva koju je dao Rappaz (1987) na osnovu morfoloških karakteristika. Naime, analizirajući rezultate dobijene primenom gore navedenih sekvenci, 4 vrste roda *Eutypa* (*E. lata*, *E. armeniacae*, *E. petrakii* var. *petrakii* i *E. laevata*) su grupisane u 1 klaster. Analizom filogenetskog stabla Rolshausen et al. (2006) ustanovili su da su se dva ispitivana izolata *E. petrakii* var. *petrakii* odvojila od monofiletskih izolata *E. lata*. Takođe, formirao se monofiletski klaster u kome su se smestila većina ispitivanih izolata *E. lata*, kao i 2 izolata *E. armeniacae*, koji su u literaturi opsani kao morfološki identični. Međutim, izolati *E. lata* var. *aceri* pokazuju genetsku divergenciju u poređenju sa klasterom u kome su smešteni izolati *E. lata* i *E. armeniacae* (Rolshausen et al., 2006). Još je Rappaz (1987) istakao izvesne morfološke razlike izolata *E. lata* var. *aceri* i *E. lata* (nešto kraće konidije), ali ih nije odvojio kao vrste. Pošto su dva proučavana izolata *E. lata* var. *aceri* jedino izolovana iz javora, ne može se napraviti zabuna sa izolatima *E.*

lata (Rolshausen et al., 2006). Takođe, ovi autori su ustanovili da 2 izolata *E. armeniaca* i 1 izolat *E. lata*, nakon filogenetske analize imaju identične sekvence, i time podržali hipotezu mnogih autora (Carter, 1994) da se radi o sinonimu za istu vrstu (Acero et al., 2004). Naime, homologija sekvenci u delu ITS regiona u okviru vrsta *E. armeniaca* i *E. lata* bila je preko 99%, čime je potvrđena morfološka identičnost ove dve vrste (Rolshausen et al., 2006).

Rolshausen et al. (2014) su izolovali gljive *E. laevata* i druge vrste *Eutypa* sp. iz biljaka vinove loze u severoistočnom delu SAD i jugoistočnoj Kanadi. Na osnovu morfoloških i patogenih osobina i filogenetskom analizom ovi autori su ustanovili da je i gljiva *E. laevata* jedan od uzročnika odumiranja čokota vinove loze.

ITS deo genoma predložen je za primarni marker u identifikaciji gljiva iz praktičnih razloga, jer trenutno najveći broj sekvenci različitih vrsta gljiva obrađen je samo na osnovu ovog dela genoma. On se inače smatra „barcoding” delom za identifikaciju većine ili skoro svih vrsta gljiva. Takođe, postoje drugi geni čije se sekvence mogu koristiti za identifikaciju gljiva, posebno geni za β -tubulin i DNK zavisnu RNK polimerazu (RPB2) (Trouillas and Gubler, 2010; Rolshausen et al., 2014). Isti autori za potpuniju analizu predlažu uključivanje drugih gena i morfoloških metoda radi tačne determinacije gljiva.

Primenom filogenetske analize nukleotidnih sekvenci različitih delova genoma, kao što su ITS region, proteinski nuklearni deo gena β -tubulin i DNK zavisna RNK polimeraza (RPB2), u ovom radu potvrđeno je da svi proučavani izolati pripadaju vrsti *E. lata*. Takođe, na osnovu ovih delova genoma rekonstruisana su 3 odvojena filogenetska stabla.

Filogenetska analiza, rekonstruisana na osnovu sekvenci ITS regiona rDNK i odgovarajućih odabranih izolata *E. lata*, kao i sekvenci izolata dobijenih u ovom radu a identifikovanih kao *E. lata* (EL17, EL27, EL29, EL153 i EL199) iz Srbije, smešta ih unutar klastera *E. lata* zajedno sa drugim izolatima *E. lata*.

Filogenetsko stablo jasno pokazuje grupisanje izolata iz Srbije sa ostalim izolatima *E. lata* iz ostalih delova sveta u jedan klaster (Slika 39). Utvrđeno je da su proučavani izolati EL17, EL27, EL29, EL153 i EL199 smešteni unutar petog klastera *E. lata*. U grupi sa izolatom BX1.10 grupisano je 4 izolata (EL17, EL27, EL29 i EL153). Dok se izolat EL199 nalazi u grupi sa većinom ostalih izolata *E. lata* iz NCBI. Ostali

patogeni (*Eutypa petrakii*, *E. lata* var. *aceri*, *E. laevata* i *Eutypella vitis*), koji su uzeti radi poređenja, nalaze se van klastera izolata *E. lata*. Filogenetskom analizom *E. lata* izolata izolovanih iz vinove loze vidi se mala genetska varijabilnost unutar vrste. Položaj izolata CBS 208.87 (DQ006927), koji je izolovan iz lipe (*Tilia* sp.) poreklom iz Švajcarske, bilisko je povezan sa našim izolatom EL199 iz vinove loze. Rezultati iz ovog rada ukazuju da postoji mala varijabilnost u ITS sekvencama izolata *E. lata* poreklom iz Srbije nakon poređenja sa sekvencama izolata *E. lata* iz NCBI baze podataka, izolovanih iz različitih gajenih i divljih biljnih vrsta, poreklom iz različitih delova sveta. Ovo je potpomognuto činjenicom da *E. lata* ima veoma veliki krug domaćina (Péros et al., 1997, 1999; Péros and Berger, 1999; Catal et al., 2007). Zbog toga lako dolazi do unakrsnih infekcija izolatima iz različitih biljnih domaćina, posebno između osetljivih vrsta kao što je vinova loza (Trouillas et al., 2010; Wenneker et al., 2011; Travadon et al., 2012; Pitt et al., 2013; Rolshausen et al., 2014).

Analizom filogenetskog stabla rekonstruisanog na osnovu sekvenci proteinskog nuklearnog gena β -tubulin, odabrani izolati (EL27, EL30, EL151, EL154, EL155 i EL157) grupisali su se prema očekivanoj evolutivnoj srodnosti. Filogenetsko stablo jasno pokazuje grupisanje izolata iz Srbije sa ostalim izolatima *E. lata* iz ostalih delova sveta u jedan klaster (Slika 40). Četiri izolata (EL151, EL154, EL155 i EL157) grupisani su u grupi sa većinom ostalih izolata *E. lata* iz NCBI i to je podržano visokom bootstrap vrednošću od 99% i od statističkog je značaja. Izolati EL27 i EL30 grupišu se odvojeno od ostalih izolata *E. lata* i to je podržano sa nešto nižom bootstrap vrednošću od 97%. Ostali patogeni (*Eutypa petrakii* var. *petrakii*, *E. lata* var. *aceri* i *E. laevata*), koji su uzeti radi poređenja, nalaze se van klastera izolata *E. lata*. Kao i kod ITS rDNK regiona i ovde postoji mala varijabilnost u sekvencama regiona gena β -tubulin izolata *E. lata*. Analizom filogenetskog stabla rekonstruisanog na osnovu sekvenci proteinskog nuklearnog gena β -tubulin uočavaju se u okviru klastera *E. lata* u ovom radu 2 grupe izolata *E. lata*, kao i u radovima drugih autora pojavljuje 2 ili više grupa u koje su grupisani izolati *E. lata* (Rolshausen et al., 2006; Trouillas et al., 2011; Rolshausen et al., 2014). Ovo grupisanje nastaje kao posledica primenjenog statističkog metoda u rekonstrukciji evolutivne povezanosti izolata (Rolshausen et al., 2006; Trouillas et al., 2011; Rolshausen et al., 2014).

Trouillas and Gubler (2010) navode da svi proučavani izolati *E. lata*, iz različitih gajenih i domaćina iz prirode, poreklom iz Kalifornije, formiraju monofiletski klaster. Isto tako, u okviru ovog klastera veliki broj izolata *E. lata* smešten je u više grupa. Niska bootstrap vrednost ukazuje da proučavani izolati ne predstavljaju različite vrste, ali ukazuje na genetsku varijabilnost ove gljive (**Trouillas and Gubler, 2010**).

Na osnovu sekvenci regiona gena RPB2 odabarni izolati (EL27, EL150, EL152, EL156 i EL158) identifikovani su kao *E. lata*. Analizom filogenetskog stabla proučavani izolati grupisali su se u klaster sa ostalim izolatima *E. lata* iz različitih domaćina i geografskog porekla (Slika 41). Ispitivani izolati EL27 i EL152 posebno su grupisani u okviru jedne od uočenih grupa klastera *E. lata* koja je podržana visokom bootstrap vrednošću od 93% i od statističkog je značaja. Izolati EL156, EL150 i EL158 se nalaze unutar grupe *E. lata* iz NCBI i to je podržano sa nešto nižom bootstrap vrednošću od 87%. Ostali patogeni (*E. lata* var. *aceri* i *E. laevata*), koji su uzeti radi poređenja, nalaze se van klastera izolata *E. lata*. Nakon analize dobijenih rezultata uočava se postojanje manje varijabilnosti proučavanih RPB2 sekvenci.

Trouillas et al. (2010), korišćenjem filogenetske analize, primenom ITS1 rDNK regiona i proteinskog gena za β -tubulin, jasno odvajaju vrstu *E. lata* od drugih vrsta iz familije Diatrypaceae izolovanih iz vinove loze. U okviru klastera *E. lata* postoje male varijabilnosti kod proučavanih ITS sekvenci. Ovde nema jasnog odvajanja na manje podjedinice, koje bi mogle biti u vezi sa poreklom ispitivanih izolata (**Wenneker et al., 2011**). Filogenetska analiza izolata *E. lata* pokazuje da postoje male genetske varijacije u okviru vrste, izolovanih iz različitih gajenih i divljih biljnih vrsta i različitog geografskog porekla. Stepem filogenetskog diverziteta i interspecifičnih grupa nisu konzistentni kod različitih DNK filogeneza. Štaviše, podgrupe nisu u korelaciji sa poreklom izolata, što se slaže sa rezultatima iz ove disertacije. Jedino moguće objašnjenje je da su slučajno uparivanje i protok gena širenjem askospora dovoljni da spreče diferencijaciju lokalnih populacija. Pored toga, blizina domaćina iz prirode i gajenih biljaka za gljivu *E. lata* mogu imati ulogu u formiranju populacije koja omogućava neograničen protok gena (**Trouillas and Gubler, 2010; Trouillas et al., 2010; Rolshausen et al., 2014**). Kod vrste *E. lata*, broj raspoloživih informacija u GenBank bazi podataka je još uvek mali, tako da su neophodna dalja istraživanja u ovom pravcu (**Trouillas et al., 2010; Trouillas and Gubler, 2010**).

Pojedinačnim poređenjem i filogenetskim analizama 3 pojedinačna gena, utvrđeno je da se dobijaju podjednaki rezultati korišćenjem ITS rDNK regiona, gena β -tubulin i DNK zavisne RNK polimeraze (RPB2) (Trouillas and Gubler, 2010). Isti autori uočavaju da između gena β -tubulin i DNK zavisne RNK polimeraze (RPB2) postoje neznatne razlike tako da autori sugerišu da je neophodno koristiti oba gena za potpunu identifikaciju *E. lata*.

Dobijeni rezultati u ovom radu primenom molekularne detekcije, PCR-RFLP, sekvenciranjem i filogenetskom analizom DNK sekvenci odgovarajućih delova genoma, pružile su mogućnost da se preciznije odvoji vrsta *E. lata* od ostalih vrsta iz roda *Eutypa*.

6.5. Osetljivost različitih sorti vinove loze prema proučavanim izolatima *Eutypa lata*

Vrsta *E. lata* je jedna od značajnijih fitopatogenih gljiva koja ugrožava zasade vinove loze, prouzrokujući značajne ekonomske štete (Pitt et al., 2013; Travadon et al., 2013). Prema Munkvold et al. (1994) odumiranje čokota vinove loze je veoma opasna bolest vinove loze jer ne postoji efikasna hemijska zaštita, pa nakon napredovanja ove bolesti dolazi do smanjenja prinosa i odumiranja delova ili celih zaraženih čokota, što dovodi do velikih gubitaka u proizvodnji (Rolshausen et al., 2015).

U svetu postoji ograničen broj radova o testiranju osetljivosti različitih sorti vinove loze prema ovoj bolesti. Ranija istraživanja osetljivost različitih sorti vinove loze zasnivala su se na istraživanjima na kajsiji koja je veoma osetljiva na gljivu *E. lata* i veoma malo se znalo o kolonizaciji tkiva vinove loze od strane ove gljive (Carter et al., 1985; Munkvold, 2001). Iz tih razloga su Péros and Berger (1994) u svojim ogledima ispitivali agresivnost 12 izolata *E. lata* i osetljivost 15 sorti vinove loze.

Potom su Sosnowski et al. (2007a) proučavali virulentnost 28 izolata *E. lata* izolovanih iz vinove loze, poreklom iz Australije i osetljivost 3 sorte vinove loze Kaberne sovinjon, Grenaš i Merlo. Travadon et al. (2013) su pratili osetljivost 7 komercijalnih sorti vinove loze (Kaberne frank, Kaberne sovinjon, Šardone, Merlo, Rizling, Širaz i Afuz ali) kao i osetljivost interspecifičnog hibrida *Vitis labrusca* sorta Concord. Za inokulaciju su koristili jednogodišnje ukorenjene reznice u fazi mirovanja.

Nažalost, trenutno u Srbiji ne postoje razvijeni programi selekcije vinove loze na otpornost prema bolestima. Jedan od doprinosa ove disertacije je ispitivanje reakcije domaćih komercijalnih sorti, kao i sorti iz okruženja, na osetljivost prema *E. lata* u uslovima veštačke inokulacije u cilju preventive prema prouzrokovaču odumiranja čokota vinove loze. U uslovima eksperimenta svi ispitivani izolati uspeli su da izazovu tipične simptome na ispitivanim sortama vinove loze. U ovim istraživanjima korišćene su 2 metode i to: inokulacija neukorenjenih reznica vinove loze i inokulacija ukorenjenih reznica vinove loze.

Inokulacija neukorenjenih reznica vinove loze.

Cilj ovih ispitivanja je bio da se na osnovu pojave simptoma na lastarima inokulisanih neukorenjenih reznica vinove loze odredi virulentnost izolata, odnosno, osetljivost različitih sorti vinove loze prema njima, obavljenom po metodi **Pérosa and Bergera (1994)**. Iz tog razloga u ogled je bilo uključeno 27 sorti vinove loze. Poređenje dobijenih simptoma iz ogleda sa simptomima nastalih putem prirodnih infekcija u Srbiji, kao i sa opisima ove pojave iz literature, ukazuje na njihovu izuzetnu sličnost u izgledu i dinamici razvoja. Kako su u testovima patogenosti na vinovoj lozi korišćeni samo prethodno okarakterisani izolati *E. lata*, jasno je dokazano da je ova vrsta sposobna da zarazi neukorenjene reznice vinove loze i na njima izazove pojavu simptoma karakterističnih za odumiranje čokota vinove loze.

Proučavani izolati *E. lata* su se pokazali najvirulentnijim na sortama vinove loze Afuz ali, Radmilovački muskat, Opuzenska rana, Beogradska besemena, Kaberne sovinjon, Italijanski rizling, Negotinski rubin, Sovinjon beli, Gudurički klon. Sa druge strane sorte Tamnjanika, Drenak i Prokupac ispoljive u statistički veoma značajnu otpornost na ispitivane izolate. Na inokulisanim reznicama svih proučavanih sorti vinove loze, najmanje agresivnim pokazali su se izolati EL155, EL157, EL150, EL156, dok su najvirulentniji bili izolati EL17, EL27, EL29, EL30, 8F i BX1.10. **Péros and Berger (1994)**, analizom procenta biljaka sa simptomima na lastarima u prvom i drugom vegetacionom ciklusu, zaključuju da 8 od 12 ispitivanih izolata prouzrokuju pojavu simptoma na 37 do 72% testiranih reznica vinove loze. U prvom vegetacionom ciklusu izolat BX1.10 je izazvao simptome na svim testiranim reznicama, dok je izolat BX1-2 na samo 50% reznica prouzrokovao pojavu simptoma (**Péros and Berger, 1994**). Izolati VL11-4, VL11-5 i AM14 u prvom vegetacionom ciklusu su izazvali

simptome, dok u drugom vegetacionom ciklusu nije došlo do pojave simptoma na testiranim reznicama vinove loze (**Péros and Berger, 1994**). Četiri izolata nisu izazvala simptome tipične za odumiranje čokota vinove loze, što autori objašnjavaju činjenicama da ovi izolati potiču iz kajsije i da su čuvani u kolekciji 15-20 godina, pa su verovatno izgubili sposobnost stvaranja toksina (**Péros and Berger, 1994**).

Péros and Berger (1994) su u istraživanjima osetljivosti sorti pratili pojavu simptoma 5, 7 i 10 nedelja nakon inokulacije. Došli su do zaključka da je procenat pojave simptoma u periodu od pete do sedme nedelja porastao za 70% a da je u periodu od sedme do desete nedelje ostao isti. Pojava simptoma na ispitivanim sortama zavisila je od agresivnosti izolata. Izolati imaju različitu sposobnost da stvaraju toksične materije i da koloniziraju drvo. Sorte su takođe različito osetljive prema toksinu kojeg gljive proizvode i invaziji gljiva (**Rumbos, 1985; Travadon et al., 2013**). Mnoge inokulisane reznice koje su ispoljile simptome u prvoj godini, nisu ispoljile simptome u drugoj godini. Ovo se objašnjava činjenicom da količina toksičnih proizvoda može da varira i da se razblažuje u zavisnosti od razvijenosti ili porasta lastara (**Péros and Berger, 1994, 1999, 2003**). Takođe, ova pojava može da se ilustruje varijacijom intenziteta posmatranih simptoma kod nekih sorti, sposobnošću da nakon pojave simptoma na lastarima počinju da rastu normalni lastari koje prekrivaju deformisane lastare (**Péros and Berger, 1994, 1999, 2003; Sosnowski et al., 2007a i b; Travadon et al., 2013; Pitt et al., 2013**).

Veštačke inokulacije vinove loze izolatima *E. lata* dale su preliminarne informacije o različitoj virulentnosti ispitivanih izolata, i različitoj osetljivosti 27 sorti vinove loze. Posmatrajući agresivnost proučavanih izolata *E. lata*, može se zaključiti da su ispoljene znatne razlike između izolata, a takođe je ispoljen i različiti stepen osetljivosti ispitivanih sorti vinove loze. Naime, poređenjem reakcije 27 sorti vinove loze na veštačke zaraze sa *E. lata* ustanovljeno je da postoje statistički veoma značajne razlike u reakciji inokulisanih biljaka vinove loze, što ukazuje na postojanje razlike u nivou osetljivosti. **Péros and Berger (1994)** u svojim ispitivanjima ukazuju da su testirane sorte vinove loze ispoljile različitu osetljivost prema toksinu gljive *E. lata* i invaziji iste, što se odražava na intenzitet pojave simptoma na lastarima. **Péros and Berger (1994, 1999, 2003)** su utvrdili da od 15 testiranih sorti najosetljivije sorte su

Kaberne sovinjon, Ugni blanc i Šasla. Nešto niži stepen osetljivosti je ispoljila sorta Merlo.

Sosnowski et al. (2007a) su, takođe, došli do zaključka da izolati imaju različitu sposobnost da izazovu simptome na lastarima zaraženih biljaka vinove loze. Naime, nakon 20 meseci na sori Grenaš intenzitet pojave simptoma je mnogo viši nego na sortama Kaberne sovinjon i Merlo. Ovi autori razlike u ispoljenoj osetljivosti sorti Kaberne sovinjon i Merlo u odnosu na rezultate koje su dobili **Péros and Berger (1994)** objašnjavaju činjenicom da su za svoj eksperiment koristili ukorenjene reznice vinove loze stare 18 meseci. Sa druge strane, **Péros and Berger (1994)** su za svoj ogled koristili reznice odsecane sa jednogodišnjih lastara vinove loze, u fazi mirovanja. Takođe, **Travadon et al. (2013)** su, u svojim ogledima, ustanovili da je sorta Afuz ali ispoljila visok stepen osetljivosti prema ispitivanim izolatima *E. lata*. Isto tako, nije bilo značajne razlike u ispoljenoj osetljivosti između sorti Kaberne sovinjon i Merlo.

Inokulacija ukorenjenih reznica vinove loze.

Primenom metode prema **Sosnowski et al. (2007a)** u uslovima staklenika, došlo je do pojave simptoma odumiranja na ukorenjenim reznicama vinove loze nakon 8 i 27 meseci od inokulacije. Dobijeni rezultati potvrđuju rezultate koje su dobili **Péros and Berger (1994)** da izolati *E. lata* imaju različitu sposobnost da izazivaju simptome na lastarima vinove loze. U ovom radu 8 meseci nakon inokulacije, izolat EL157, od 6 ispitivanih sorti, jedino je izazvao simptome na lastarima sorte Kaberne sovinjon. Nakon 27 meseci, kada je vršena druga procena simptoma, svi ispitivani izolati su na 6 ispitivanih sorti izazvali simptome na ovim biljnim organima. Kao i u eksperimentu sa neukorenjenim reznicama vinove loze, tako i u ovom ogledu najagresivniji izolati su bili EL17, EL27, EL29, EL30, 8F i BX1.10. Takođe, najveći stepen osetljivosti prema proučavanim izolatima *E. lata* ispoljila je sorta Rkaciteli, dok se sorta Prokupac pokazala otpornijom.

Toksični produkti metabolizma gljive *E. lata* koji se transportuju ksilemom su odgovorni za izazivanje simptoma. Međutim, pojava simptoma na lastarima koji se razvijaju ispod mesta inokulacije ukazuju da se takvi produkti metabolizma mogu transportovati u oba pravca i da micelija gljive mnogo brže kolonizira drvo ispod tačke inokulacije nego što se do sada mislilo, što se slaže sa navodima **Sosnowski et al. (2007a)**. To bi značilo da odstranjivanjem obolelog dela čokota ne uspevamo da

skinemo kompletno obolelo tkivo, i vrlo često se dešava da izrastu novi lastari sa simptomima ove bolesti (**Sosnowski et al., 2007a; Pitt et al., 2013**).

Mahony et al. (2005) navode da toksični metaboliti gljive *E. lata* utiču na razaranje vaskularne strukture i inhibiraju transport hranljivih materija, pre nego da se translociraju u simptomatičnom tkivu. Međutim, pojava nekroze na inokulisanim biljkama ispod mesta inokulacije, kao što se videlo u našim ogledima, ne podržava ovu teoriju. Inokulum micelije na nezreloj vinovoj lozi u stakleniku može doprineti bržoj pojavi simptoma na lastarima nego u vinogradima.

U našem ogledu, za razliku od rezultata koje su prezentovali **Sosnowski et al. (2007a)**, u većem stepenu su se pojavljivali simptomi na lastarima nakon 8 i 27 meseci. Ova pojava može da se objasni činjenicom da je drugo očitavanje rezultata vršeno 7 meseci kasnije nego što su radili **Sosnowski et al. (2007a)**.

Prema **Sosnowski et al. (2007a)** pojavljivanje simptoma na lastarima inokulisanih reznica vinove loze nije u korelaciji sa pojavom nekroze, što se slaže sa našim rezultatima. Nekroza dela tkiva oko mesta inokulacije može se pojaviti zbog stvaranja fenolne smeše kao reakcije biljke prema patogenu u blizini mesta infekcije (**Sosnowski et al., 2007a**). Takođe, kontrolisano povređivanje biljaka i inokulacija sa komadićima PDA podloge mogu da izazovu izvesnu nekrozu, kao i inokulacija biljaka vinove loze drugim vrstama kao što su *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Botryosphaeria* sp., *Libertella* sp., *E. leptoplaca*, *E. laevata*, *Eutypella* sp., *Fomitiporia* sp. Pojava nekroze delom može biti uzrokovana i drugim faktorima, kao odgovor drveta na povrede. Biohemijske promene mogu da rezultiraju u promeni boje tkiva drveta (**Sosnowski et al., 2007a; Pitt et al., 2013; Travadon et al., 2013**).

Micelija gljive *E. lata* širi se brže na dole nego naviše u lastarima u kontrolisanim uslovima (**Sosnowski et al., 2007a, b**). Što se tiče pravca širenja micelije ove gljive u vinovoj lozi u vinogradima, još uvek nema podataka u literaturi. Ovo može imati uticaja na kontrolu bolesti odstranjivanjem obolelih krakova, zato što se infekcija može širiti sa jednog kraka na drugi. **Sosnowski et al. (2007a, b)** predlažu da se radi kontrole bolesti u vinogradima seče obolelo drvo čokota najmanje 10 cm ispod obolelog tkiva, kako bi se odstranila gljiva iz drveta (**Pitt et al., 2013**).

7. ZAKLJUČAK

Na osnovu višegodišnjih istraživanja sprovedenih u okviru ove doktorske disertacije dobijeni su rezultati iz kojih se može zaključiti sledeće:

- Pregledom vinograda u 14 lokaliteta u Srbiji, u periodu od 2004. do 2012. godine, zabeležena je pojava simptoma odumiranja čokota vinove loze.
- Iz obolelih biljaka izolovano je 47 izolata gljive *Eutypa* sp. Na osnovu morfoloških odlika za nastavak istraživanja odabrano je 14 izolata.
- Veštačka inokulacija neukorenjenih i ukorenjenih reznica vinove loze sorte Kaberne sovinjon u *in vitro* uslovima dovela je do pojave karakterističnih simptoma odumiranja na test biljkama. Svi proučavani izolati prouzrokuju nekrozu tkiva oko mesta inokulacije, hlorozu i deformaciju listova kao i pojavu sitnih, nekrotičnih pega po obodu liski koji vremenom opadaju. Inokulisane reznice zaostaju u porastu dobijajući žbunast izgled sa cik-cak porastom internodija. Iz simptomatičnih biljaka izolovane su kulture gljiva identične sa kulturama dobijenim izolacijom iz prirodno zaraženih čokota vinove loze, čime je dokazana patogena priroda svih proučavanih izolata.
- Makroskopskim pregledom kultura na PDA podlozi uočeno je da proučavani izolati *Eutypa* sp. razvijaju ujednačene kolonije.
- Kod svih proučavanih izolata konidije se formiraju u piknidima iz kojih se izlučuje sluzasta masa (matriks), koja je krem do bledo narandžaste boje.
- Od odagajivačkih odlika na razvoj kolonija proučavanih izolata *Eutypa* sp. najznačajniji uticaj imao je sastav podloga. PDA podloga pokazala se najpogodnijom za razvoj proučavanih izolata *Eutypa* sp.
- Nije bilo statistički značajne razlike između ispitivanih izolata *Eutypa* sp. u radialnom porastu na svim testiranim tipovima svetlosti.
- Izolati identifikovani kao *Eutypa* sp. imali su jednoćelijske, glatke, hijalinske, slabo povijene, pri kraju sužene, končaste konidije, 17,82-(32,00)-35,52 μm u dužinu i 1,39-(1,45)-2,74 μm u širinu na PDA podlozi.
- Molekularna karakterizacija proučavanih izolata *Eutypa* sp. obavljena je korišćenjem univerzalnih prajmera ITS1-ITS4. Amplifikovan fragment veličine 574 bp utvrđen je kod svih proučavanih i kontrolnih izolata.

- PCR produkti dobijeni primenom prajmera ITS1-ITS4 tretirani su *AluI* restrikcijom tokom RFLP-PCR analize. Nakon digestije formirane su tri restriktivne trake veličine od oko 100, 200 i 300 bp kod svih proučavanih i referentnih izolata *E. lata*.
- Primenom para prajmera T1/Bt2b, koji omogućuje amplifikaciju proteinskog nuklearnog gena β -tubulin, umnožen je fragment veličine 780 bp kod svih proučavanih i kontrolnih izolata *E. lata*.
- Korišćenjem prajmera RPB2-7F-RPB2-11aR, koji omogućuje amplifikaciju proteinskog nuklearnog gena RPB2, amplifikovan je fragment veličine 820 bp kod svih proučavanih i kontrolnih izolata *E. lata*.
- Molekuarna karakterizacija izolata vršena je korišćenjem specifičnog para prajmera Lata 1-Lata 2.2, koji omogućuje amplifikaciju ITS regiona ribozomalne DNK i 5.8 rRNA (ITS1/ITS2 regiona). Primenom ovih prajmera kod svih proučavanih izolata, kao i referentnih izolata iz međunarodnih kolekcija, umnožen je fragment veličine 385 bp čime je potvrđena pripadnost vrsti *E. lata*.
- Višestrukim poređenjem sekvenci dobijenih sekvenciranjem odgovarajućih delova nukleinske DNK sa dostupnim sekvencama odgovarajućih regiona genoma gljiva u GenBank bazi podataka i proračunom genetičke sličnosti, obavljena je potvrda molekularne identifikacije svih izolata. Na ovaj način potvrđeno je, prvi put u Srbiji, da izolati iz obolelih čokota vinove loze proučeni u ovoj doktorskoj disertaciji pripadaju vrsti *E. lata*.
- Po prvi put u našoj zemlji rekonstruisana su filogenetska stabla izolata *E. lata* poreklom iz Srbije. Na osnovu nukleotidnih sekvenci ITS regiona rDNK, dela gena β -tubulin i nukleotidnih sekvenci gena RPB2 može se tvrditi da proučavani izolati u ovom radu pripadaju vrsti *E. lata*.
- Rezultati ispitivanja u okviru ove disertacije ukazuju na postojanje različitog nivoa osetljivosti proučavanih sorti vinove loze prema vrsti *E. lata*.
- Od testiranih domaćih i inostranih sorti vinove loze, u uslovima postavljenih eksperimenata, može se zaključiti da su najveću otpornost prema proučavanim izolatima ispoljile lokalne sorte Prokupac, Tamnjanika i Drenak, dok su sorte Afuz ali i Radmilovački muskat pokazale veliku osetljivost.

8. LITERATURA

- Acero, F.J., González, V., Sánchez-Ballesteros, J., Rubio, V., Checa, J., Bills, G.F., Salazar, O., Platas, G., Peláez, F.** (2004): Molecular phylogenetic studies on the Diatrypaceae based on rDNA-ITS sequences. *Mycologia* 96:249–259.
- Adam, D.B.** (1938): A progress report on a gummosis (dieback) disease in South Australian apricot trees. *J. Dep. Agric. South Austral.* 42: 14-29.
- Agrios, G. N.** (2005): *Plant pathology*. Fifth edition. Elsevier Academic Press, Burlington, San Diego, London.
- Ainsworth, G.C., Sparrow, F.K., Sussman, A.S.** (1973): *The Fungi: An Advanced Treatise*. Academic Press, New York, USA.
- Avramov, L.** (1991): *Vinogradarstvo*, Nolit, Beograd: 5-7.
- Arsenijević, M.** (1997): *Bakterioze biljaka*. Sprint. Novi Sad
- Belarbi, B. and Mur, G.** (1983): Observations sur la germination des conidies ou stylospores du champignon *Eutypa armeniacae*. *Prog. Agric. Vitic.* 24: 636-637.
- Beccari, O.** (1906): Nelle Foreste di Borneo-Firenze. In: "Bullettino del Laboratorio ed Orto botanico" by Lazzeri, L.. Siena: 40-41.
- Bolay, A. and Moller, W.J.** (1977): *Eutypa armeniacae* Hansf.& Carter, agent d'un grave dépérissement de vignes en production. *Rev Suisse Vitic Arboric Hortic* 9: 241-251.
- Bolay, A., and Carter, M. V.** (1985): Newly recorded hosts of *Eutypa lata* (= *E. armeniacae*) in Australia. *Plant Protection Quartely* 1.
- Bisiach, M.** (1994): Part I. Diseases caused by biotic factors. Fruit and foliar diseases caused by fungi. White rot. In R. C. Pearson, and A.C. Goheen (ed.), *Compendium of grape diseases*, 3rd ed. APS Press. St. Paul, Minnesota: 22-23.
- Bisiach, M., Minervini, G.** (1985): *Libertella blepharis* A.L. Smith e altri funghi associati ad una sindrome atipica della vite. *Vignevini* 12: 31-35.
- Bulit, J and Dubos, B.** (1994): Part I. Diseases caused by biotic factors. Fruit and foliar diseases caused by fungi. Botrytis bunch and blight. In R. C. Pearson, and A.C. Goheen (ed.), *Compendium of grape diseases*, 3rd ed. APS Press. St. Paul, Minnesota: 13-15.
- Camps, C., Kappel, C., Lecomte, P., Léon, C., Gomés, E., Coutos-Thévenot, P., Delrot, S.** (2010): A transcriptomic study of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Cabernet-Sauvignon) interaction with the vascular ascomycete fungus *Eutypa lata*. *Journal of Experimental Botany*, 61: 1719-1737.

Carter, M.V. (1957): *Eutypa armeniaca* Hansf. & Carter, sp. Nov., an airborne vascular pathogen of *Prunus armeniaca* L. in South Australia. Aust. J. Bot. 5: 21-35.

Carter, M.V. (1975): "Dying arm" disease of vines- A world wide problem. Austral. Grape Grower and Winemaker, Dec. 7-8.

Carter, M.V. (1985): Variation in the pathogenicity of *Eutypa lata*. Plant Pathology: 155-156.

Carter, M.V. (1986): The Teleomorph of *Eutypa lata* on Citrus lemon. Australasian Plant Pathology Vol. 15 (2): 46.

Carter, M.V. (1991): Eutypa dieback ("Dying arm") disease of vines-progress towards control. Aust. Grapegrower Winemaker 172: 27-28.

Carter, M.V. (1994): Wood and root diseases caused by fungi. *Eutypa dieback*. In R. C. Pearson, and A.C. Goheen (ed.), Compendium of grape diseases, 3rd ed. APS Press. St. Paul, Minnesota: 32-34.

Carter, M.V. (1995): Eutypa dieback. In: Ogawa, J.M., Zehr, E.I., Bird, G.W., Ritchie, D.F. Uriu, K., Uyemoto, J.K. Eds. Compendium of Stone Fruit Diseases. APS Press, St. Paul, MN, 32-33.

Carter, M.V., and Moller, W.J. (1977): Eutypa canker and dieback of apricots. EPPO Bull. No. 7(1), 85-94.

Carter, M.V., Bolay, A., and Rappaz, F. (1983): An annotated list and bibliography of *Eutypa armeniaca*. Rev. Plant Pathol. 62: 251-258.

Carter, M.V., Bolay, A., English, H. and Rumbos, I. (1985): Variation in the Pathogenicity of *Eutypa lata* (= *E. armeniaca*). Aust. J. Bot., 33: 361-366.

Carter, M.V., English, H. (1994): Long-term storage of *Eutypa lata*, the cause of an important dieback disease of apricot and grapevine. Plant Disease 78: 925.

Castaigne, A. (1907): Prodrôme de la flore belge. Wildeman et Th. Durand. Bruxelles: 238.

Catal, M., Jordan, S.A., Butterworth, S.C. and Schilder, A.M.C. (2007): Detection of *Eutypa lata* and *Eutypella vitis* in Grapevine by Nested Multiplex Polymerase Chain Reaction. Phytopathology 97: 737-747.

Cooke, M.C. (1871): Handbook of British fungi. Macmillan and co., London: 798-800.

Cooke, M.C. and Ellis, J.B. (1894): Some New Jersey fungi. In: "Grevillea" by Williams and Norgate, London: 178-179.

- Cortesi, P. and Milgroom, M.G.** (2001): Outcrossing and diversity of vegetative compatibility types in populations of *Eutypa lata* from grapevines. *Journal of Plant Pathology* 83 (2): 79-86.
- Cuboni, J., Mancini, V.** (1886): *Synopsis mycologiae Venetae secundum matrices. Patavii, Typis Seminarii*: 86, 88, 190, 228, 232, 235, 247, 318.
- Davidson, R.W., Lorenz, R.C.** (1938): Species of *Eutypella* and *Schizoxylon* associated with cankers of maple. *Phytopathology* 28:733-745.
- Day, J.P. and Shattock, R.C.** (1997): Aggressiveness and other factors relating to displacement of populations of *Phytophthora infestans* in England and Wales. *European Journal of Plant Pathology* 103, 379-91.
- Delibašić G., Gajić S., Aćimović S.** (2006a): Gljivična oboljenja drveta vinove loze. *Pesticidi i fitomedicina, Beograd*, vol. 21, br. 2, 93-105.
- Delibašić G., Aćimović S., Gajić S.** (2006b): Identifikacija *Eutypa lata*, parazita vinove loze. *Pesticidi i fitomedicina, Beograd*, vol., 21, br. 3, 193-203.
- DeScenzo, R. A., Engel, S.R., Gomez, G., Jackson, E.L., Munkvod, G.P., Weller, J. and Irelan, N.A.** (1999): Genetic analysis of *Eutypa* strains from California supports the presence of two pathogenic species. *Phytopathology* 89: 884-893.
- Dhingra, O.D., J.B. Sinclair, J.B.** (1995): *Basic Plant Pathology Methods*. CRC Press, Boca Raton, Florida, (F).
- Duduk, B., Ivanović, M., Dukić, N., Botti, S. i Bertaccini, A.** (2003): First report of an Elm Yellows Subgroup 16 SrV-C Phytoplasma Infecting Grapevine in Serbia. *Plant Dis.*, 87: 599.
- Dye, M.H., and Carter, M.V.** (1976): Association of *Eutypa armeniaca* and *Phomopsis viticola* with a dieback disease of grapevines in New Zealand. *Australasian Plant Pathology Society Newsletter* 5, 6-7.
- Ellis, J.B. and Everhart, B.M.** (1892): *The North American Pyrenomycetes*. Newfield, New Jersey: 504, 793.
- English, H. and Davis, J.R.** (1965): *Eutypa armeniaca* in apricot: pathogenesis and induction of xylem soft rot. *Hilgardia* 46, 193-204.
- English, H., Davis, J.R., Ogawa, J.M., and Schick, F.J.** (1983): Variation in *Eutypa armeniaca* and discovery of its ascigerous stage in California's Central Valley. (Abstr.) *Phytopathology* 73, 958.
- Essakhi, S, Mugnai, L, Crous, P.W., Groenewald, J.Z., Surico, G.** (2008): Molecular and phenotypic characterisation of novel *Phaeoacremonium* species isolated from diseased grapevines. *Persoonia* 21: 119-134.

- Epstein, L., Kaur, S., VanderGheynst, J.S.** (2008): *Botryosphaeria*-related dieback and control investigated in noncoastal California grapevines. *California Agriculture* 62: 161-163.
- Feliciano, A.J., Eskalen, A. and Gubler, W.D.** (2004): Differential susceptibility of three grapevine cultivars to *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeoconiella chlamydospora* in California. *Phytopathol. Mediterr.* 43: 66-69.
- Francki, R.I.B., and Crowley, N.C.** (1967): Investigation of suspected grapevine viruses in South Australia. *Australian Journal of Agricultural Research* 18: 461-466.
- Galet, P. and Morton, L.T.** (1994): The Family *Vitaceae* and *Vitis* Speciations. . In R. C. Pearson, and A.C. Goheen (ed.), *Compendium of grape diseases*, 3rd ed. APS Press. St. Paul, Minnesota: 2-3.
- Gajić, S., Trkulja V., Vasić T.** (2008): Pojava *Eutypa lata* (Pers., Fr.) Tul., uzročnika raka i izumiranja čokota („eutipoze“) vinove loze u Srbiji i mogućnost njihovog suzbijanja, *Glasnik zaštite bilja, Zagreb, Hrvatska*, No.6/2008: 78-89.
- Gärtel, W.** (1994): Part I. Diseases caused by biotic factors. Fruit and foliar diseases caused by fungi. Grape root rot. In R. C. Pearson, and A.C. Goheen (ed.), *Compendium of grape diseases*, 3rd ed. APS Press. St. Paul, Minnesota: 40-41.
- Glass, N.L., Donaldson, G.C.** (1995): Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl Environ Microbiol* 61(4): 1323-1330.
- Glawe, D.A., Skotland, C.B., Moller, W.J.** (1982): Isolation and identification of *Eutypa armeniacae* from diseased grapevines in Washington state. *Mycotaxon* 16: 123-132.
- Glawe, D.A., Rogers, J.D.** (1982): Observations on the anamorphs of six species of *Eutypa* and *Eutypella*. *Mycotaxon* 14: 334-346.
- Glawe, D.A., Dilley, M.A., Moller, W.J.** (1983): Isolation and identification of *Eutypa armeniacae* from *Malus domestica* in Washington state. *Mycotaxon*, 18: 315-318.
- Glawe, D.A., and Rogers, J.D.** (1984): Diatrypaceae in the Pacific Northwest. *Mycotaxon* 20: 401-460.
- Glawe, D.A., Jacobs, K.A.** (1987): Taxonomic notes on *Eutypella vitis*, *Cryptosphaeria populina*, and *Diatrype stigme*. *Mycologia* 79: 135-139.
- Goidánich, G.** (1964): *Manuale di patologia vegetale (Volume II)*. Edizione Agricole, Bologna.
- Göumann, E. A.** (1928): *Comparative morphology of fungi*. McGraw-Hill Book Company, Inc.: 277.

Göumann, E. A. (1949): Die Pilze, Grundzüge ihrer Entwicklungsgechichte und Morphologie. Crosby Lockwood & Son, Ltd., London.

Gonsalves, D. (1994): Part I. Diseaes caused by biotic factors. Diseases caused by viruses and viruslike agents. Tomato ringspot virus decline and Tobacco ringspot virus decline.. In R. C. Pearson, and A.C. Goheen (ed.), Compendium of grape diseases, 3rd ed. APS Press. St. Paul, Minnesota: 49-51.

Gramaje, D., Agusti-Brisach, C., Pérez-Sierra, A., Moralejo, E., Olmo, D, Mostert, L., Damm, U., Armengol, J. (2012): Fungal trunk pathogens associated with wood decay of almond trees on Mallorca (Spain). *Persoonia* 28. 1-13.

Grove, W.B. (1892): Fungi from the Antrim coast. In: "The Irish naturalist" by Grove, W.B.. Eason & Son Ltd., Dublin. 142.

Gubler, W.D., Rolshausen, P.E., Trouillas, J.R., Urbez, J.R., Voegel, T. (2005): Grapevine trunk disease in California. <http://www.practicalwinery.com>. SAD.

Hall T.A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleid Acids Symposium Series* 41:95-98.

Halleen, F., Volkmann, A. and Fourie, P. (2001): Incidence of Eutypa-like symptoms in Cabernet Sauvignon vineyards in the greater Stellenbosh area. *Wynboer* 143: 12-14.

Hawksworth, D.L., Kirk, P.M., Sutton B.C., Pegler, D.N. (1995): Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. CAB International, Wallingford, Oxon, UK.

Highet, A., Wicks, T. (1998): The incidence of Eutypa dieback in South Australian vineyards. *Annual Technical Issue - 1998. The Australian Grape Grower and Winemaker* 414:135–136.

Hinds, T.E. (1981): Cryptosphaeria canker and Libertella decay of aspen. *Phytopathology* 71:1137–1145.

Hinds, T.E., Laurent, T.H. (1978): Common aspen diseases found in Alaska. *Plant Dis Rep* 62:972–975.

Ivanišević, D., Jakšić, D. i Korać, N. (2015): Istorijski razvoj vinogradarstva, sortimenta i načina gajenja vinove loze u Srbiji. *Vinogradarski atlas. Republički zavod za statistiku. Beograd*, 8-11.

Ivanović, M., Ivanović, D. (2002): Mikoze i pseudomikoze. *Poljoprivredni fakultet. Beograd*, 191-193.

Ivanović, M., Ivanović, D. (2005a): Eutipoza vinove loze. In "Bolesti voćaka i vinove loze i njihovo suzbijanje" by Ivanović, M. and Ivanović, D.. *Poljoprivredni fakultet. Beograd*, 297-300.

- Ivanović, M., Ivanović, D.** (2005b): Ekskorioza vinove loze. In "Bolesti voćaka i vinove loze i njihovo suzbijanje" by Ivanović, M. and Ivanović, D.. Poljoprivredni fakultet. Beograd, 293-297.
- Ivanović, M., Ivanović, D.** (2005c): Sušenje vinove loze-eska. In "Bolesti voćaka i vinove loze i njihovo suzbijanje" by Ivanović, M. and Ivanović, D.. Poljoprivredni fakultet. Beograd, 324-327.
- Ivanović, M. M., Ivanović, S. M.** (2017): Bolesti voćaka i vinove loze. Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu, 415-428.
- Jimenez-Teja, D., Fernandez-Galan, R., Gonzalez Collado, I.** (2006): Metabolites from *Eutypa* species that are pathogen on grapes. Natural Product Report 23: 108-116.
- Johnson, D.W., and Kuntz, J.E.** (1979): Eutypella canker of maple: Ascospore discharge and dissemination. Phytopathology 69: 130-135.
- Josifović, M.** (1964): Poljoprivredna fitopatologija. Naučna knjiga. Beograd
- Ju, Y.M., Glawe, D.A., Rogers, J.D.** (1991): Conidial germination in *Eutypa armeniaca* and selected other species of *Diatrypaceae*: Implications for the systematics and biology of Diatrypaceous fungi. Mycotaxon, XLI (1): 311-320.
- Jurc, D., Ogris, N., Slippers, B., Stenlid, J.** (2006): First report of Eutypella canker of *Acer pseudoplatanus* in Europe. Plant Pathol 55:577.
- Kassemeyer, H.H.** (1987): Das vorkommen von *Eutypa lata* (Pers.: Fr.) Tul. An winreben in Südbaden. Deutsches Weinbau Jahrbuch, Verlag und Vertrieb, Waldkirch, Germany, pp. 203-208.
- Kouyeas, H., Chitzanidis, A., Pappas, A., and Carter, M.V.** (1976): *Eutypa armeniaca* on apricot and grapevine in Greece. Phytopathologische Zeitschrift 87, 260-263.
- Kouyeas, H.** (1978): *Eutypa armeniaca* on lemon in Greece. Phytopathologische Zeitschrift 91: 235-237.
- Lafon R., and Clerjeau** (1994): Part I. Diseases caused by biotic factors. Fruit and foliar diseases caused by fungi. Downy mildew. In R. C. Pearson, and A.C. Goheen (ed.), Compendium of grape diseases, 3rd ed. APS Press. St. Paul, Minnesota: 11-13.
- Lardner, R., Stummer, B., Sosnowski, M. and Scott, E.** (2005): Molecular identification and detection of *Eutypa lata*. Mycol. Res. 109 (7): 799-808.
- Lecomte, P., Péros, J.P., Blancard, D., Bastien, N., Délye, C.** (2000): PCR Assays That Identify the Grapevine Dieback Fungus *Eutypa lata*. Applied and Environmental Microbiology: 4475-4480.

- Lehoczky, J.** (1994): Part I. Diseases caused by biotic factors. Fruit and foliar diseases caused by fungi. Black dead arm. In R. C. Pearson, and A.C. Goheen (ed.), Compendium of grape diseases, 3rd ed. APS Press. St. Paul, Minnesota: 35.
- Lehoczky, J., Moller, W.I.** (1979): Eutipás rák és tökeelhalás a szőlő Magyarországon most felismert súlyos betegségére. (Eutypa canker and dieback, a newly recognized and serious grapevine disease in Hungary). Kertgazdaság 11(2): 37-52.
- Liu, J.Y, Whelen, S., and Hall, B.D.** (1999): Phylogenetic relationships among ascomycetes: Evidence from an RNA polymerase II subunit. Mol. Biol. Evol. 16(12): 1799-1808.
- Loschiavo, A., Sosnowski, M and Wicks, T.** (2007): Incidence of eutypa dieback in the Adelaide Hills. The Australian&New Zealand Grapegrower&Winemaker, 519: 26-29.
- Luque, J., Martos, S., Aroca, A., Raposo, R. F. Garcia-Figuere, F.** (2009): Symptoms and fungi associated with declining mature grapevine plants in northeast Spain. Journal of Plant Pathology 91(2): 381-390.
- Mahoney, N., Molyneux, R.J., Smith, L.R., Schoch, T.K., Rolshausen, P.E., Gubler, W.D.** (2005): Dying-Arm disease in grapevines: diagnosis of infection with *Eutypa lata* by metabolite analysis. Agricultural and food chemistry, 53: 8148-8155.
- Massee, G., Crossland, C.** (1905): The fungus of Yorkshire. A complete account of the known fungi of the county. A. Brown, London: 224.
- McKemy, J.M., Glawe, D.A., Munkvold, G.P.** (1993): A hyphomycetous synanamorph of *Eutypa armeniacae* in artificial culture. Mycologia, 85(6): 941-944.
- Milholland, R.D.** (1994): Part I. Diseases caused by biotic factors. Fruit and foliar diseases caused by fungi. Macrophoma rot. In R. C. Pearson, and A.C. Goheen (ed.), Compendium of grape diseases, 3rd ed. APS Press. St. Paul, Minnesota: 24.
- Mink, G.E.** (1975): A dying arm-like disease of grapevines. Proc. Washington State Grape Soc. 1975: 25-26.
- Moller, W.J., Lehoczky, J.** (1980): The occurrence of *Eutypa* Dieback of grapevine in Hungary. Phytopath. Z., 99, 116-125
- Miller, J.** (1897): Revision des champignons, tant suprieurs qu´inferieurs trouvs jusqace jour dans les Pays-Bas/par C.A.J.A. Oudemans. Amsterdam: 133.
- Moller, W.J., English H., Davis, J.R.** (1968): *Eutypa armeniacae* on grape in California. Pl. Dis. Reporter 52: 751.
- Moller, W.J., Kasamatis, A.N., J.J. Kissler, J.J.** (1974): A dying arm disease of grape in California. Pl. Dis. Reporter 58: 869-871.

- Moller, W.J., Kasamatis, A.N.** (1978): Dieback of grapevines caused by *Eutypa armeniaca*. Plant Dis. Rep. 62: 254-258.
- Moller, W.J., Lehoczy, J.** (1980): The occurrence of *Eutypa* Dieback of grapevine in Hungary. Phytopath. Z., 99: 116-125.
- Mostert, L., Crous, P.W., and Kang, Ji-C.** (2001): Species of *Phomopsis* and *Libertella* sp. occurring on grapevines with specific reference to South Africa: morphological, cultural, molecular and pathological characterization. Mycologia. 93 (1): 146-167.
- Mur, G.** (1988): Les maladies du bois de la vigne. Prog. Agric. Vitic. 105: 575-577.
- Muruamendiaraz, A., Lecomte, P., Legorburu, F.J.** (2009): Occurrence of the *Eutypa lata* sexual stage on grapevine in Rioja. Phytopathologia Mediterranea 48:140-144.
- Mugnai, L., Graniti, A., Surico, G.** (1999): Esca (Black Measles) and Brown Wood-Streaking: Two Old and Elusive Diseases of Grapevines. Plant Disease 83: 404-418.
- Munkvold, G.P., Marois, J.J.** (1991): Perithecia of *Eutypa lata* on sweet cherry in the Central Valley of California. Plant. Dis. 75: 431.
- Munkvold, G.P.** (2001): *Eutypa* dieback of grapevine and apricot. Online. Plant Health Progress doi: 10.1094/PHP-2001-0219-01-DG.
- Munkvold, G.P., Marois, J.J.** (1994): *Eutypa* dieback of sweet cherry and occurrence of *Eutypa lata* perithecia in the Central Valley of California. Plant Disease 78, 200-207.
- Munkvold, G.P., Duthie, J.A., and Marois, J.J.** (1994): Reductions in yield and vegetative growth of grapevines due to *Eutypa* dieback. Phytopathology 84: 186-192.
- Munkvold, G.P., Duthie, J.A., and Marois, J.J.** (1993): Spatial patterns of grapevines with *Eutypa* dieback in vineyards with or without perithecia. Phytopathology 83, 1440-1448.
- Munkvold, G.P., Duthie, J.A., and Marois, J.J.** (1992): Relationship of *Eutypa* dieback severity to growth and yield of grapevines. Phytopathology 82, 1084.
- Munkvold, G.P., and Marois, J.J.** (1991): Efficacy of natural epiphytes and colonisers of grapevine pruning wounds for biological control of *Eutypa* dieback. Phytopathology 83, 624-629.
- Muntañola-Cvetković, M.** (1987): Opšta mikologija. NIRO "Književne novine". Beograd. 63-82.

Octave, S., Fleurat-Lessard, P. and Roblin, G. (2009): Diagnosis of *Eutypa lata* infection in grapevines by serological detection of secreted polypeptides. *Journal of Plant Pathology*, 91 (2): 321-330.

O' Donnell, K., and Cigelnik, E. (1997): Two different intergenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Mol. Phylogenet. Evol.* 7: 103-116.

Pearson, R.C. (1994): Part I. Diseases caused by biotic factors. Fruit and foliar diseases caused by fungi. Powdery mildew. In R. C. Pearson, and A.C. Goheen (ed.), *Compendium of grape diseases*, 3rd ed. APS Press. St. Paul, Minnesota: 9-11.

Peros, J.-P., This P., Confuron Y., and Chacon H. (1996): Comparasion by isoenzyme and RAPD analysis of some isolates of the grapevine dieback fungus, *Eutypa lata*. *Am. J. Enol. Viticult.* 47: 49-56.

Peros, J.P., and Berger G. (1994): A rapid method to assess the aggressiveness of *E. lata* isolates and the susceptibility of grapevine cultivars to *Eutypa* dieback. *Agronomie* 14: 515-523.

Peros, J.-P., and Berger G., and Lahogue F. (1997): Variation in pathogenicity and genetic structure in the *Eutypa lata* population of a single vineyard. *Phytopathology* 87: 799-806.

Peros, J.-P., Jamaux-Despreaux I., Berger G., and Gerba D. (1999): The potential importance of diversity in *Eutypa lata* and co-colonising fungi in explaining variation in development of grapevine dieback. *Mycol. Res.* 103: 1385-1390.

Peros, J.P., Berger, G. (1999): Diversity within natural progenies of the grapevine dieback fungus *Eutypa lata*. *Current Genetics* 36, 301-309.

Peros, J.P., and Berger G. (2003): Genetic structure and variation in aggressivness in European and Australian populations of the grapevine dieback fungus, *Eutypa lata*. *European Journal of Plant Pathology* 109: 909-919.

Petzoldt, C.H., Moller, W.J. and Sall, M.A. (1981): *Eutypa* dieback of grapevine: seasonal differences in infection and duration of susceptibility of pruning wounds. *Phytopathology* 71, 540-543.

Petzoldt, C.H., Sall, M.A. and Moller, W.J. (1983): *Eutypa* dieback of grapevine: Ascospore dispersal in California. *American Journal of Eology and Viticulture* 34, 265-270.

Pildain, M.B., Novas, M.V., Carmarán, C.C. (2005): Evaluation of anamorphic state, wood decay and production of ligninmodifying enzymes for diatrypaceous fungi from Argentina. *J. Agric. Technol.* 1:81-96.

- Pitt, W.M., Trouillas, F.P., Gubler, W.D., Savocchia, S., Sosnowski, M.R.** (2013): Pathogenicity of Diatrypaceous fungi on grapevine in Australia. *Plant Dis.* 97: 749-756.
- Prodorutti, D., Michelon, L., Vanblaere, Gobbin, D., Pertot, I.** (2008): First report of *Eutypa lata* on red currant (*Ribes rubrum*) in Italy. *New Disease Reports*. Volume 17: 11.
- Quinn, N.R.** (1941): Almond culture in South Australia. *S. Aust. Dep. Agric. Bull. No.* 367.
- Raabe, R.D.** (1994): Part I. Diseases caused by biotic factors. Fruit and foliar diseases caused by fungi. Armillaria root rot. In R. C. Pearson, and A.C. Goheen (ed.), *Compendium of grape diseases*, 3rd ed. APS Press. St. Paul, Minnesota: 35-36.
- Ramos, D.E., Moller, W.J., and English, H.** (1975): Susceptibility of apricot tree pruning wounds to infection by *Eutypa armeniaca*. *Phytopathology* 65, 1359-64.
- Ramsdell, D.C. and Milholland, R.D.** (1994): Part I. Diseases caused by biotic factors. Fruit and foliar diseases caused by fungi. Black rot. In R. C. Pearson, and A.C. Goheen (ed.), *Compendium of grape diseases*, 3rd ed. APS Press. St. Paul, Minnesota: 15-17.
- Ramsdell, D.C.** (1994): Part I. Diseases caused by biotic factors. Diseases caused by viruses and viruslike agents. Peach rosette mosaic virus decline. In R. C. Pearson, and A.C. Goheen (ed.), *Compendium of grape diseases*, 3rd ed. APS Press. St. Paul, Minnesota: 51-52.
- Rappaz, F.** (1984): Les especes sanctionnees du genre *Eutypa* (Diatrypaceae: Ascomycetes): etude taxonomique et nomenclaturale. *Mycotaxon* 20: 567-586.
- Rappaz, F.** (1987): Taxonomie et nomenclature des Diatrypacées á asques octosporés. *Mycol. Helv.* 2: 285-648.
- Reddick, D.** (1909): Necrosis of the grapevine. *New York Agricultural Station Bulletin* 263, 323-343.
- Republički zavod za statistiku - Republika Srbija** (2016): Остварена производња пшенице и раног воћа и очекивани принос касних усева, воћа и грожђа у Републици Србији, 2016.
- Rogers, J.D., Glawe, D.A.** (1983): *Diatrype whitmanensis* sp. nov. and the anamorphs of *Diatrype bullata* and *Eutypella sorbi*. *Mycotaxon* 18: 73-80.
- Rolshausen, P.E., Trouillas, F., Gubler, W.D.** (2004): Identification of *Eutypa lata* by PCR-RFLP. *Plant Disease* 88: 925-929.
- Rolshausen, P.E., Mahoney, N.E., Molyneux, R.J., Gubler, W.D.** (2006): A Reassessment of the Species Concept in *Eutypa lata*, the Causal Agent of Eutypa Dieback of Grapevine. *Phytopathology* 96: 369-377.

Rolshausen, P.E., Greve, L.C., Labavitch, J.M., Mahoney, N.E., Molyneux, R.J., Gubler, W.D. (2008): Pathogenesis of *Eutypa lata* in Grapevine: Identification of virulence factors and biochemical characterization of cordon dieback. *Phytopathology* 98: 222-229.

Rolshausen, P.E., Baumgartner, K., Travadon, R., Pouzoulet, J. (2014): Identification of *Eutypa* spp. causing Eutypa dieback of grapevine in Eastern North America. *Plant Dis.* 98: 483-491.

Rolshausen, P.E., Sosnowski, M., Trouillas, F.P., Gubler, W.D. (2015): Diseases Caused by Fungi and Oomycetes. *Eutypa dieback*. In W. F. Wilcox, W. D Gubler, J. K. Uyemoto, *Compendium of Grape Diseases, Disorders, and Pests*, 2rd ed. APS Press. St. Paul, Minnesota: 57-61.

Rumbos, I. C.H. (1983): Eutypa canker and dieback of almond in Greece. *J. Plant Dis. Prot.* 90, 99-101.

Rumbos, I. C.H. (1964): Occurrence of *Eutypa armeniaca* on almond in Greece. *Proc. 6th Congr. Un. Phytopath. Mediterr. Cairo, Egypt.* Oct. 1-6.

Rumbos, I. C.H. (1984): Damages caused by the fungus *Eutypa armeniaca* Hansf. & Carter. *Geotechnica Greece*, 4: 118-125.

Rumbos, I. C.H. (1985): Further pathogenicity studies of *Eutypa lata* (= *E. armeniaca*) on almond. *Ciheim – Options Mediterraneennes*: 79-89.

Saccardo, P.A. (1882): *Sylloge Fungorum*. Vol. 1.

Samuel, G. (1933): “Gummosis” or ‘dieback’ in apricot trees. *J. Dept. Agric. South Australia* 36: 979-980.

Sánchez-Torres, P., Hinarejos, R., González, V., Tuset, J.J. (2008): Identification and characterization of fungi associated with esca in vineyards of the Comunidad Valenciana (Spain). *Spanish Journal of Agricultural Research* 6: 650-660.

Schnathorst, W.C. and Goheen, A.C. (1994): Part I. Diseases caused by biotic factors. Fruit and foliar diseases caused by fungi. Verticillium wilt. In R. C. Pearson, and A.C. Goheen (ed.), *Compendium of grape diseases*, 3rd ed. APS Press. St. Paul, Minnesota: 37-38.

Schüepp, H. (1994): Part I. Diseases caused by biotic factors. Fruit and foliar diseases caused by fungi. Rotbrenner. In R. C. Pearson, and A.C. Goheen (ed.), *Compendium of grape diseases*, 3rd ed. APS Press. St. Paul, Minnesota: 19-20.

Siebert, J.B. (2001): *Eutypa*: The economic toll on vineyards. *Wines&Vines*, April: 50-56.

Sinclair, W.A., Lyon H.H. (2005): Diseases of trees and shrubs, 2nd edn. Cornell University Press, Ithaca.659.

Slippers, B., Boissin, E., Phillips, A.J.L., Groenewald, J.Z., Lombard, L., Wingfield, M.J., Postma, A., Burgess, T., and Crous, P.W. (2013): Phylogenetic lineages in the Botryosphaerales: a systematic and evolutionary framework. *Studies in Mycology* 76: 31-49.

Sosnowski, M.R., Lardner, R., Wicks, T.J., Scott, E.S. (2007a): The influence of grapevine cultivar and isolate of *Eutypa lata* on wood and foliar symptoms. *Plant Disease*, 91: 924-931.

Sosnowski, M.R., Shtienberg, D., Creaser, M.L., Wicks, T.J., Lardner, R., Scott, E.S. (2007b): The influence of climate on foliar symptoms of *Eutypa dieback* in grapevines. *Phytopathology* 97: 1284-1289.

Sosnowski, M.R., Wicks, T.J., and Scott, E.S. (2011): Control of *Eutypa dieback* in grapevines using remedial surgery. *Phytopathol. Mediterr.* 50: S277-S284.

Sosnowski, M.R., Loschiavo, A. P., Wicks, T.J., and Scott, E.S. (2013): Evaluating treatments and spray application for the protection of grapevine pruning wounds from infection by *Eutypa lata*. *Plant Dis.* 97: 1599-1604.

Sosnowski, M.R. (2016): Best practices management guide. *Eutypa dieback*. Available at: [http://www.Barossa.com/uploads/214/20160621_eutypa - dieback - best - practice - management_guide.pdf](http://www.Barossa.com/uploads/214/20160621_eutypa_-_dieback_-_best_-_practice_-_management_guide.pdf) [Accessed 5 June 2017].

Stojanović, D., Kostić, B. (1957): *Monilia fructigena* (Aderh. Et Ruhl.) Honey na grožđu. *Zaštita bilja* (46), 65-67.

Sutton, B.C. (1977): *Coelomycetes* VI. Nomenclature of generic names proposed for *Coelomycetes*. *Mycol. Pap.* 141: 1-253.

Šutić, D. (1995): *Viroze biljaka*. Institut za zaštitu biljaka i životnu sredinu. Politop-P. Beograd.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011): **MEGA5**: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. Doi: 10.1093/molbev/msr121.

Tiffany, L.H., Gilman, J.C. (1965): Iowa Ascomycetes IV, Diatrypaceae. *Iowa State J Sci* 40:121-161.

Thompson, J., Higgins, D., Gibson, T. (1994): Clustal *W*: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4690.

Tosi, L., Natalini, G. (2008): First report of *Eutypa lata* causing dieback of olive trees in Italy. New disease reports [<http://www.bspp.org.uk/ndr/>].

Travadon R., Baumgartner, K., Rolshausen, P.E., Gubler, W.D., Sosnowski, M.R., Lecomte, P. Halleen, F. and Péros, J.-P. (2012): Genetic structure of the fungal grapevine pathogen *Eutypa lata* from four continents. *Plant Pathology* 61 (1): 85-95.

Travadon R., Rolshausen, P.E., Gubler, W.D., Cadle-Davidson L., Baumgartner, K. (2013): Susceptibility of cultivated and wild *Vitis* sp. To wood infection by fungal trunk pathogens. *Plant Dis.* 97: 1529-1536.

Trese, A.T., Burton, C.L., Ramsdell, D.C. (1980): *Eutypa armeniacae* in Michigan vineyards: Ascospore production, survival, Host infection, and fungal growth at low temperatures. *Phytopathology*, 70: 788-793.

Trkulja, V. (2003): Patogene, morfološke i odgajivačke odlike *Colletotrichum* spp., prouzrokovача gorke truleži ploda jabuke. Doktorska disertacija. Poljoprivredni fakultet, Beograd.

Trouillas, F.P., Rolshausen, P.E., and Gubler, W.D. (2001): Importance of *Eutypa lata* and occurrence of other Diatrypaceous fungi in Northern Californian vineyards. (abstr.) *Phytopathology* 91: S89.

Trouillas, F.P., Rolshausen, P.E., and Gubler, W.D. (2003): Discovery of a second *Eutypa* species pathogenic to grapevine in California (Abstr.) *Phytopathology* 93: 130.

Trouillas, F.P., and Gubler, W.D. (2004): Identification and characterization of *Eutypa leptoplaca*, a new pathogen in North California. *Mycol. Res.* 108: 1195-1204.

Trouillas, F.P., and Gubler, W.D. (2010): Host range, biological variation, and phylogenetic diversity of *Eutypa lata* in California. *Phytopathology* 100 (10): 1048-1056.

Trouillas, F.P., Úrbez-Torres, J.R., and Gubler, W.D. (2010): Diversity of diatrypaceous fungi associated with grapevine canker diseases in California. *Mycologia* 102 (2). 319-336.

Trouillas, F. P., Pitt, W. M., Sosnowski, M.R., Huang, R., Peduto, F., Loschiavo, A., Savocchia, S., Scott, E.S., Gubler, W.D. (2011): Taxonomy and DNA phylogeny of Diatrypaceae associated with *Vitis vinifera* and other woody plants in Australia. *Fungal Diversity* (2011) 49:203–223.

Úrbez-Torres, J.R., Leavitt, G.M., Voegel, T.M. and Gubler, W.D. (2006): Identification and Distribution of *Botryosphaeria* spp. Associated with Grapevine Cankers in California. *Plant Disease* 90: 1490-1503.

Úrbez-Torres, J.R., Adams, P., Kama, J., Gubler, W.D. (2009): Identification, incidence and pathogenicity of fungal species associated with grapevine dieback in Texas. *Am J Enol Vitic* 60(4):497–507.

Úrbez-Torres, J.R., Peduto, F., Striegler, R.K., Urrea-Romero, K.E., Rupe, J.C., Cartwright, R. D and Gubler, W.D. (2012): Characterization of fungal pathogens associated with grapevine trunk diseases in Arkansas and Missouri. *Journal Fungal Divers.* 52 (1): 169-189.

Uyemoto, J.K., Moller, W.J., and Goheen, A.C. (1976): Isolation of *Eutypa armeniacae* from grapevines in New York and inoculation to apricot. *Pl. Dis. Reporter* 60: 684-686.

Van Niekerk, J., Fourie, P., Halleen, F. (2003): Economic impact of *Eutypa dieback* of grapevines. *Winboer* 173: 10-12.

Van Niekerk, J.M., Cours, P.W., Groenewald, J.Z., Fourie, P.H., Hallen, F. (2004): DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. *Mycologia* 96: 781-798.

Voss, W. (1887): Materialien zur Pilzkunde Krains. V. Mit Taf. Verhandlungen der k.k. zoologisch-botanischen Gesellschaft in Wien. Bd. XXXVII: 207.

Walker, M.A. (2015): The genus *Vitis*, its species, and its rootstocks. In W. F. Wilcox, W. D Gubler, J. K. Uyemoto, *Compendium of Grape Diseases, Disorders, and Pests*, 2rd ed. APS Press. St. Paul, Minnesota: 3-5.

Wenneker, M., Joosten, N., van der Steeg, P. (2010): Bestrijding van taksterfte en stamkanker bij rode bes, veroorzaakt door de schimmel *Eutypa*. *Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, Bloembollen, Boomkwekerij & Fruit. Sichtung Dienst Lanbouwkunding Onderzoek, The Holland*: 1-26.

Wenneker, M., van Raak, M.J.P., van Brouwershaven I.R., Martin, W., Kox, L.F.F. (2011): *Eutypa lata*, the causal agent of dieback in red currant (*Ribes rubrum*) and gooseberry (*R. uva-crispa*) in the Netherland. *European Journal of Plant Pathology* 131: 441-449.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR protocol: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press. Inc. 38: 315-322.

Wicks, T.J., K. Davis, K. (1999): The effect of *Eutypa* on grapevine yield. *The Australian Grapegrower and Winemaker* 426: 15-16.

Wilcox W.F., and Mircetich, S.M. (1994): Part I. Diseases caused by biotic factors. Fruit and foliar diseases caused by fungi. Phytophthora ceown and root rot. In R. C. Pearson, and A.C. Goheen (ed.), *Compendium of grape diseases*, 3rd ed. APS Press. St. Paul, Minnesota: 39-40.

Wilcox W.F. (2015): The grape, its diseases, and its pathogens. In W. F. Wilcox, W. D. Gubler, J. K. Uyemoto, Compendium of Grape Diseases, Disorders, and Pests, 2rd ed. APS Press. St. Paul, Minnesota: 1-3.

Zhang, N., Castebury, A.L., Miller, N.A., Huhndorf, M.S., Shoch, L.C., Seifert, A.K., Rossman, Y.A., Rogers, D.J., Kohlmeyer, J., Kohlmeyer, B.V., and Sung, G.H. (2006): An overview of the systematics of the Sordariomycetes based on four-gene phylogeny. *Mycologia* 98: 1076-1087.

Živković, S., Vasić, T., Anđelković, S., Jevremović, D., Trkulja, V. (2012a): Identification and Characterization of *Eutypa lata* on Grapevine in Serbia. *Plant Disease* 96 (6): 913.

Živković, S., Vasić, T., Trkulja, V., Krnjaja, V., and Marković, J. (2012b): Pathogenicity on grapevine and sporulation of *Eutypa lata* isolates originating from Serbia. *Romanian Biotechnological Letters*. No 17(3): 7379-7388.

BIOGRAFIJA

Sanja P. Živković (rođena Gajić), rođena je 2. avgusta 1972. godine u Kruševcu. Osnovnu i srednju školu završila je u Kruševcu.

Školske 1991/92 upisala se na Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu, Odsek za zaštitu bilja i prehrambenih proizvoda. Fakultetsku diplomu stekla je 25. septembra 1997. godine, odbranivši diplomski rad pod nazivom “*Alternaria alternata* (Fries.) Keisler, prouzrokovatelj pegavosti lista karanfila ” sa ocenom 10 (deset).

U periodu od 2005. do 2018. godine u više navrata boravila je na Poljoprivrednom institutu u Banja Luci, u cilju stručnog usavršavanja, pod rukovodstvom prof. Dr Vojislava Trkulje. Samostalno ili kao koautor objavila je 31 naučni rad. Član je Društva za zaštitu bilja Srbije.

Izjava o autorstvu

Ime i prezima autora Sanja Živković

Broj indeksa FM 160046

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Karakterizacija *Eutypa lata*, prouzrokovaca odumiranja

čokota vinove loze u Srbiji i osetljivost sorti

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

Potpis autora

U Beogradu, _____

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Sanja Živković

Broja indeksa FM 160046

Studijski program Poljoprivredne nauke

Naslov rada Karakterizacija *Eutypa lata*, prouzrokovača odumiranja čokota vinove loze u Srbiji i osetljivost sorti

Mentor dr Milan Ivanović, vanredni profesor

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

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

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

U Beogradu, _____

Potpis autora

Izjava o korišćenju

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

Karakterizacija *Eutypa lata*, prouzrokovača odumiranja

čokota vinove loze u Srbiji i osetljivost sorti

koja je moje autorsko delo.

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

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

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci.

Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

Potpis autora

U Beogradu, _____
