

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ ФАКУЛТЕТА

Предмет: Извештај Комисије за оцену докторске дисертације кандидата Милоша Стевановића

На основу члана 57. Став 1. Правилника о правилима докторских студија Пољопривредног факултета, а на предлог одговарајућег већа катедре и мишљење одговарајућег наставно-научног већа института, Наставно-научно веће Факултета на седници одржаној 27.02.2019. године донело је одлуку бр. 32/5-4.1. да се образује Комисија за оцену докторске дисертације кандидата Милоша Стевановића под насловом: „Идентификација и карактеризација фитопатогених гљива проузроковача болести стабла купине у Србији”.

На основу појединачних извештаја свих чланова комисије (заведених под бројевима 12/100, 12/100-1, 12/100-2, 12/100-3 и 12/100-4 од 01.03.2019. године, Председник Комисије др Горан Алексић, виши научни сарадник (Одлука број 4/1-4 од 28.02.2019. године) је припремио следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. Основни подаци о кандидату и дисертацији

Милош Стевановић рођен је 29.08.1984. године у Крагујевцу, Република Србија. Пољопривредни факултет Универзитета у Београду, Одсек за заштиту биља и прехранбених производа завршио је 2008. године, а докторске академске студије уписао је 2009/10 и 2016/17 године на Пољопривредном факултету Универзитета у Београду. Запослен је у Институту за заштиту биља и животну средину, Одсек за болести биља, као виши стручни сарадник. Тема докторске дисертације пријављена је на Пољопривредном факултету 28.02.2018. године (одлука број 33/5-5.1 од 28.02.2018. године) и одобрена од стране Већа научних области биотехничких наука, Универзитета у Београду (одлука број 61206-1109/2-18 од 13.03.2018. године), а за менторе одређене су др Александра Булајић,

редовни професор, Универзитет у Београду – Пољопривредни факултет и др Светлана Живковић, виши научни сарадник, Институт за заштиту биља и животну средину, Београд.

Докторска дисертација кандидата Милоша Стевановића, дипл. инж., написана је на укупно 177 страница писаног текста укључујући и 43 оргиналне фотографије и 13 табела, а цитирано је 243 извора литературе. Испред основног текста налази се насловна страна на српском и енглеском језику, информације о менторима и члановима комисије, захвалница и резиме са кључним речима на српском и енглеском језику.

Докторска дисертација садржи осам основних поглавља, и то: Увод (странице 1-2), Преглед литературе (странице 3-29), Циљеви истраживања (30), Материјал и методе (31-53), Резултати (54-123), Дискусија (124-156), Закључак (157-159) и Литература (160-177). На крају текста налази се Биографија кандидата (страница 178), Изјава о ауторству (страница 179), Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације (страница 180) и Изјава о коришћењу (страница 181).

2. Предмет и циљ дисертације

Предмет ове докторске дисертације јесте испитивање проузроковача болести стабла купине у Србији које је спроведено током вишегодишњих истраживањима обухватајући најзначајније рејоне гајења и најзаступљеније сорте купине. Основни циљ ове докторске дисертације био је расветљавање етиологије и проучавање комплекса гљива проузроковача болести стабла купине у Србији кроз конвенционалну, биолошку и молекуларну идентификацију и карактеризацију, као и развој одговарајућих протокола за идентификацију патогена и постављање основе за правилну дијагнозу болести што је предуслов за предузимање адекватних мера сузбијања.

Одабрани предмет истраживања показао се изузетно значајним јер су проузроковачи болести стабла купине у Србији били до ове дисертације недовољно проучена група патогена. Истраживања болести стабла купине у свету углавном су старијег датума и слично истраживањима у Србији најчешће не укључују молекуларне анализе. Кроз реализацију ове дисертације остварени су предвиђени циљеви и показало се да је ситуација значајно комплекснија и да болести стабла купине изазива много више проузроковача него што се раније претпостављало. У оквиру ове дисертације изоловано је 10 различитих врста за које је доказано да су проузроковачи уочених болести стабла купине, од којих су шест нови патогени купине у Србији, а једна нови патоген овог домаћина у свету.

3. Основне хипотезе од којих се полазило у истраживању

Основне почетне хипотезе биле су да су проузроковачи болести стабла купине у Србији недовољно проучена група патогена са мало описаних врста. Како је дошло до значајног ширења производње купине, промена у технологији гајења и промена у структури

и заступљености сорти у већини производних подручја, претпоставило се да ће истраживања у оквиру ове дисертације дати увид у: врсте укључене у комплекс проузроковача болести стабла купине, њихово присуство, распрострањеност, морфолошке, биолошке и молекуларне карактеристике, структуру популације и варијабилност изолата пореклом из Србије.

Све наведене хипотезе научно су потврђене у овој дисертацији и расветљена је етиологија проузроковача болести стабла купине у Србији. Идентификовано је 10 врста укључених у комплекс болести стабла купине и то: *Paraconiothyrium fuckelii*, *Gnomoniopsis idaeicola*, *Septoria* spp., *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum kahawae*, *Diaporthe eres*, *Diaporthe betulae* и *Neofusicoccum parvum*. Врсте *G. idaeicola*, *Septoria* spp., *C. kahawae*, *D. eres*, *D. betulae* и *N. parvum* први пут су описане као патогени купине у Србији, што је уједно и први налаз *D. betulae* на купинама у свету. Поред тога, развијени су протоколи за молекуларну идентификацију што је основа за предузимање адекватних мера сузбијања што је значајан допринос ове дисертације.

4. Кратак опис садржаја дисертације

Увод. У уводном поглављу указано је на привредни значај купине у Србији и свету, површине под овом културом, као и на значај проучавања проузроковача болести стабла купине јер има мало литературних података у Србији и у свету.

Преглед литературе. Ово поглавље садржи шест потпоглавља у којима су изнети доступни литературни подаци о купини, као и о најзначајнијим болестима стабла купине и до ове дисертације познатим подацима о најважнијим проузроковачима.

Циљ истраживања: Основни циљеви ове дисертације били су детекција присуства проузроковача болести стабла купине као недовољно проучене групе патогена у Србији као и одређивање основних карактеристика кроз конвенционалну, биолошку и молекуларну идентификацију и карактеризацију. Поред расветљавања етиологије болести стабла купине у Србији, циљ је и унапређење метода за детекцију и идентификацију као основе за успостављање мера сузбијања.

Материјал и методе. У овом поглављу које садржи шест потпоглавља обухваћене су све примењене методе у спроведеним испитивањима. У потпоглављу Преглед терена и сакупљање узорака приказан је начин сакупљања основног материјала за даља истраживања. Изолација и добијање моноспоријалних изолата обављено је коришћењем стандардних фитопатолошких метода (Изолација и добијање моноспоријалних изолата), а детаљно је описан и поступак провере патогености вештачким инокулацијама резница стабла купине (Провера патогености). Патогеним су се сматрали они изолати који су довели до развоја видљивих симптома на инокулисаним резницама. У оквиру потпоглавља Морфолошке особине описане су методе за испитивања микроскопских и макроскопских особина одабраних изолата на PDA подлози, кроз проучавања изгледа и боје колонија, присуства, распореда и бројности плодноних творевина, као и проучавања изгледа и

величине конидија, пикнида, формирање перитеција, аскуса и аскоспора. У потпоглављу Молекуларна детекција, идентификација и карактеризација образложено је да су за истраживања одабрана четири молекуларна маркера укључујући ITS регион rDNA, TUB, TEF-1 α и FG1093. Екстракција укупних DNA обављена је помоћу комерцијалног кита DNeasy Plant Mini Kit–а, а укупне DNA коришћене су за амплификацију применом методе ланчане реакције полимеразе (Polimerase Chain Reaction - PCR). Добијени производи су секвенцирани, а молекуларна идентификација обављена је анализом хомологије нуклеотидних секвенци и поређењем са секвенцама доступним у базама података GenBank, BOLD и Q-bank. Филогенетске анализе урађене су реконструкцијом четири филогенетска стабла заснована на секвенцама ITS региона rDNA односно једног мултилокус филогенетског стабла заснованог на комбинованим секвенцама ITS региона rDNA, TEF-1 α , TUB и FG1093, укључујући изолате из Србије и одабране референтне изолате из GenBank базе података. У потпоглављу Испитивање вирулентности изолата *Gnomoniopsis idaeicola* објашњен је поступак испитивања вирулентности, инокулација и оцена на основу величине некрозе.

Резултати: Резултати истраживања приказани су јасно и концизно, у седам потпоглавља уз одговарајућа текстуална објашњења, оригиналне слике, графиконе и табеле које илуструју добијене резултате. У оквиру потпоглавља Симптоми болести у пољу детаљно су описани уочени симптоми и документовани оригиналним фотографијама, а визуелно је процењена и инциденца болести. Сакупљено је 427 узорака и добијено 468 изолата који су сврстани у морфолошке групе на основу заједничких особина. Детектовано је 10 врста проузроковача болести стабла купине и то: *Paraconiothyrium fuckelii*, *Gnomoniopsis idaeicola*, *Septoria* spp., *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum kahawae*, *Diaporthe betulae*, *Diaporthe eres* и *Neofusicoccum parvum* који су првобитно сврстани у морфолошке групе и репрезентативни изолати из сваког локалитета одабрани су за даљи рад (потпоглавље Избор изолата за даљи рад). У оквиру потпоглавља Провера патогености испитиваних изолата приказани су резултати успешне провере патогености свих морфолошких група и документована појава симптома некрозе око инокулисаног места након 14 дана. У потпоглављу Морфолошка својства описане су морфолошке особине свих врста детектованих у истраживањима и то изглед колонија, брзина пораста, тип пораста, спорулација, изглед и величина пикнида и конидија, а код неких врста описан је и полни стадијум односно изглед и димензије перитеција, аскуса и аскоспора. У потпоглављу Молекуларна идентификација и карактеризација приказани су резултати молекуларних анализа. Молекуларна идентификација већине детектованих врста спроведена је анализом хомологије нуклеотидних секвенци ITS региона rDNA и њиховим поређењем са секвенцама у GenBank, BOLD и Q-bank базама података. Осим ITS региона rDNA за врсту *G. idaeicola* коришћене су и секвенце за TEF-1 α , TUB и FG1093. Међутим, за идентификацију врста *Diaporthe betulae*, *Diaporthe eres* и *Colletotrichum kahawae* било је неопходно обавити филогенетске анализе, док су за изолате означене као *Septoria* spp. неопходне додатне анализе које ће бити накнадно обављене. У потпоглављу Филогенетске

анализе приказани су резултати испитивања еволутивних међуодноса испитиваних изолата. За врсту *G. idaeicola* генерисана су два стабла, једно базирано на секвенцама ITS региона rDNA, и друго засновано на комбинованим секвенцама ITS региона rDNA, TEF-1 α , TUB и FG1093. Оба стабла испољила су топологију и раздвајање врста која одговарају роду *Gnomoniopsis*, међутим, мултилокус стабло дало је бољу резолуцију на субспецијском нивоу. Испитивани изолати, представници фамилије Botryosphaeriaceae груписали су се у три засебна кластера (*B. dothidea*, *D. seriata* и *N. parvum*) потврђујући да је ITS регион rDNA високо информативан не само за идентификацију већ и за проучавање еволутивних међуодноса. Филогенетском анализом довршена је идентификација врста *D. betulae* и *D. eres*, а генерисано стабло потврдило је раздвајање врста у оквиру рода *Diaporthe*. Филогенетске анализе испитиваних изолата врсте *C. kahawae* потврдила су позицију изолата из Србије који припадају роду *Colletotrichum*, који су се сврстали у комплекс *gloeosporioides*. Већина изолата *G. idaeicola* испољила је умерену вирулентност, а само неколико изолата испољило је јаку односно слабу вирулентност (Вирулентност изолата *Gnomoniopsis idaeicola*) што представља прву биолошку карактеризацију ове врсте у свету.

Дискусија. У оквиру овог поглавља (у шест потпоглавља) дискутовани су, тумачени и повезивани резултати истраживања са раније спроведеним истраживањима у свету и у Србији. У потпоглављу Уочени симптоми болести стабла купине у пољу описани симптоми анализирани су и дат је осврт на значај појединих болести, распрострањеност, штетност, могућу епидемиологију, као и утицај старости засада и сорте на ниво инфекције. У потпоглављу Патогене особине испитиваних изолата анализирани су резултати тестова патогености, типови симптома и промена које су се јавиле на инокулисаним резницама. У потпоглављу Морфолошка карактеризација испитиваних особина анализирани су макроскопске и микроскопске морфолошке особине испитиваних изолата. У оквиру потпоглавља Молекуларна идентификација и анализа секвенци испитиваних изолата образложени су резултати анализе секвенци испитиваних изолата, њихово међусобно поређење, као и поређење са другим секвенцама доступним у базама података што представља основу за молекуларну идентификацију. Молекуларна идентификација свих испитиваних изолата заснована је на секвенцама ITS региона rDNA, док је за изолате врсте *G. idaeicola* укључено још три молекуларна маркера (TEF-1 α , TUB и FG1093). *G. idaeicola*, *D. eres*, *C. kahawae*, *N. parvum* и *Septoria* spp. први пут су идентификоване као патогени купине у Србији, док је *D. betulae* први пут идентификована као патоген купине у свету. За већину врста анализа хомологије нуклеотидних секвенци била је довољна за идентификацију док је за врсте *D. betulae*, *D. eres* и *C. kahawae* идентификација довршена додатним филогенетским анализама. Развијени су одговарајући протоколи за молекуларну идентификацију што представља практичан допринос ове дисертације који ће се у пракси користити за контролу здравственог стања садног материјала купине. У оквиру потпоглавља Филогенетска карактеризација и таксономска позиција испитиваних изолата анализирани су резултати реконструкције филогенетских стабала, еволутивни међуодноси и позиција испитиваних изолата у односу на друге референтне изолате доступне у GenBank

бази података. Мултилокус филогенетско стабло открива прве резултате варијабилности изолата врсте *G. idaeicola* са једним изолатом који има могуће различито порекло од остатка популације у Србији. Филогенетска анализа врста *B. dothidea*, *D. seriata* и *N. parvum* (Botryosphaeriaceae), показује да је ITS регион rDNA веома користан у испитивањима еволутивних међуодноса између сродних врста фамилије Botryosphaeriaceae потврђујући резултате ранијих истраживања. Филогенетском анализом изолата врсте *C. kahawae* генерисано је стабло са топологијом која одговара врстама и комплексима у оквиру рода чиме је довршена идентификација ове врсте, слично као и изолати врста *D. betulae* и *D. eres*. У потпоглављу Вирулентност изолата *Gnomoniopsis idaeicola* пореклом са различитих локалитета први пут у свету описане су разлике у вирулентности изолата ове врсте.

Закључак. У овом поглављу изведени су бројни закључци који у потпуности произилазе из спроведених истраживања. Четворогодишњим испитивањима обухваћено 24 засада купине на 20 локалитета у 13 округа, као и 5 најзначајнијих сорти купине у Србији. Уочени су разноврсни симптоми на стаблу купине, забележена је различита инциденца болести, као и пропадање појединих засада (и до 40 %), уз смањење приноса и до 50%. Детектовано је 10 врста проузроковача болести стабла купине у Србији а *P. fuckelii* била је најзаступљенија изазивајући сличне симптоме као и *G. idaeicola* која је први пут описана на купини у Србији. По први пут у свету, документован је увид у патогене, морфолошке и молекуларне особине изолата *G. idaeicola* са купине и први пут је уочено постојање изражене варијабилности и указано је на могуће аспекте епидемиологије болести. *Septoria* spp., *C. kahawae*, *D. eres*, *D. betulae* и *N. parvum* први пут су описане као патогени купине у Србији, а ова истраживања су уједно и први налаз *D. betulae* на купинама у свету. Указано је на изузетну сличност симптома и морфолошких особина изолата *Septoria* spp. са досадашњим описима врсте *Septocyta ruborum*. У овој дисертацији представљене су прве информације о распрострањености, морфолошким, патогеним и молекуларним особинама изолата *B. dothidea*, *D. seriata*, *N. parvum*, *B. cinerea*, *C. kahawae*, *D. eres* и *D. betulae* пореклом са стабла купине у Србији. Развијени су протоколи за молекуларну детекцију и идентификацију чиме су унапређене методе идентификације проузроковача болести стабла купине.

Литература. У дисертацији је наведено 243 референце како страних тако и домаћих аутора. Изабране референце одговарају проучаваној проблематици и актуелне су.

5. Остварени резултати и научни допринос дисертације

Током четворогодишњих истраживања спроведених у оквиру ове дисертације обухваћена су најважнија производна подручја купине у Србији и расветљена је етиологија болести стабла купине која је услед интензивног ширења производње и промена у саставу сортимента углавном била непозната. Укупно је идентификовано 10 врста проузроковача болести стабла купине и то: *P. fuckelii*, *G. idaeicola*, *Septoria* spp., *B. dothidea*, *D. seriata*, *B. cinerea*, *C. kahawae*, *D. betulae*, *D. eres* и *N. parvum*. Врсте *G. idaeicola*, *Septoria* spp., *C.*

kahawae, *D. betulae*, *D. eres* и *N. parvum* први пут су описане на купини у Србији, а ова истраживања су уједно и први налаз *D. betulae* на купини у свету. За већину детектованих врста пружене су прве информације о распрострањености, значају, морфолошким, патогеним и молекуларним карактеристикама, као и први увид у еволутивне међуодносе. Депоновано је 106 нуклеотидних секвенци изолата из Србије које су на располагању за даља проучавања у свету. У оквиру истраживања проучене су особине значајне у идентификацији и развијени су протоколи за поуздану молекуларну идентификацију детектованих врста што представља основу за планирање и спровођење одговарајућих мера сузбијања и подизање квалитета садног материјала купине.

6. Објављени и саопштени резултати

За сада објављени део дисертације односи се на *Gnomoniopsis idaeicola* за Србију нову врсту која је проузроковач болести стабла купине и која је у овим истраживањима први пут откривена да се масовно појавила на купини у свету и да је изазвала економски веома значајно смањење приноса и угинуће биљака купине. Истраживања спроведена током четворогодишњег периода, од 2013. до 2016. године, показала су да је *Gnomoniopsis idaeicola* широко распрострањен патоген стабла купине у Србији присутан на готово половини прегледаних засада. Забележена је значајна инциденца са до 80% заражених биљака у појединим засадима и са изумирањем до 40% биљака и директним смањењем приноса око 50%. У оквиру ових истраживања по први пут у свету установљено је постојање интраспецијске варијабилности *G. idaeicola* у погледу морфолошких, биолошких, патогених и молекуларних особина указујући да популација ове врсте у Србији може имати различито порекло. Детаљно су проучене морфолошке особине, изглед колонија, изглед и димензије пикнида, конидија, перитеција, аскус и аскоспора. Молекуларна идентификација и карактеризација урађена је на основу четири молекуларна маркера, ITS региона rDNA, TEF-1 α , TUB и FG1093. Утврђена је разлика у вирулентности изолата различитог географског порекла а свих са територије Србије.

Референце:

Рад у врхунском међународном часопису (M21)

Stevanović, M., Ristić, D., Živković, S., Aleksić, G., Stanković, I., Krstić, B., Bulajić, A. (2019): Characterization of *Gnomoniopsis idaeicola*, the Causal Agent of Canker and Wilting of Blackberry in Serbia. *Plant Disease*, 103: 249-258. (IF 2.941)

Саопштење са скупа националног значаја штампано у изводу (М64)

Стевановић, М., Ристић, Д., Живковић, С., Алексић, Г., Булајић, А. (2018): *Gnomoniopsis idaeicola* – НОВИ ПАТОГЕН СТАБЛА КУПИНЕ У СРБИЈИ. XV Саветовање о заштити биља, 26-30.11.2018., Златибор. Зборник резимеа радова, 51.

Стевановић, М., Ристић, Д., Живковић, С., Алексић, Г., Војводић, М., Булајић, А. (2018): Морфолошка и молекуларна идентификација *Gnomoniopsis idaeicola* - значајног патогена купине у Србији. 15. Симпозијум о заштити биља у Босни и Херцеговини, 06-08.11.2018., Сарајево. Зборник резимеа 23-24.

7. Закључак

Докторска дисертација кандидата Милоша Стевановића, дипл. инж., под насловом: „Идентификација и карактеризација фитопатогених гљива проузроковача болести стабла купине у Србији” је оригинално и самостално научно дело. Спроведена истраживања урађена су у потпуности складу са одобреном пријавом дисертације и представљају самостални експериментално-истраживачки научни рад кандидата чиме су се стекли услови за њену јавну одбрану. Дисертација представља свеобухватна истраживања болести стабла купине у Србији. Допринос ове дисертације огледа се у расветљавању етиологије болести стабла купине у Србији која је углавном била непозната. Детектоване су раније присутне, али и нове врсте за Србију: *P. fuckelii*, *G. idaeicola*, *Septoria* spp., *B. dothidea*, *D. seriata*, *B. cinerea*, *C. kahawae*, *D. eres*, *D. betulae* и *N. parvum*. Врсте *G. idaeicola*, *Septoria* spp., *C. kahawae*, *D. betulae*, *D. eres* и *N. parvum* први пут су описане на купини у Србији. Ово је први налаз *D. betulae* на купини у свету. Дате су прве информације о распрострањености, морфолошким, патогеним и молекуларним карактеристикама детектованих врста. Развијени су протоколи за молекуларну детекцију и идентификацију што је основ за постављање дијагнозе болести и предузимање адекватних мера сузбијања.

Имајући у виду све изнето, Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију кандидата Милоша Стевановића, дипл. инж., под насловом: „Идентификација и карактеризација фитопатогених гљива проузроковача болести стабла купине у Србији” и предлаже Наставно-научном већу Пољопривредног факултета, Универзитета у Београду, да ову позитивну оцену усвоји и тиме омогући кандидату да пред истом Комисијом јавно брани докторску дисертацију.

Бероград-Земун

Дана 01.03. 2019. године

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

1. др Горан Алексић, виши научни сарадник
Институт за заштиту биља и животну средину, Београд, председник
(Ужа научна дисциплина: Фитопатологија)

2. др Горан Делибашић, редовни професор
Универзитет у Београду – Пољопривредни факултет, члан
(Ужа научна област: Фитопатологија)

3. др Данијела Ристић, научни сарадник
Институт за заштиту биља и животну средину, Београд, члан
(Ужа научна дисциплина: Фитопатологија)

4. др Бранкица Тановић, виши научни сарадник
Институт за пестициде и заштиту животне средине, Београд, члан
(Ужа научна дисциплина: Фитопатологија)

5. др Михаило Николић, редовни професор
Универзитет у Београду – Пољопривредни факултет, члан
(Ужа научна област: Посебно воћарство)

Универзитет у Београду
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Београд - Земун

Изјава о оригиналности докторске дисертације „Идентификација и карактеризација фитопатогених гљива проузроковача болести стабла купине у Србији”, аутора Милоша Стевановића

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и Извештаја из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације „**Идентификација и карактеризација фитопатогених гљива проузроковача болести стабла купине у Србији**”, аутора Милоша Стевановића, дана 17.01.2019. године, константујем да утврђена количина подударана текста износи 8%. Овај степен подударности последица је цитата, личних имена, библиографских података о коришћеној литератури, тзв. општих места и података, као и претходно публикованих резултата докторандових истраживања, који су проистекли из његове дисертације, што је у складу са чланом 9. овог Правилника.

На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8., став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, изјављујем да извештај указује на оригиналност докторске дисертације, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

У Београду, 17.01.2019. године

Ментори

др Александра Булајић, редовни професор
Универзитет у Београду – Пољопривредни факултет

др Светлана Живковић, виши научни сарадник
Институт за заштиту биља и животну средину, Београд
