

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Tamara Z. Janakiev

**MIKROBIOM ŠLJIVE (*PRUNUS
DOMESTICA* L.) I POTENCIJAL
ODABRANIH IZOLATA ZA
BIOKONTROLU PATOGENA ŠLJIVE**

Doktorska disertacija

Beograd, 2019.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Tamara Z. Janakiev

**PLUM MICROBIOME (*PRUNUS*
DOMESTICA L.) AND POTENTIAL OF
SELECTED ISOLATES FOR
BIOCONTROL OF PLUM
PHYTOPATHOGENS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

MENTOR I ČLANOVI KOMISIJE

Mentor: **Dr Tanja Berić**, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Članovi komisije: **Dr Ivica Dimkić**, naučni saradnik,
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Dr Slaviša Stanković, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Dr Dejan Opsenica, naučni savetnik,
Univerzitet u Beogradu,
Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju

Dr Nikola Unković, naučni saradnik,
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Datum odbrane: _____

Ova doktorska disertacija je realizovana u okviru nacionalnog projekta OI 173026 „Molekularna karakterizacija bakterija iz rodova Bacillus i Pseudomonas kao potencijalnih agenasa za biološku kontrolu” u laboratorijama Katedre za mikrobiologiju i Katedre za algologiju, mikologiju i lihenologiju, Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Ovom prilikom želim da se zahvalim:

Mentoru prof. dr Tanji Berić za uvođenje u naučnoistraživački rad, za stručne savete tokom izrade disertacije, sadržajne diskusije, smernice i korisne primedbe tokom pisanja teze do njenog finalnog oblika.

Dr Ivici Dimkiću na strpljenju i velikoj pomoći tokom izrade eksperimentalnog dela rada, tumačenju rezultata, smernicama tokom pisanja i kritičkoj oceni teze.

Prof. dr Slaviši Stankoviću na ukazanom poverenju, prenetom znanju, stručnim savetima, korisnim sugestijama prilikom pisanja i kritičkoj oceni teze.

Dr Dejanu Opsenici na stručnoj pomoći, korisnim primedbama, sugestijama i kritičkoj oceni teze.

Dr Nikoli Unkoviću za uvođenje u eksperimentalnu mikologiju, pomoći tokom eksperimentalnog rada, korisnim savetima i kritičkoj oceni teze.

Profesorima i saradnicima Katedre za mikrobiologiju dr Jeleni Knežević-Vukčević, dr Branki Vuković-Gačić, dr Biljani Nikolić i dr Dragani Mitić-Ćulafić se zahvaljujem na prenetom znanju i kolegijalnom odnosu u svakodnevnoj saradnji.

Zahvaljujem se profesorima Katedre za biohemiju i molekularnu biologiju dr Đorđu Firi i dr Jeleni Lozo na stručnoj saradnji i savetima.

Takođe, izuzetno sam zahvalna mladom kolektivu Katedre za mikrobiologiju: dr Stoimiru Kolareviću, dr Karolini Sunjog, Bojani Vasilijević, dr Jovani Kostić-Vuković, dr Ivanu Nikoliću, Marini Jovanović, Olji Stanojević, Stefani Cvetković, Stefani Đukanović, Jeleni Đorđević, Tamari Pavlović, kao i Aleksandri Jelušić i Jovani Jovanović Marić za prijateljsku atmosferu na Katedri i druženju van nje.

Zahvaljujem se kolektivu Katedre za algologiju, mikologiju i lihenologiju na stručnoj pomoći i razumevanju tokom dela eksperimentalne izrade ove teze.

Zahvaljujem se dr Tatjani Stević na kolekciji kultivabilnih gljiva koje su odgajene u laboratoriji Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić” i kolegini Svetlani Bojić za pomoć oko bioinformatičke analize podataka. Takođe, dugujem zahvalnost gospodinu Dejanu Stojanoviću na ustupljenom šljiviku u kome su napravljeni prvi koraci ove teze.

Hvala mojoj porodici i mom Marku na neizmernoj podršci, strpljenju i razumevanju!

Mikrobiom šljive (*Prunus domestica* L.) i potencijal odabranih izolata za biokontrolu patogena šljive

Sažetak

Šljiva (*Prunus domestica* L.) ima izuzetan značaj kao voćarska kultura u Srbiji i tradicionalno se prerađuje u rakiju šljivovicu. S obzirom da je godišnji prinos šljive ugrožen različitim bolestima, naročito izazivačima bakterioznog raka i mrke truleži neophodno je naći efikasne agense za njihovo suzbijanje, a naročito alternativu upotrebi hemijskih pesticida. U ovom radu je prvi put analiziran mikrobiom filofere četiri sorte šljive (Čačanska lepotica, Čačanska rodna, Požegača i Ranka), obuhvatajući ranu (maj) i kasnu fenološku fazu (juli) razvića ploda. Indeksi alfa i beta diverziteta su pokazali da su zajednice bile heterogene i da je njihov sastav zavisio od sezone uzorkovanja i sorti šljive. U ukupnoj bakterijskoj zajednici je metagenomskim pristupom utvrđeno da su predstavnici razdela Proteobacteria bili najdominantniji, a najzastupljenije vrste su bile iz rodova: *Methylobacterium*, *Sphingomonas* i *Hymenobacter*. Tradicionalnim kultivabilnim pristupom i analizom sekvenci gena za 16S rRNK identifikovane su *Pseudomonas syringae* i *Pseudomonas graminis* kao najdominantnije vrste. Analiza mikrobioma je ukazala na dominantnu zastupljenost predstavnika razdela Ascomycota. Vrste iz rodova *Aureobasidium* i *Cryptococcus* su bile najučestalije u maju, dok su u julu predstavnici različitih rodova dominirali na sortama šljive (*Cryptococcus*, *Metschnikowia*, *Fusarium* i *Hanseniaspora*). U okviru kolekcije kultivabilnih gljiva, identifikovano je 11 izolata *Monilinia laxa* na osnovu filogenetske analize sekvenci ITS regiona. Odabrani izolati *M. laxa* su prouzrokovali tipične simptome na ubranim plodovima sorti Požegača i Čačanska rodna, a testiranjem potencijalnih bakterijskih patogena su izdvojeni izolati *P. syringae* ČL2/2 i P7/16_2, koji su izazivali nekroze na ubranim listovima šljive svih ispitivanih sorti.

Analizom antagonističkog potencijala kolekcije bakterija i kvasaca poreklom sa sve četiri sorte je izdvojen izolat *Bacillus thuringiensis* R3/3 sa snažnom antibakterijskom aktivnošću protiv autohtonih i referentnih fitopatogena. Karakterizacijom *B. thuringiensis* R3/3 je utvrđeno da ima genetički potencijal da

produkuje kurstakin i N-acil homoserin laktonazu, a u *in vitro* uslovima je pokazana sposobnost za “quorum quenching”, produkciju hidrolitičkih egzoenzima, preživljavanje uslova suše i redukciju rasta fitopatogena u ko-kulturi.

U okviru ove studije prvi put je pokazana antifungalna aktivnost autohtonog izolata *Pseudomonas synxantha* P4/16_1 na *M. laxa*. *In vitro* je utvrđen potencijal za redukciju rasta *M. laxa* u opsegu 80 – 88% kao i za proizvodnju antifungalnih isparljivih organskih jedinjenja i fenazin-1-karboksilne kiseline. Sirovi benzenov ekstrakt *P. synxantha* P4/16_1 je *in vitro* inhibirao rast micelije *M. laxa* u opsegu od 57 do 63%, dok je *ex situ* zabeleženo 100% redukcije rasta *M. laxa* na plodu sorte Ranka. Svetlosnom i skenirajućom elektronskom mikroskopijom su zabeležene *in vitro* morfološke promene na hifama izolata *M. laxa* izazvane punom kulturom i benzenovim ekstraktom *P. synxantha* P4/16_1. HPLC-MS analiza benzenovog ekstrakta je detektovala prisustvo derivata fenazina i strukturnih izomera hidroksibenzojeve kiseline. Pored antifungalne aktivnosti, za *P. synxantha* P4/16_1 je utvrđeno da ima potencijal za preživljavanja suše, intenzivnu produkciju siderofora kao i da ispoljava *in vitro* antibakterijsku aktivnost u formi benzenovog ekstrakta na fitopatogenim sojevima.

Filosfera šljive se pokazala kao dobra osnova za izolaciju dva biokontrolna kandidata sa potencijalom za suzbijanje značajnih bolesti šljive. *Bacillus thuringiensis* R3/3 je pokazao potencijal za dalje istraživanje u biokontroli bakterioza šljive, dok je *P. synxantha* P4/16_1 obećavajući kandidat za ispitivanja potencijalne upotrebe u biološkoj kontroli izazivača mrke truleži.

Ključne reči: diverzitet mikroorganizama, filosfera, šljiva, NGS, *Monilinia laxa*, *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas synxantha*, antagonizam, quorum quenching, fenazini, biološka kontrola

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Mikrobiologija

Plum microbiome (*Prunus domestica* L.) and potential of selected isolates for biocontrol of plum phytopathogens

Abstract

Plum (*Prunus domestica* L.) has a great importance as a fruit crop in Serbia and it is traditionally processed into slivovitz brandy. Considering that the annual plum yield is significantly affected by various pathogens, especially those causing bacterial canker and brown rot, it is necessary to find effective agents for their control, and in particular, an alternative to the chemical pesticides. In this research, microbiome of four plum cultivars phyllosphere (Čačanska lepotica, Čačanska rodna, Požegača i Ranka) was analyzed for the first time, including the early (May) and late phenological stages (July) of fruit development. Alpha and beta diversity indices had shown that the communities were heterogenous and that their composition depended on sampling season and plum cultivars. The metagenomic approach revealed that the representatives of the phylum Proteobacteria were the most dominant in the total bacterial community, and that the most represented species were from the genera: *Methylobacterium*, *Sphingomonas* and *Hymenobacter*. Traditional cultivable approach and 16S rRNA sequence analyses identified *Pseudomonas syringae* i *Pseudomonas graminis* as two most dominant species. Mycobiome analysis revealed the dominance of the phylum Ascomycota representatives. *Aureobasidium* and *Cryptococcus* species were the most abundant in May, while in July representatives of different genera dominated the plum cultivars (*Cryptococcus*, *Metschnikowia*, *Fusarium* and *Hanseniaspora*). From the collection of cultivable fungi, eleven *Monilinia laxa* isolates were identified based on phylogenetic analysis of the ITS region sequences. The selected *M. laxa* isolates caused typical symptoms on the harvested fruits of the Požegača and Čačanska rodna cultivars, and the testing of potential bacterial pathogens revealed *P. syringae* ČL2/2 and P7/16_2 isolates, which caused necrosis on the harvested plum leaves of all tested cultivars.

Antagonistic potential analysis of bacterial and yeast isolates from all four cultivars singled out *Bacillus thuringiensis* R3/3 with strong antibacterial activity against native and reference phytopathogens. Characterization of *B. thuringiensis* R3/3

indicated that isolate had genetic potential to produce kurstakin and N-acyl homoserine lactonase, and has shown the *in vitro* ability of quorum quenching, production of hydrolytic exoenzymes, surviving drought conditions and reducing phytopathogen growth in co-culture.

This study demonstrated, for the first time, the antifungal activity of the indigenous isolate *Pseudomonas synxantha* P4/16_1 against *M. laxa*. The *in vitro* potential of *M. laxa* growth reduction in the range of 80-88%, as well as the production of antifungal volatile organic compounds and phenazine-1-carboxylic acid has been determined. The crude benzene extract of *P. synxantha* P4/16_1 *in vitro* inhibited *M. laxa* mycelium growth in the range of 57 to 63%, while *ex situ* was observed 100% reduction of *M. laxa* growth on Ranka cultivar fruit. Light and Scanning electron microscopy recorded *in vitro* morphological changes on hyphae of *M. laxa* isolates caused by full culture and benzene extract of *P. synxantha* P4/16_1. The HPLC-MS analysis of benzene extract detected the presence of phenazine derivatives and structural isomers of hydroxybenzoic acid. Besides antifungal activity, for *P. synxantha* P4/16_1 has been shown to have the potential for survival of drought, intensive production of siderophores, and that exhibit *in vitro* antibacterial activity in the form of benzene extract on phytopathogenic strains.

The plum phyllosphere has shown to be a good basis for isolating two biocontrol candidates with the potential to suppress significant plum diseases. *Bacillus thuringiensis* R3/3 has shown potential to be further investigated in the biocontrol of plum bacteriosis, while *P. synxantha* P4/16_1 is a promising candidate for trials of potential use in the biological control of brown rot pathogen.

Keywords: microbial diversity, phyllosphere, plum, NGS, *Monilinia laxa*, *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas synxantha*, antagonism, quorum quenching, phenazines, biological control

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Microbiology

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Značaj šljive (<i>Prunus domestica</i> L.)	1
1.2. Metagenomski pristup u analizi diverziteta mikroorganizama	2
1.3. Diverzitet mikroorganizama filofsfe	4
1.4. Bolesti šljive	7
1.4.1. Bakterioze šljive	7
1.4.2. Mrka trulež šljive	8
1.5. Upotreba biološke kontrole protiv fitopatogena	9
1.6. Antagonistički potencijal vrsta roda <i>Bacillus</i>	12
1.7. Antagonistički potencijal vrsta roda <i>Pseudomonas</i>	15
2. CILJEVI RADA	19
3. MATERIJAL I METODE	20
3.1. Materijal	20
3.1.1. Bakterijski sojevi	20
3.1.2. Hranljivi medijumi za gajenje bakterija i gljiva	20
3.1.3. Rastvori za CAS agar	23
3.1.4. Hranljivi medijumi za kvalitativno određivanje produkcije egzoenzima	23
3.1.5. Reagensi za bojenje po Gramu	24
3.2. Metode	25
3.2.1. Uzorkovanje biljnog materijala	25
3.2.2. Izolacija mikroorganizama	27
3.2.3. Metode rada sa DNK	27
3.2.3.1. Izolacija ukupne DNK, priprema biblioteka i NGS sekvenciranje	27
3.2.3.2. Obrada podataka NGS sekvenciranja, taksonomska anotacija i bioinformatička analiza	28
3.2.3.3. Izolacija genomske DNK iz kultivabilnih bakterijskih izolata	29
3.2.3.4. Izolovanje genomske DNK iz kultivabilnih izolata gljiva	30
3.2.3.5. Umnožavanje fragmenata DNK metodom PCR	30
3.2.3.6. Horizontalna elektroforeza DNK na agaroznom gelu	31
3.2.3.7. Filogenetske analize	34
3.2.4. Metode rada sa bakterijama	35
3.2.4.1. Morfološka identifikacija bakterijskih izolata	35

3.2.4.2. Hipersenzitivna reakcija (HR) na listovima duvana.....	35
3.2.4.3. <i>Ex situ</i> testiranje patogenosti autohtonih izolata na listu šljive.....	35
3.2.4.4. <i>In vitro</i> skrining antagonističke aktivnosti izolata.....	36
3.2.4.5. Kvalitativno određivanje produkcije egzoenzima.....	37
3.2.4.6. Testiranje PGPR osobina antagonističkih izolata.....	38
3.2.4.7. Test produkcije biofilma.....	40
3.2.4.8. Test produkcije bakteriocina.....	41
3.2.4.9. Test degradacije AHL signala.....	41
3.2.4.10. <i>In vitro</i> ko-kultivacija izolata R3/3 sa patogenima.....	42
3.2.4.11. <i>In vitro</i> testiranje antibakterijske aktivnosti benzenovog ekstrakta izolata P4/16_1.....	42
3.2.5. Metode rada sa gljivama.....	43
3.2.5.1. Morfološka identifikacija gljiva.....	43
3.2.5.2. <i>Ex situ</i> testiranje patogenosti autohtonih izolata <i>Monilinia laxa</i> na plodu šljive.....	43
3.2.5.3. <i>In vitro</i> testiranje antagonističke aktivnosti bakterija i kvasaca na <i>Monilinia</i> spp.....	44
3.2.5.4. <i>In vitro</i> testiranje antifungalne aktivnosti isparljivih organskih jedinjenja izolata P4/16_1.....	45
3.2.5.5. <i>In vitro</i> testiranje antifungalne aktivnosti benzenovog ekstrakata izolata P4/16_1.....	45
3.2.5.6. Analiza uticaja pune kulture i benzenovog ekstrakata na morfologiju hifa gljiva.....	46
3.2.5.7. Testiranje uticaja pune kulture i benzenovog ekstrakta na redukciju nekroze ploda šljive <i>ex situ</i>	46
3.2.6. Metode izolacije i detekcije antimikrobnih supstanci.....	47
3.2.6.1. <i>In vitro</i> testiranje potencijala izolata P4/16_1 za produkciju fenazin-1-karboksilne kiseline.....	47
3.2.6.2. Izolacija fenazina benzenovom ekstrakcijom.....	48
3.2.6.3. Analiza hemijskog sastava benzenovog ekstrakta izolata P4/16_1.....	48
3.2.7. Statističke analize.....	49
4. REZULTATI.....	50
4.1. Diverzitet mikrobijalnih zajednica filofsere šljive.....	50
4.1.1. Diverzitet bakterijskog mikrobioma.....	50
4.1.1.1. Metagenomski podaci i diverzitet bakterija.....	50
4.1.1.2. Sastav ukupne bakterijske zajednice.....	55

4.1.1.3. Kultivabilna bakterijska zajednica.....	58
4.1.2. Diverzitet mikrobioma.....	65
4.1.2.1. Metagenomski podaci i diverzitet gljiva	65
4.1.2.2. Sastav fungalnih zajednica	70
4.1.2.3. Kultivabilna fungalna zajednica	75
4.1.2.4. Filogenetski status izolata <i>Monilinia</i> spp.	77
4.2. Patogenost izolata filofsere šljive	79
4.2.1. Hipersenzitivnost duvana na izolate <i>Pseudomonas</i> spp.	79
4.2.2. Patogenost bakterijskih izolata na listu šljive	80
4.2.3. Patogenost izolata <i>Monilinia laxa</i> na plodu šljive	83
4.3. Antibakterijski potencijal izolata filofsere šljive	85
4.3.1. Osobine izolata <i>Bacillus thuringiensis</i> R3/3	86
4.3.1.1. Genetički potencijal za produkciju antibiotika i enzima	86
4.3.1.2. Proizvodnja egzoenzima.....	86
4.3.1.3. “Quorum quenching” sposobnost.....	86
4.3.1.4. PGPR osobine.....	87
4.3.1.5. Filogenetski status ..	88
4.3.1.6. Antibakterijska aktivnost u ko-kulturi.....	89
4.4. Antifungalna aktivnost izolata filofsere šljive na <i>Monilinia laxa</i>	91
4.4.1. Osobine izolata <i>Pseudomonas synxantha</i> P4/16_1	92
4.4.1.1. Antifungalna aktivnost isparljivih organskih jedinjenja.....	92
4.4.1.2. PGPR osobine.....	92
4.4.1.3. Filogenetski status	93
4.4.1.4. Genetički potencijal za produkciju antibiotika	94
4.4.1.5. Produkcija fenazin-1-karboksilne kiseline	95
4.4.1.6. Antifungalna aktivnost benzenovog ekstrakta.....	95
4.4.1.7. Antibakterijska aktivnost benzenovog ekstrakta	98
4.4.1.8. Hemijski sastav benzenovog ekstrakta	99
4.4.1.9. Biokontrolni potencijal <i>Bacillus thuringiensis</i> R3/3 i <i>Pseudomonas synxantha</i> P4/16_1 na plodu šljive <i>ex situ</i>	102
5. DISKUSIJA	104
6. ZAKLJUČCI	123
7. LITERATURA	127
8. PRILOZI	150

1. UVOD

1. UVOD

1.1. Značaj šljive (*Prunus domestica* L.)

Rod *Prunus* obuhvata nekoliko ekonomski značajnih vrsta među kojima je i *Prunus domestica* L., voćarska kultura koja se gaji širom sveta (Lino et al., 2016). U Srbiji šljiva ima jako dugu tradiciju gajenja i veliki značaj u voćarstvu kao jednoj od najrentabilnijih grana poljoprivrede. Među proizvođačima u Evropi, Srbija je prva sa 158 000 ha pod šljivicima i sa ukupnom proizvodnjom od 425 441 t za petogodišnji period od 2013 – 2017. godine. Na svetskom nivou Srbija je treća od deset najvećih proizvođača šljive prema podacima Organizacije za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih nacija, FAOSTAT (*engl.* Food and Agriculture Organization of the United Nations). Po broju stabala i godišnjoj proizvodnji, šljiva se u Srbiji nalazi na prvom mestu u voćarstvu (Matković, 2015). Osim upotrebe u svežem obliku, deo godišnjeg prinosa šljive se suši ili koristi za proizvodnju sokova i džemova, ali najveća količina se prerađuje u tradicionalnu rakiju šljivovicu (Milatović et al., 2015). Najznačajnije autohtone sorte šljive u Srbiji, Požegača i Ranka su najbolje sirovine za proizvodnju visokokvalitetne šljivovice. Kako bi se zadržale dobre karakteristike i stvorile otpornije sorte, Požegača je korišćena u programima hibridizacije i formiranja novih sorti u Institutu za voćarstvo u Čačaku. U Institutu su 1961. godine razvijene sorte Čačanska lepotica i Čačanska rodna, hibridi sorte Požegače sa sortama Vangenhajm i Stenlej, redom (Matković et al., 2015; Milošević & Milošević, 2012). Obe navedene hibridne sorte se takođe mogu koristiti za proizvodnju rakije. S obzirom na to da se najveći deo godišnjeg prinosa šljive utroši na proizvodnju rakije šljivovice, poznavanje mikrobiote šljive, pre svega različitih fermentativnih mikroorganizama, može biti od značaja za tehnologiju prerade ploda šljive do konačnog proizvoda. Brojnost stabala autohtonih vrsta šljive opada tokom godina zbog čestih bolesti. Od bakterioza koje se detektuju na šljivi, najrazornija bolest je bakteriozni rak šljive koji dovodi do sušenja grana, a vremenom i do odumiranja čitavih stabala (Gavrilović, 2009). Pored bakterioza, šljiva je u Srbiji izuzetno pogođena mrkom truleži koja najveće probleme izaziva na zrelim plodovima u periodu pre ubiranja, ali takođe i u skladišnim uslovima (Hrustić et al.,

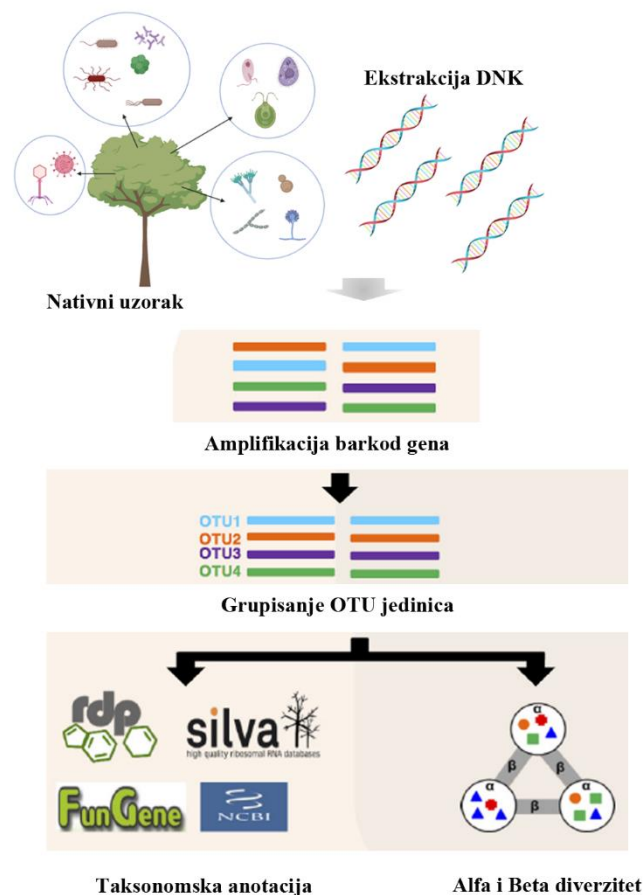
2015). S tim u vezi, utvrđivanje nativnog mikrobioma zdravih, hemijski netretiranih zasada može nam dati uvid u ravnotežu sastava i interakcija mikroorganizama, prisustvo bakterijskih i fungalnih patogena, ali i komensalnih mikroorganizama koji različitim mehanizmima mogu vršiti biokontrolu patogena.

1.2. Metagenomski pristup u analizi diverziteta mikroorganizama

Mikrobiom predstavlja zajednicu mikroorganizama koji naseljavaju određeno stanište. Proučavanje mikroorganizama i njihova identifikacija se dugi period zasnivala na tradicionalnom kultivabilnom pristupu. Mikroorganizmi su izolovani i gajeni na različitim hranljivim medijumima kako bi se morfološki okarakterisali, utvrdile njihove fiziološke i nutritivne potrebe, i na taj način je opisivan samo mali procenat ukupne zajednice mikroorganizama. Sa uvođenjem sekvenciranja gena za ribozomalne RNK i njihove analize kao načina da se detektuju i nekultivabilni mikroorganizmi u staništu, započeto je novo poglavlje u istraživanju diverziteta mikroorganizama (Riesenfeld et al., 2004).

Sa uvođenjem DNK barkodinga molekularna identifikacija postaje preciznija i sveobuhvatnija jer se koriste barkod geni tj. kratki genetički markeri za identifikaciju taksona, bez potrebe za gajenjem. Metagenomika amplikona, ili metabarkoding, podrazumeva umnožavanje i sekvenciranje specifičnih barkod regiona kao što su 16S rRNK za bakterije, 18S rRNK za većinu eukariota i ITS region (*engl.* internal transcribed spacer) za gljive. Metabarkoding analize tehnički omogućavaju da se identifikuju svi mikrobijalni taksoni prisutni u istraživanom prirodnom uzorku. Pored sekvenciranja barkod regiona, koristi se i pristup tzv. „shotgun” sekvenciranja i analize čitavih genoma mikroorganizama iz prirodnog uzorka, što se obično definiše kao metagenomika u užem smislu (Abdelfattah et al., 2018). Jedna od prvih platformi naredne generacije koje su korišćene za masovno sekvenciranje amplikona bila je Roche 454 poznata i kao pirosekvenciranje. Danas je ova platforma zastarela i sada se najčešće koriste MiSeqTM, NextSeqTM i HiSeqTM Illumina[®] platforme (San Diego, SAD), a takođe i platforme poput IonTorrentTM i IonProtonTM Thermo Fisher Scientific[®] proizvođača (Waltham, SAD) (Quince et al., 2017).

Upotreba metabarkodinga u opisivanju mikrobijalnih zajednica, bez obzira na platformu koja se koristi, zasniva se na: uzorkovanju, ekstrakciji DNK, amplifikaciji target gena, sekvenciranju i analizi podataka (Slika 1). Dobijeni podaci se obrađuju pomoću nekoliko softverskih paketa među kojima su najčešće korišćeni QIIME, MOTHUR i OBITOOLS (Boyer et al., 2016). Dobijene sekvence se filtriraju kako bi se izdvojile sekvence nezadovoljavajućeg kvaliteta, uklanjaju se himere i grupišu se sekvence sa visokim stepenom sličnosti, uobičajeno 97% i više, čime se formiraju operativne taksonomske jedinice (*engl.* Operational Taxonomic Unit, OTU) (Huse et al., 2010). Klasifikacija reprezentativnih OTU jedinica na različite taksonomske kategorije (razdeo, klasa, red, familija, rod i vrsta) se vrši upoređivanjem sa bazama podataka kao što su Greengenes, SILVA i RDP (*engl.* Ribosomal Database Project) (McDonald et al., 2012; Kõljalg et al., 2013; Quast et al., 2013).



Slika 1. Proces uzorkovanja, sekvenciranja i analize podataka u metodi metabarkodinga. (Preuzeto i adaptirano iz Choi et al., 2015.)

Analiza OTU podataka podrazumeva i određivanje alfa i beta diverziteta zajednica testiranih uzoraka (Abdelfattah et al., 2018). Alfa diverzitet opisuje diverzitet unutar pojedinačnih uzoraka, dok beta diverzitet opisuje diverzitet između različitih uzoraka. Za opisivanje alfa diverziteta se određuje broj uočenih vrsta OTU jedinica koje su detektovane u uzorku (*engl.* observed OTU, OBS), dok ACE (*engl.* Abundance-based Coverage Estimator) i Chao1 indeksi procenjuju bogatstvo različitih OTU jedinica, nasuprot Shannon i Simpson indeksima kojima se opisuje diverzitet unutar uzorka (Kim et al., 2017). Beta diverzitet se može prikazati kroz različite parametre, a najčešće se određuje Analizom glavnih koordinata (*engl.* Principal Coordinates Analysis, PCoA), nepoteznom UPGMA klasterizacijom (*engl.* Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean clustering), kao i analizom redundantnosti (*engl.* Redundancy Analysis, RDA) (Liu et al., 2016).

1.3. Diverzitet mikroorganizama filofsere

Filosfera obuhvata površinu i unutrašnjost nadzemnih delova biljaka, uključujući stablo, listove, cvetove i plodove. Predstavlja jedno od najvećih staništa mikroorganizama i procenjeno je da ukupna površina listova na globalnom nivou veća od 10^8 km², i da je svaki km² naseljen sa 10^{16} – 10^{18} bakterija. Za sada ne postoje podaci o brojnosti drugih mikroorganizama (Penuelas & Terradas, 2014). Dominantno je naseljena bakterijama, ali su takođe prisutne i filamentozne gljive, kvasci, protisti, arhee i virusi. Mikroorganizmi filofsere su izloženi veoma nepovoljnim uslovima sredine kao što su: visoko UV zračenje, velike temperaturne amplitude, prisustvo reaktivnih kiseoničnih vrsta (*engl.* Reactive Oxygen Species, ROS), smanjena dostupnost nutrijenata i vode (Magan, 2006; Müller & Ruppel, 2014). Takođe, mikroorganizmi su izloženi promenama tokom fenoloških faza jednogodišnjih i višegodišnjih biljaka, koje podrazumevaju i odbacivanje listova, pa se filofsfera može smatrati efemernom sredinom (Vorholt et al., 2012).

Filosfera je dugo bila slabo istražena životna sredina i saznanja o mikroorganizmima u njoj su se zasnivala na kultivabilnom pristupu i uglavnom su bila ograničena na izolovanje fitopatogena od poljoprivrednog značaja (Montarry et al.,

2008). Pored fitopatogena kao najistraženije interesne grupe unutar mikrobioma, većina mikroorganizama filofsere zapravo žive kao komensali. Smatra se da oni imaju ključnu ulogu u ciklusu kruženja elemenata i da mogu imati pozitivan efekat na biljku domaćina kroz promociju rasta biljke, kao biofertilizatori i kao biokontrolni agensi u borbi protiv fitopatogena (Newton et al., 2010; Müller & Ruppel, 2014). Navedeni pozitivni efekti povećavaju fitnes prirodnih populacija biljaka čime se povećava kvalitet i prinos poljoprivrednih kultura (Whipps et al., 2008).

Istraživanja o zajednicama mikroorganizama filofsere su doživela ekspanziju sa razvojem metagenomskih tehnika. U prethodnoj deceniji su metagenomskim pristupom istraživani mikrobiomi u različitim životnim sredinama, ali je fokus uglavnom bio na zemljištu i rizosferi. Unutar filofsere su najviše istražene zajednice bakterija i njihove funkcionalne uloge u filosferi. Prema dosadašnjim studijama utvrđeno je da bakterijske zajednice filofsere dominantno sačinjavaju pripadnici razdela Proteobacteria, a zatim i vrste iz razdela Actinobacteria, Bacteroidetes i Firmicutes. Sastav bakterijskih zajednica zavisi od biljke domaćina i brojnih drugih faktora, ali je utvrđeno da su predstavnici klase α -Proteobacteria predominantni i opšteprisutni u mikrobiomu filofsere. *Methylobacterium* i *Sphingomonas* su najčešći rodovi unutar pomenute klase (Schlechter et al., 2019). Pored α -Proteobacteria, nekada se i vrste rodova *Pseudomonas* i *Pantoea*, iz klase γ -Proteobacteria, detektuju kao dominantne u bakterijskim zajednicama filofsere (Vacher et al., 2016).

Korišćenje metabarkodinga za opisivanje diverziteta gljiva je u začetku i baze podataka su za sada skromne. Poslednjih godina su urađene studije diverziteta gljiva filofsere paradajza, grožđa, topole, masline, jabuke i jagode (Ottesen et al., 2013; Pinto et al., 2014; Abdelfattah et al., 2015; Abdelfattah et al., 2016). Dosadašnje metagenomske studije su utvrdile da je unutar fungalnih zajednica filofsere razdeo Ascomycota dominantan, sa vrstama rodova *Cladosporium*, *Taphrina* i *Aureobasidium*. Kvasci *Cryptococcus* i *Sporobolomyces* iz razdela Basidiomycota su takođe veoma brojni (Vacher et al., 2016).

Mikrobiom biljaka je prepoznat kao ključni faktor u prevenciji bolesti biljaka. Protokoli zasnovani na metagenomskom pristupu predstavljaju odličan istraživački alat, koji pruža informacije, koje mogu biti implementirane u strategiji zaštite biljaka. Jedna

od strategija zaštite od fitopatogena bi bila upotreba populacije autohtonih antagonista (Abdelfattah et al., 2018). Pored toga što su metagenomske analize omogućile upoznavanje ukupnog diverziteta i identifikaciju taksonomskih jedinica unutar čitave zajednice mikroorganizama u prirodnim uzorcima, tradicionalni kultivabilni metod je i dalje nezaobilazan kako bi se vrste u potpunosti okarakterisale (Gonzalez-Rocha et al., 2017) i koristile kao biostimulansi, biofertilizatori, odnosno biokontrolni agensi ili da bi se ispitala njihova patogenost na biljkama.

Iako šljiva ima izuzetan poljoprivredni značaj i dugu istoriju gajenja, ukupne zajednice mikroorganizama su retko istraživane. Ranije studije o bakterijama na šljivi bavile su se istraživanjima najbitnijih patogena: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* i *P. syringae* pv. *monsprunorum* izazivača bakterioznog raka, *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*, izazivača bakteriozne pegavosti i *Erwinia amylovora* izazivača plamenjače šljive (Palacio-Bielsa et al., 2011; Wenneker et al., 2012; Vègh et al., 2012). Istraživanja ukupnog bakterijskog diverziteta filofsere šljive su ograničena na dva istraživanja. Karakterizacija bakterijskog mikrobioma listova šljive primenom 454 pirosekvenciranja, u okviru istraživanja u kome je određivan i diverzitet mikrobioma listova drugih voćnih kultura iz roda *Prunus* (trešnje, kajsije i breskve) u Južnoj Koreji, objavljena je u radu Jo et al. (2015). Sukcesija kultivabilnih bakterija tokom razvića ploda na sortama Stenlej i Prezident u Zapadnoj Virdžiniji (SAD) je ispitivana u radu Janisiewicz et al. (2013). Takođe, informacije o diverzitetu gljiva na šljivi se zasnivaju na podacima o prisustvu individualnih vrsta i dosadašnje studije su bile zasnovane na izolaciji patogena izazivača mrke truleži (Poniatowska et al., 2012; Hrustić et al., 2015). Za sada ne postoje literaturni podaci o primeni metabarkodinga u analiziranju ukupnog diverziteta gljiva filofsere šljive.

1.4. Bolesti šljive

1.4.1. Bakterioze šljive

Veliki broj fitopatogenih bakterija detektovan je na šljivi kao domaćinu, ali samo je nekoliko ekonomski zaista značajnih bakterioza. Bakteriozni rak je razarajuća bolest različitih vrsta roda *Prunus* i njeno prisustvo je zabeleženo u svim većim područjima proizvodnje koštuničavog voća. Izazivači bakterioznog raka su dva patovara, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (van Hall) i *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* (Wormald) (Wenneker et al., 2012). Simptomi bakterioznog raka su pegavost listova, nekroza i palež pupoljaka, sušenje grančica, rak grana i stabla i nekrotične lezije plodova. Patogeni preživljavaju zimu u rak ranama i u dormantnim pupoljcima. Tokom proleća prelaze u epifitsku fazu kada kolonizuju listove, cvetove i mlade plodove. Infekcija se širi kroz oštećeno biljno tkivo, što omogućava patogenu prodiranje unutar biljke i ispoljavanje patogenosti u uslovima visoke vlažnosti (Scortichini, 2010). Pojava oba patovara je detektovana i u šljivicima u Srbiji gde su zabeležene ozbiljne nekroze stabala (Gavrilović, 2009).

Pored *P. syringae* još dva bakterijska patogena mogu biti značajni za filosferu šljive. *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (nekada *X. campestris* pv. *pruni*) je izazivač bakteriozne pegavosti i nalazi se na listi karantinskih organizama prema Evropskoj i mediteranskoj organizaciji za zaštitu bilja (*engl.* European and Mediterranean Plant Protection Organization, EPPO). Detektovano je njeno širenje u velikom broju evropskih zemalja gde dovodi do značajnih šteta unutar roda *Prunus*. Simptomi su pege na listovima i plodovima, šupljikavost listova i rak stabla (Palacio-Bielsa et al., 2011). Takođe, na EPPO listi karantinskih organizama nalazi se i izazivač bakteriozne plamenjače *E. amylovora* čiji su pravi domaćini jabuka i kruška. Uočeno je širenje ove bolesti i na *P. domestica* sa simptomima tipičnim za bakterioznu plamenjaču, zahvaćeni su listovi i grane, sa tipičnom mrkom ili crnom bojom sasušenih pupoljaka (Végh et al., 2012).

1.4.2. Mrka trulež šljive

Rod *Prunus* je domaćin velikog broja patogenih gljiva, ali je mrka trulež koju izazivaju vrste roda *Monilinia*, najštetnija i ekonomski najznačajnija bolest koštuničavog voća. *Monilinia* vrste mogu inficirati različite delove biljke izazivajući palež cvetova, sušenje grana i mrku trulež na nezrelim i zrelim plodovima, u najosetljivijoj fenološkoj fazi domaćina. Bolest se razvija u uslovima visoke temperature i vlažnosti. Od 35 vrsta u sastavu roda *Monilinia*, prepoznate su tri vrste koje su ekonomski najznačajniji patogeni koštuničavog voća: *Monilinia fructicola* (G. Winter) Honey, *Monilinia laxa* (Aderh. & Ruhland) Honey i *Monilinia fructigena* (Pers.) Honey. *Monilinia laxa* i *M. fructigena* su zabeležene kao patogeni u Evropi, dok je *M. fructicola* rasprostranjena u Americi, Australiji, Novom Zelandu i delovima Azije. Iako je *M. laxa* prepoznata kao glavni prouzrokovatelj mrke truleži na koštuničavom voću u Evropi, ova vrsta je detektovana u poslednje dve decenije i širom sveta, uključujući Brazil, SAD, Kinu i Iran gde je karantinska gljiva (Lino et al., 2016).

U Srbiji je utvrđeno da je *M. laxa* najzastupljenija vrsta roda *Monilinia* u voćnjacima. U manjem procentu je prisutna i *M. fructigena*, dok je u novije vreme potvrđeno i prisustvo *M. fructicola* koja se nalazi na EPPO listi karantinskih štetnih organizama za područje Evrope (Hrustić et al., 2015). Mrka trulež stvara velike probleme, naročito u periodu posle ubiranja plodova. Učestalost vrsta roda *Monilinia* u voćnjaku određuje intenzitet bolesti koja nastaje nakon ubiranja, tako da je tretiranje u voćnjaku jedno od bitnih prevencija za kasnije širenje ove patogene gljive. Mrka trulež se konvencionalno kontroliše upotrebom pesticida, ali je primećena pojava razvoja rezistencije na pesticide (Lino et al., 2016).

1.5. Upotreba biološke kontrole protiv fitopatogena

Patogene bakterije i gljive dovode do gubitaka oko 10% svetske proizvodnje različitih useva dovodeći do velikih ekonomskih gubitaka (Arora et al., 2012). Bez mera kontrole, koje se primenjuju, ovaj procenat bi bio značajno veći, i zajedno sa kvarenjem hrane u skladištima bi mogao postati kritičan, naročito u siromašnim delovima sveta (Strange & Scott, 2005; Oerke, 2006). Za suzbijanje fitopatogena danas se najviše koriste konvencionalni hemijski pesticidi. Međutim, preterana i nekontrolisana upotreba pesticida, dovela je do povećanja gubitaka u prinosu useva usled razvoja rezistentnosti patogenih mikroorganizama, što je zajedno sa uticajem globalnih klimatskih promena, otvorilo prostor pojavi čestih i nekada netipičnih izbijanja bolesti (Oerke, 2006). Pored pojave rezistencije, javlja se potreba i namera na globalnom nivou da se pronade drugačiji način zaštite useva, zbog negativnog efekta koje hemijski pesticidi imaju po ljudsko zdravlje i životnu sredinu (Raio et al., 2017). Naime, mikrobiološka i hemijska degradacija pesticida u zemljištu je izuzetno spora i preterana upotreba dovela je do trajnog zagađenja zemljišta i podzemnih voda, te njihovog usvajanja od strane biljaka i ulaska u lanac ishrane (Sanchez-Bayo & Tennekes, 2015). Takva akumulacija pesticida u biljkama, hrani i masnom tkivu ljudi i životinja predstavlja ozbiljan zdravstveni rizik. Jedan od alternativnih načina za suzbijanje štetnih organizama je biološka kontrola, koja uključuje upotrebu mikroorganizama sa antagonističkom aktivnošću protiv patogena ili njihovih produkata – biokontrolnih agenasa (Janisiewicz et al., 2000; Fira et al., 2018). Pored odsustva negativnog efekta na životnu sredinu, biokontrolni agensi su često aktivni pri niskim koncentracijama i obično imaju specifično dejstvo, tj. deluju ciljano na određenu grupu organizama, ali i tada ne izazivajući totalnu eliminaciju patogena što ima značajne ekološke implikacije. Svoje dejstvo biokontrolni agensi mogu ispoljiti kroz više mehanizama pa se time i mogućnost razvoja rezistencije svodi na minimum.

Mehanizmi kojim biokontrolni agensi ostvaruju svoju aktivnost su:

- ✓ Kompeticija za prostor i nutrijente, koja se redovno dešava u prirodnim staništima gde su resursi često u deficitu. Antagonisti imaju potencijal da proizvode različite enzime kojima razgrađuju nutrijente, sintetišu siderofore kojima usvajaju gvožđe kao mikronutrijent i čine ga nedostupnim za patogene mikroorganizme (Köhl et al., 2019).

- ✓ Produkcija antimikrobnih jedinjenja sa inhibitornom aktivnošću je vid direktnog antagonizma sa patogenima - antibioza. Brojni biokontrolni sojevi koje pripadaju bakterijskim rodovima *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces*, i mnogim drugim, proizvode veoma širok spektar hemijski različitih aktivnih jedinjenja (Köhl et al., 2019).
- ✓ Parazitizam je direktna kompetitivna interakcija između antagoniste i patogena u kome antagonista usvaja hranljive materije od patogena. Ovaj mehanizam je češći kod gljiva kod kojih je slučaj da se npr. kvasci adheriraju na hife filamentoznih gljiva i produkuju različite enzime (hitinaze, glukonaze, proteinaze) pomoću kojih razgrađuju ćelijski zid gljiva i usvajaju hranljive materije (Sharma et al., 2009).
- ✓ Indukcija sistemske rezistencije kod biljke domaćina - mehanizam kojim bakterije i gljive u rizosferi kroz produkciju metabolita stimulišu biljku da inicira sopstvene mehanizme odbrane od patogena i herbivora. Veoma različiti članovi rizosfere učestvuju u indukciji sistemske rezistencije, kao što su vrste rodova *Pseudomonas*, *Bacillus* i *Trichoderma* (Pieterse et al., 2014).

Mikroorganizmi sa antagonističkom aktivnošću su izolovani iz različitih izvora, a najčešće iz zemljišta i sa biljaka. Kao što je navedeno, u rizosferi su mikroorganizmi izloženi različitim stresnim uslovima. Sposobnost preživljavanja u takvim uslovima je od osnovnog značaja za razvijanje uspešnog biokontrolnog agensa. Zato se smatra da je mikrobiom biljaka najbolji izvor antagonističkih mikroorganizama efikasnih u kontroli fitopatogena (Janisiewicz et al., 2013). Bakterije i kvasci su favorizovani kao biokontrolni agensi jer proizvode veliki broj bioaktivnih komponenti i zahtevaju minimum uslova za rast što ih čini odličnim kandidatima za proizvodnju preparata na industrijskom nivou (Rungjindamai et al., 2013). Među bakterijama, vrste rodova *Bacillus* i *Pseudomonas* su najviše istraživani antagonisti i veliki je broj komercijalnih biopesticida zasnovanih na njima (Tabela 1). Koriste se za tretiranje u polju i plastenicima kako bi se smanjile posledice bolesti raznih useva prouzrokovane zemljišnim i folijarnim patogenima ili onima koji se razvijaju posle žetve (Ongena & Jacques, 2008; Meena, 2014).

Tabela 1. Komercijalni biopesticidi zasnovani na sojevima *Bacillus* spp. i *Pseudomonas* spp.

Biopesticid	Antagonista	Ciljni patogen	Proizvođač
Bacillus SPP®	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> i <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	Bio Insumos Nativa Ltda., Čile
Ballad®	<i>Bacillus pumilus</i>	Širok opseg gljiva	AgraQuest Inc., SAD
EcoGuard™ Biofungicide	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Colletotrichum graminicola</i> i <i>Sclerotinia homeocarpa</i>	Novozymes A/S, Danska Novozymes Biologicals, SAD
RhizoVital®42 RhizoVital 42TB	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Zemljišni patogeni	ABiTEP GmbH, Nemačka
Serenade®	<i>Bacillus subtilis</i>	Širok opseg gljiva	AgraQuest Inc., SAD
BioSave	<i>Pseudomonas syringae</i> ESC-100	<i>Botrytis cinerea</i> <i>Geotrichum candidum</i>	Eco Science Crop, Produce Systems Div., SAD
Blight Ban A506	<i>Pseudomonas fluorescens</i> A506	<i>Erwinia amylovora</i>	Plant Health Technologies, SAD
Cedomon	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<i>Fusarium</i> sp.	BioAgri AB, Švedska
Conquer	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas tolaasii</i>	Mauri Foods, Australija
Victus	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas tolaasii</i>	Mauri Foods, Australija
BioJect Spotless	<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	<i>Pythium aphanidermatum</i>	Eco Soil Systems, San Diego, SAD
Deny	<i>Pseudomonas cepacia</i>	<i>Rhizoctonia</i> sp. <i>Fusarium</i> sp. <i>Pythium</i> sp.	Stine Microbial Products, SAD
Intercept	<i>Pseudomonas cepacia</i>	<i>Rhizoctonia</i> sp. <i>Fusarium</i> sp. <i>Pythium</i> sp.	Soil Technologies Corp, SAD
Biocoat	<i>Pseudomonas fluorescens</i> WCS374r	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i> <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i>	S&G seeds, BV, Holandija

*Preuzeto i adaptirano iz Cawoy et al. (2011) i Meena (2014).

1.6. Antagonistički potencijal vrsta roda *Bacillus*

Poslednjih godina, brojne studije su se bavile istraživanjima posvećenim vrstama roda *Bacillus* u svrhu kontrole brojnih bolesti različitih biljnih domaćina. Razlozi za to su brojni, a jedan od osnovnih je svakako to što je pokazano da sojevi *Bacillus* spp. ispoljavaju gotovo sve biokontrolne i biostimulativne mehanizme, kao i efekte na fertilizaciju biljaka (Cawoy et al., 2011). Rod *Bacillus* obuhvata gram-pozitivne i katalaza pozitivne bakterije, sa kosmopolitskom rasprostranjenošću u vrlo različitim ekološkim nišama, od morske vode, zemljišta pa do ekstremnih staništa (Price et al., 2007). Članovi ovog roda imaju sposobnost da se brzo umnožavaju i u nepovoljnim uslovima sredine formiraju endospore. Spadaju u najistraženiju grupu antagonista čija je aktivnost zasnovana na potencijalu da produkuju širok opseg sekundarnih metabolita, gde je Stein (2005) dao procenu da 5% ukupnog genoma *B. subtilis* učestvuje u biosintezi nekog antimikrobnog jedinjenja. Ispostavilo se da je to konzervativna procena s obzirom na to da je utvrđeno da je kod biokontrolnog soja *B. velezensis* FZB42 (ranije *B. amyloliquefaciens* FZB42) 13 genskih klastera (oko 10% ukupnog genoma) uključeno u sintezu antimikrobnih jedinjenja (Fan et al., 2018). Kod još jednog komercijalnog biokontrolnog soja, *B. velezensis* QST 713, identifikovano je čak 15 biosintetskih genskih klastera (12% genoma) uključenih u sintezu, regulaciju i transport antimikrobnih jedinjenja (Pandini et al., 2018).

Trenutno najizučavaniji aspekt antimikrobne aktivnosti *Bacillus* spp. je direktni inhibitorni uticaj na patogene putem antibioze, posredstvom antimikrobnih supstanci. Grupa antimikrobnih jedinjenja karakteristična za vrste roda *Bacillus* su neribozomalno sintetisana lipopeptidna jedinjenja koja uključuju: bacilomicine, iturine, surfaktine, fengicine i kurstakine. Surfaktini, fengicini i iturini su detaljno istraženi zbog širokog spektra aktivnosti protiv različitih fitopatogena. Pored antimikrobne aktivnosti, ovi molekuli imaju ključnu ulogu u interakcijama *Bacillus* spp. sa biljkama kroz stimulisane njihove odbrambene mehanizme (Ongena & Jacques, 2008). Pored lipopeptida, *Bacillus* proizvodi i bakteriocine, antimikrobne peptide koji su ribozomalno sintetisani. Najveći deo bakteriocina koje proizvodi *Bacillus* pripada lantibioticima, ali takođe proizvode i druge nemodifikovane bakteriocine. Poznata je njihova ne samo antibakterijska, već i antifungalna aktivnost (Abriouel et al., 2011; Fira et al., 2018).

Pored produkcije antimikrobnih jedinjenja, vrste roda *Bacillus* su takođe i kompetitori za prostor i nutrijente sa patogenim mikroorganizmima prilikom kolonizacije biljke domaćina. Imaju sposobnost da sintetišu veliki broj različitih egzoenzima poput proteaza, nukleaza, lipaza i dr. (Schallmey et al.; 2004, Berić et al., 2009) koji im omogućavaju da iskoriste nutrijente koji su nalaze u nedostupnom obliku. Pored toga, mogu proizvoditi i enzime koji im mogu pomoći u osvajanju niša antagonističkim dejstvom prema drugim mikroorganizmima (hitinaze i β -1,3-glukanaze koje vrše razgradnju glavnih komponenti ćelijskog zida patogenih gljiva) (Manjula & Podile, 2005; Li et al., 2008). Pored navedenog, vrste roda *Bacillus* imaju sposobnost sinteze siderofora koje vezuju gvožđe, kao jedan od esencijalnih mikronutrijenata koji je često ograničen, visokim afinitetom i pri niskim koncentracijama što predstavlja značajnu kompetitivnu prednost (Liu et al., 2017; Ferreira et al., 2019). Mikroorganizmi koji imaju sposobnost formiranja biofilma su uspešni u kompeticiji za prostor. Kapacitet za formiranje biofilma i brza kolonizacija rizosfere fizički mogu da spreče kontakt patogena i biljke domaćina i na taj način spreče infekciju, što je pokazano za *B. subtilis* soj koji stvaranjem biofilma sprečava infekciju *Arabidopsis thaliana* bakterijom *P. syringae* (Bais et al., 2004).

Iskorišćavanje nutrijenata i brza kolonizacija daju prednost antagonisti u odnosu na patogena prilikom kolonizacije biljke domaćina (Shafi et al., 2017). Pored direktnog antagonizma, vrste roda *Bacillus* učestvuju i u procesima stimulanja rasta biljaka (*engl.* plant growth promoting, PGP). Neki od PGP mehanizama obuhvataju sintezu hormona koji utiču na razviće biljaka, kao što je indol-3-sirćetna kiselina, i na solubilizaciju neorganskog fosfata obezbeđujući biljci nedostupan fosfat (Santoyo et al., 2012). Imaju sposobnost da indukuju mehanizme sistemske rezistencije biljke, pospešujući na taj način imunitet same biljke protiv fitopatogena (Shafi et al., 2017).

Najveći broj istraživanja *B. thuringiensis* je zasnovan na ispitivanju njegove insekticidne aktivnosti zbog potencijala da produkuje parasporalne kristale, efikasne protiv različitih štetnih insekata iz redova Lepidoptera, Diptera i Coleoptera. Razvijeno je preko 100 različitih insekticida zasnovanih na prirodnim i genetički modifikovanim sojevima *B. thuringiensis* (Zhou et al., 2008). Oko 70% svih biokontrolnih preparata dostupnih na tržištu je bazirano na sojevima *B. thuringiensis* (Cawoy et al., 2011). Insekticidna aktivnost *B. thuringiensis* je target specifična i dokazan je kao ekološki

bezbedan insekticid, bez efekata na nespecifične organizme. Pored duge istorije upotrebe kao bioinsekticida, sve je više podataka o njegovoj ulozi u kontroli bolesti biljaka (Wang et al., 2014). *Bacillus thuringiensis* je producent antimikrobnih jedinjenja sa potencijalom za primenu protiv patogenih bakterija i gljiva, kao što su cvitermicin A (Athukorala et al., 2009) i turicin (Salazar-Marroquín et al., 2016). Takođe, familija lipopeptida kurstakina je tipična za ovu vrstu i smatra se biomarkerom jer je kurstakinski klaster detektovan u svim dostupnim genomima *B. thuringiensis* i *B. cereus* (Béchet et al., 2012). Pored kurstakina, kod ove vrste detektovan je i potencijal da produkuju lipopeptide iz klase fengicina (Kim et al., 2004).

Pored produkcije antimikrobnih jedinjenja, za neke sojeve *B. thuringiensis* je utvrđeno da proizvode enzime acil homoserin laktonaze koje mogu da ometaju proces „quorum sensing”-a (QS) (Dong et al., 2002). QS podrazumeva komunikaciju između bakterijskih ćelija kako bi se sinhronizovalo i koordinisalo njihovo ponašanje i zasniva se na malim signalnim molekulima. Kada se dostigne kritični nivo signalnih molekula pokreće se ekspresija gena uključenih u QS odgovor (LaSarre & Federle, 2013). Različite vrste bakterija proizvode različite tipove QS signala ali, izgleda da postoje samo dva glavna mehanizma za detekciju i odgovor na signale. Jedan od tih mehanizama je predstavljen acil homoserin lakton (AHL)-zavisnim QS sistemima u kojima se signal detektuje preko citoplazmatskog transkripcionog faktora. AHL-zavisni QS proces se može podeliti u nekoliko ključnih koraka: generisanje bazalnog nivoa signala, akumulacija signala, recepcija signala, signalna autoindukcija i aktivacija target gena, i nestajanje signala (Dong et al., 2007). Mnogi biljni patogeni koriste mehanizam QS kako bi procenili veličinu svoje populacije i tako regulišu ekspresiju virulentnih faktora u pravo vreme. Mehanizam utišavanja QS ili „quorum quenching” (QQ) je prepoznat kao efikasan mehanizam suzbijanja patogenosti kod bakterija koji se može iskoristiti i za zaštitu useva (Grandclément et al., 2015). Strategije mehanizama QQ mogu biti različite i ciljati bilo koji od koraka QS procesa. Jedan od efikasnih načina interferencije QS signala je razgradnja signalnih molekula dejstvom odgovarajućih enzima, AHL laktonaza (Dong et al., 2007).

Pored dokazane biokontrolne aktivnosti zasnovane na različitim mehanizmima, sposobnost formiranja spora sa tehnološke tačke gledišta ih čini odličnim kandidatima za razvijanje formulacije biopesticida. Mogućnost formiranja spora ne samo da

omogućava potencijalnom biokontrolnom soju preživljavanje nepovoljnih uslova i samim tim produženo delovanje na tretiranu biljnu kulturu (a time i energetske i ekonomsku uštedu dodatnog tretiranja useva i sve ekološki negativne posledice toga), već i manje zahtevno skladištenje, duži rok trajanja i lakšu manipulaciju (Fira et al., 2014).

1.7. Antagonistički potencijal vrsta roda *Pseudomonas*

Rod *Pseudomonas* obuhvata gram-negativne i katalaza pozitivne bakterije štapićastog oblika koje ne formiraju spore. To je kosmpolitski rod sa vrstama koje su izolovane iz veoma različitih ekoloških niša. Kao i rod *Bacillus*, sadrži veliki broj vrsta sa antagonističkom aktivnošću i na nekima su zasnovani i proizvedeni komercijalni biokontrolni agensi (Tabela 1). Vrste roda *Pseudomonas* imaju različite genetičke i fenotipske karakteristike koje ih čine uspešnim antagonistima. Antibiozu ispoljavaju kroz produkciju različitih antimikrobnih jedinjenja kao što su cijanovodonik, derivati fenazina, pirolnitrin, pioluteorin, 2,4-diacetilfloroglukinol (DAPG) i ciklični lipopeptidi (Mishra & Arora, 2018). Jedinjenja iz grupe fenazina koje vrste roda *Pseudomonas* najčešće proizvode su piocijanin, fenazin-1-karboksilna kiselina, fenazin karboksamid i brojni hidroksi-fenazini (Chin-A-Woeng et al., 2003).

Fenazini su jedinjenja čije jezgro čini 1,4-diazabenzen i velika su grupa redoks-aktivnih sekundarnih metabolita. Produkuju se u stacionarnoj fazi rasta pri velikim gustinama ćelijske populacije i predstavljaju strategiju preživljavanja u prirodnom staništu. Identifikovano je nekoliko mehanizama pomoću kojih fenazini ostvaruju aktivnost: redukcija kiseonika u ROS, učestvovanje u homeostazi gvožđa kroz redukciju Fe (III), interkalacija u lanac molekula DNK i formiranje biofilma. Za fenazine je takođe utvrđeno da imaju različite aktivnosti među kojima su i antibakterijska, antifungalna i insekticidna (Guttenberger et al., 2017).

Pored pomenutih jedinjenja, *Pseudomonas* vrste produkuju i isparljiva organska jedinjenja (*engl.* Volatile Organic Compounds, VOCs) male molekulske mase i sa visokim naponom pare koji se proizvode tokom različitih kataboličkih puteva. Pored

antimikrobne i nematocidne aktivnosti, VOCs promovišu rast i indukuju sistemsku rezistenciju biljaka (Raza et al., 2016). Uz produkciju antimikrobnih jedinjenja, proizvode i litičke egzoenzime pomoću kojih ostvaruju kompeticiju za nutrijente kao mehanizam biološke kontrole (Thomashow & Weller, 1996).

Rod *Pseudomonas* je, osim biokontrolne aktivnosti, poznat i po vrstama koje uspešno promovišu rast biljaka. PGP osobine vrsta roda *Pseudomonas* su zasnovane na produkciji fitohormona (indol-3-sirćetna kiselina, auksin), fiksaciji azota (pomoću enzima nitrogenaze), produkciji siderofora i solubilizaciji fosfata (Panpatte et al., 2016). Produkcijom ACC deaminaza snižavaju nivo etilena, hormona stresa kod biljaka i tako pozitivno utiču na rast korenovog sistema (Glick et al., 1994). Veoma bitna odlika roda je sposobnost produkcije siderofora. Pomoću siderofora bakterije heliraju gvožđe i usvajaju ga, čineći ovaj mikronutrijent nedostupnim za druge mikroorganizme (Tontou et al., 2016). Pored usvajanja gvožđa mogu da heliraju dvovalentne i trovalentne katjone (Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} i Zn^{2+} , Mn^{3+} , Co^{3+} i Al^{3+}) i aktinide (Th^{4+} , U^{4+} i Pu^{4+}) što se može iskoristiti za proces bioremedijacije staništa zagađenim teškim metalima (Ahmed & Holmström, 2014). Vrste roda *Pseudomonas* kroz ekskreciju organskih kiselina i enzima fosfataza solubilizuju fosfat koji se nalazi u nerastvornom obliku i tako ga čini dostupnim za biljke (Gyaneshwar et al., 2002). Navedene efekte ostvaruju u najvećem broju slučajeva u rizosferi, ali često prelaze i u endofitsku fazu, naseljavajući vaskularni sistem biljke. U endofitskoj fazi mogu da indukuju sistemsku rezistenciju kod biljaka. Pored produkcije različitih aktivnih jedinjenja, *Pseudomonas* spp. poseduju osobine koje ih čine uspešnim kolonizatorom: brzo se umnožavaju i imaju jednostavne nutritivne zahteve sa sposobnošću da rastu u medijumu sa mineralnim solima uz dodatak izvora ugljenika (Ganeshan & Kumar, 2005). Navedene osobine su od izuzetne važnosti za održavanje biokontrolnih agenasa nakon njihove primene u polju.

Među vrstama roda *Pseudomonas* sa pozitivnim efektom na rast i dobro opšte stanje biljaka se izdvajaju fluorescentne pseudomonade koje se odlikuju produkcijom fluorescentnih žuto-zelenih pigmenata pioverdina, piohelina i dr., koji su po svojoj prirodi siderofore. U fluorescentne pseudomonade sem patogena *P. aeruginosa* i *P. syringae*, svrstavaju se i *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. chlororaphis* (Panpatte et al., 2016; Saha et al., 2012). Unutar filogenetske grupe *P. fluorescens* svrstano je preko 50 vrsta (Garrido-Sanz et al., 2017), među kojima su intenzivno istraživani *P. fluorescens* i

P. chlororaphis kao biokontrolni sojevi. Većina sojeva ima antifungalnu aktivnost, kao što su producenti fenazina *P. fluorescens* 2-79 aktivnog protiv *Gaeumannomyces graminis* i *P. chlororaphis* PCL1931 efikasnog protiv *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Chin-A-Woeng et al., 1983; Neseemann et al., 2015). Soj *P. fluorescens* Pf-5 koji proizvodi DAPG, pirolnitrin, pioluteorin i cijanovodonik je pokazao širok spektar aktivnosti protiv *Rhizoctonia solani*, *Pyrenophora tritici-repentis*, *Sclerotinia homoeocarpa* i *Drechslera poae* (Paulsen et al., 2005).

Pseudomonas fluorescens je velika filogenetska grupa sa vrstama koje imaju veoma varijabilne genome i konstanto se proširuje novim članovima. Među novim i slabije istraženim vrstama je i *P. synxantha*, fluorescentna bakterija poreklom iz rizosfere. Na osnovu sekvence gena za 16S rRNK smeštena je u *P. fluorescens* grupu (Wechter et al., 2002). Mali je broj literaturnih podataka o antimikrobnoj aktivnosti ove vrste. Mukherjee et al. (2014) su utvrdili da *P. synxantha* snažno inhibira rast *Mycobacterium tuberculosis* i *M. smegmatis*, a kao aktivno jedinjenje okarakterisan je alifatični ugljovodonik dugog lanca. U studiji Tontou et al. (2016) je pretpostavljeno da se biokontrolni potencijal *P. synxantha* protiv *P. syringae* pv. *actinidiae* ispoljava kroz antibiozu, tj. produkciju neribozomalno sintetisanih peptida. Antifungalna i biokontrolna aktivnost *P. synxantha* je potvrđena protiv izazivača mrke truleži *M. fructigena* i *M. fructicola* u biokontrolnom testu na breskvama (Aiello et al., 2019), ali do sada nije otkrivena hemijska struktura aktivnog jedinjenja.

Uprkos razvijenom tržištu biopesticida za sada ne postoji formulacija za kontrolu mrke truleži koštuničavog voća. Jedan od razloga je nedostatak znanja o mikrobiomu i potencijalu antagonista da kontrolišu mrku trulež (Janisiewicz et al., 2013) i bakterioze koštuničavog voća. Razumevanje autohtonog mikrobioma bi dovelo do izolacije potencijalnih antagonista koji bi bili efikasni biokontrolni agensi za tretiranje fitopatogena.

Raspoloživost i dostupnost novih tehnologija sekvenciranja zajedno sa razvojem protokola za metabarkodiranje kao i softvera za obradu podataka obezbedili su novi način za karakterisanje mikrobijalnih zajednica kao i mogućnost da se specifično odgovori na pitanja vezana za mikrobijalnu ekologiju i zaštitu useva. Istraživanja u budućnosti će imati velike koristi od ekstenzivne i pouzdane identifikacije kao i mogućnosti predviđanja uloge detektovanih mikroorganizama (Abdelfatah et al., 2018). I dalje je veliki deo postojećeg diverziteta mikroorganizama u prirodi nepoznat, kao i njihova ekološka uloga. Razvoj novih tehnologija, formiranje pouzdanih i sveobuhvatnih baza podataka će u kombinaciji sa tradicionalnim metodama igrati fundamentalnu ulogu u produbljivanju znanja o ekologiji prirodnih zajednica mikroorganizama u različitim sredinama i u oblikovanju biološke kontrole fitopatogena u budućnosti.

2. CILJEVI RADA

2. CILJEVI RADA

Uzimajući u obzir da se malo zna o diverzitetu zajednica mikroorganizama filofsphere šljive i da je ova značajna voćarska kultura pogođena različitim bolestima izazvanim bakterijskim i fungalnim patogenima postavljeni su sledeći ciljevi rada:

1. Određivanje diverziteta bakterija i gljiva iz nativnih uzoraka 4 sorte šljive (Čačanska lepotica, Čačanska rodna, Požegača i Ranka) u dve fenološke faze razvoja ploda, metagenomskim pristupom i tradicionalnim kultivabilnim metodama.
2. Identifikacija i testiranje patogenosti autohtonih izolata bakterijskih fitopatogena i autohtonih izolata roda *Monilinia*.
3. Identifikacija i karakterizacija antagonističkog potencijala bakterijskih izolata na bakterijske patogene i *Monilinia* spp.
4. Ekstrakcija, hemijska analiza aktivnih supstanci i određivanje antimikrobne aktivnosti antagonističkog izolata *in vitro*.
5. Ispitivanje biokontrolnog potencijala odabranog antagonističkog izolata i njegovog ekstrakta na izazivača mrke truleži na plodovima šljive *ex situ*.

3. MATERIJAL I METODE

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Materijal

3.1.1. Bakterijski sojevi

Indikatorski sojevi, korišćeni u istraživanju, su prikazani u Tabeli 2.

Tabela 2. Indikatorski sojevi korišćeni u istraživanju

Redni br.	Vrsta indikatorskog soja / broj izolata	Izvor izolata
1.	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> GSPB 1142	referentni soj ¹
2.	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> NCPPB 1144	referentni soj ¹
3.	<i>Erwinia amylovora</i> NCPPB 683	referentni soj ¹
4.	<i>Rhizobium nepotum</i> V1/16_2	Kruška ²
5.	<i>Erwinia amylovora</i> 4-11	Dunja ²
6.	<i>Erwinia amylovora</i> 5-12	Dunja ²
7.	<i>Erwinia amylovora</i> 16-13	Dunja ²
8.	<i>Erwinia amylovora</i> 25-14	Dunja ²

¹ Kolekcija sojeva Katedre za mikrobiologiju, Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

² Kolekcija sojeva Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu iz Beograda

3.1.2. Hranljivi medijumi za gajenje bakterija i gljiva

LB Medijum

Tripton	10 g
Ekstrakt kvasca	5 g
NaCl	5 g
dH ₂ O	1000 ml

LA Medijum

LB sa dodatkom 15 g agara na 1000 ml.

Soft LA Medijum

LB sa dodatkom 7 g agara na 1000 ml.

MHB – Mueller-Hinton broth

MHB	21 g
dH ₂ O	1000 ml

King's B agar

King's medijum B baza	43 g
Glicerol	10 ml
dH ₂ O	1000 ml

MSM medijum (Mineral Salt Medium)

NaNO ₃	3 g
MgSO ₄ × 7H ₂ O	0,5 g
KCl	0,5 g
K ₂ HPO ₄	0,1 g
FeSO ₄ × 7H ₂ O	0,01 g
Ekstrakt kvasca	5 g
Glicerol	1%
dH ₂ O	1000 ml

Medijum podesiti na pH = 7.

YPD medijum (Yeast Dextrose Broth)

Ekstrakt kvasca	10 g
Pepton	20 g
Glukoza	20 g
dH ₂ O	1000 ml

PDA Medijum (Potato Dextrose Agar)

PDA	39 g
dH ₂ O	1000 ml

Pikovski agar

Pikovski agar	31,3 g
dH ₂ O	1000 ml

CAS agar za određivanje siderofora

Rastvor 1

Rastvor FeCl ₃	9 ml
Rastvor HDTMA (heksadeciltrimetil- amonijum bromid)	40 ml
Rastvor CAS	50 ml

Rastvor 2

PIPES (piperazin-1,4-bis (2-etan- sulfonska kiselina))	30,24 g
Dejonizovana voda	750 ml
Agar	15 g

Podesiti rastvor 2 na pH = 6,8 sa NaOH.

Rastvori 1 i 2 su sterilisani autoklaviranjem na 121 °C tokom 15 minuta i nakon sterilizacije su pomešani. Podloge su razlivene u Petrijeve šolje i kada su očvrle

prepolovljene su sterilnim nastavkom. Polovina podloge je zamenjena sa odgovarajućom podlogom za rast bakterijske kulture (LA).

Napomena: Pre pripreme podloge stakleno posuđe je očišćeno sa 6M HCL, kako bi se uklonili svi elementi, i isprano dejonizovanom vodom.

3.1.3. Rastvori za CAS agar

Rastvor FeCl₃

FeCl ₃ × 6H ₂ O	0,0027 g
12 M konc. HCl	83 µl
dH ₂ O	10 ml

Rastvor HDTMA

HDTMA	0,073 g
dH ₂ O	40 ml

Rastvor CAS

CAS	0,065 g
dH ₂ O	50 ml

3.1.4. Hranljivi medijumi za kvalitativno određivanje produkcije egzoenzima

Za testiranje hidrolitičke aktivnosti amilaze, proteinaze i lipaze korišćen je bazični hranljivi medijum: Nutrient broth (0,8% w/v), NaCl (0,4% w/v) i agar (1% w/v) u koji su dodati:

- ✓ za amilaze: rastvorljivi skrob (0,5% w/v) (Sigma-Aldrich, SAD)
- ✓ za proteinaze: želatin (0,4% w/v)
- ✓ za lipaze: maslinovo ulje (2,5% w/v) i rodamin B (Superlab) (0,1% w/v)

Bazični hranljivi medijum za detekciju hidrolitičke aktivnosti ksilanaza i mananaza sadržao je ekstrakt kvasca (0,2% w/v), pepton (0,5% w/v), MgSO₄ (0,5% w/v), NaCl (0,05% w/v), CaCl₂ (0,015% w/v) i agar (2% w/v) u koji su dodati:

- ✓ za ksilanaze: ksilan iz drveta breze (0,1% w/v) (Sigma-Aldrich, SAD)
- ✓ za mananaze: Karuba guma (1% w/v) (Sigma-Aldrich, SAD)

3.1.5. Reagensi za bojenje po Gramu

Lugolov rastvor

Kristalni jod	1 g
Kalijum jodid	2 g
dH ₂ O	300 ml

Kristal violet

Kristal violet	2 g
Etanol 96%	20 ml
Amonijum oksalat	0,8 g
dH ₂ O	80 ml

Safranin

Safranin	0,25 g
Etanol 96%	10 ml
dH ₂ O	100 ml

3.2. Metode

3.2.1. Uzorkovanje biljnog materijala

Uzorkovanje listova i plodova 4 sorte šljive (Čačanska lepotica, Čačanska rodna, Požegača i Ranka) je vršeno tokom 2016. godine. Materijal je uzorkovan u voćnjaku u mestu Saraorci (Podunavski okrug, 44°29'11"N i 21°04'34"E) (Slika 2) zahvaljujući ljubaznošću vlasnika Dejana Stojanovića. Ustupljeni šljivik u desetogodišnjem periodu nije tretiran pesticidima.



Slika 2. UTM karta Republike Srbije sa naznačenim položajem naselja Saraorci i odabranog šljivika (Podunavski okrug) (foto T. Janakiev).

Obuhvaćene su rana fenološka faza sazrevanja ploda, krajem maja meseca, i faza sazrevanja ploda u prvoj polovini jula. Uzorkovani su zdravi listovi i plodovi, ali i oni sa jasnim simptomima pegavosti ili plodovi na kojima su uočeni simptomi razvoja mrke truleži (Slika 3). Za svaku sortu šljive uzorkovano je po pet listova i plodova sa tri nasumično odabrana stabla. Listovi i plodovi su uzorkovani sterilno i transportovani u rashladnim torbama do laboratorije Katedre za mikrobiologiju Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu gde su dalje obrađivani.



Slika 3. Simptomi bolesti plodova i listova šljive zabeleženi tokom uzorkovanja biljnog materijala (foto I. Dimkić).

3.2.2. Izolacija mikroorganizama

Iz sakupljenih uzoraka biljnog materijala je vršena izolacija mikroorganizama prema metodi opisanoj u Janisiewicz et al. (2013). Za svaku sortu šljive, listovi i plodovi su preneti u Durhamtm bocu sa sterilnim fosfatnim puferom (engl. phosphate-buffered saline, PBS; pH 7,2) tako da biljni materijal bude prekriven. Zatim, biljni materijal je mućkan 3 min na rotacionom šejkeru, pri brzini od 200 rpm-a. Nakon toga je PBS odliven i dodata je nova količina potrebna za ponovno prekrivanje biljnog materijala. Boca sa materijalom je tretirana 1 minut u ultrazvučnom kupatilu (Bandelin Sonorex RK 103 H, Nemačka), nakon čega je usledilo mućkanje tokom 15 minuta. Za izolaciju bakterija utrljavano je 100 µl koncentrovanog supernatanta tretiranog biljnog materijala u PBS-u i 100 × razblaženog rastvora na LA podloge. Podloge su inkubirane minimum 48 časova na 25 °C (Binder BD 53, Nemačka). Za izolaciju gljiva postavljani su listovi na površinu PDA podloge, uz istovremeno utrljavanje koncentrovanog rastvora biljnog materijala, takođe na PDA podlogu. Podloge su inkubirane pet do sedam dana na 25 °C.

3.2.3. Metode rada sa DNK

3.2.3.1. Izolacija ukupne DNK, priprema biblioteka i NGS sekvenciranje

Uzorci pripremljeni za izolaciju kultivabilnih bakterija i gljiva su korišćeni i za metagenomsku analizu nekultivabilnih zajednica 4 sorte šljive. Svaki uzorak je sadržao po 5 listova i pet plodova sakupljenih sa tri nasumično odabrana stabla. Ukupna DNK filofere 4 sorte šljive u dve fenološke faze je izolovana iz biljnog materijala koji je potopljen u 1 × PBS. Za svaki pripremljeni uzorak vršena je filtracija 100 ml tečnosti kroz membranske IsoporeTM filtre (Merck Millipore Ltd., Irska). Izolacija ukupne DNK sa 0,22-µm polikarbonatnih IsoporeTM filtera je izvršena korišćenjem ZymoBIOMICSTM DNA Mini Kit-a (Zymo Research, SAD) po protokolu proizvođača. Koncentracija izolovane DNK je određena na Qubit 4 fluorometru (InvitrogenTM, SAD). DNK uzorci su rastvoreni u ultračistoj vodi i komercijalno su sekvencirani u Macrogen, Inc. (Seul, Republika Koreja). Biblioteke amplicona za V1-V3 region 16S rRNK

bakterija i 3F-4R region ITS 2 sekvenci gljiva su konstruisane korišćenjem indeksnog Nextera DNK Kita za pripremu biblioteka (Illumina).

Dužina sekvenci je izmerena na bioanalizatoru Agilent Technologies 2100 upotrebom DNK 1000 čipa. Nakon provere veličine, biblioteke su sekvencirane korišćenjem 2×300 -bp protokola uparenih krajeva [MiSeq Reagent Kit, v.3 (MS-102-3001)] na MiSeq sekvenatoru prema uputstvu proizvođača (Illumina).

3.2.3.2. Obrada podataka NGS sekvenciranja, taksonomska anotacija i bioinformatička analiza

Procena kvaliteta i pridruživanje sekvenci su sprovedeni korišćenjem Prinseq-lite programa (Schmieder & Edwards, 2011) sa minimalnom dužinom od 50 bp, trimovanjem 3' kraja sa pragom od 30 bp, srednjim tipom ocene kvaliteta i kvalitetom trimovanja od 20 bp. Analiza podataka sprovedena je korišćenjem *ad-hoc* pipeline u Rstatistics programu (R Core Team, 2012). DADA2 pipeline je korišćen za označavanje sekvenci, spajanje uparenih krajeva i uklanjanje himera, počevši od podataka sa uparenih krajeva (Callahan et al., 2016).

Klasifikacija je sprovedena upotrebom Naive Bayesian klasifikatora integrisanog u QIIME2 programske dodatke uz taksonomsku anotaciju na osnovu baze SILVA 132 (Quast et al., 2013). Sekvence pripisane hloroplastima i neidentifikovanim gljivama isključene su iz dalje analize. Diverzitet gljiva unutar zajednica (alfa diverzitet) određen je analizom OTU i prikazan Shannon, Simpson, invSimpson i Fisher alfa indeksima. Uočeno i procenjeno bogatstvo (*engl.* richness) određeno je prema sledećim indeksima na nivou OTU-a: broj uočenih vrsta jedinica (OBS), kao i procenjenih OBS-a korišćenjem Chao1 i ACE. Beta diverzitet je određen pomoću Analize glavnih koordinata (*engl.* Principal Coordinates Analysis, PCoA), kao i analizom redundantnosti (*engl.* redundancy analysis, RDA). Pored toga, Venovi dijagrami su konstruisani da ukažu na zajedničke i jedinstvene OTU sekvence između zajednica bakterija i gljiva. Grafici su dobijeni pomoću matrica udaljenosti na nivou roda.

Podaci dobijeni sekvenciranjem V1-V3 regiona gena za 16S rRNK deponovani su u BioProject bazi podataka (*engl.* National Center for Biotechnology Information, NCBI), pod brojem PRJNA561128 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA561128>). Podaci dobijeni sekvenciranjem 3F-4R regiona ITS 2 DNK sekvenci gljiva deponovani su u BioProject bazu podataka (NCBI) kao PRJNA553251 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA553251>).

3.2.3.3. Izolacija genomske DNK iz kultivabilnih bakterijskih izolata

Ekstrakcija genomske DNK iz bakterijskih izolata je sprovedena prema modifikovanoj metodi opisanoj u Dimkić et al. (2013). Bakterijske kulture su gajene u LB medijumu preko noći na 30 °C. Nakon centrifugiranja prekonoćnih kultura 5 min na 13000 × g (Hettich Zentrifugen MIKRO 22R, Nemačka), ćelijski pelet je ispran dva puta u 500 µl TE pufera (10 mM Tris, pH 8; 1 mM EDTA). Za izolaciju DNK iz gram-pozitivnih bakterija pelet je resuspendovan u 500 µl TE pufera sa lizozimom (Serva GMBH, Hajdelberg, Nemačka) u finalnoj koncentraciji 200 µg/ml. Kod gram-negativnih izolata, pelet je resuspendovan u 567 µl TE pufera i 30 µl 10% natrijum dodecil sulfata (*engl.* sodium dodecyl sulfate, SDS) uz dodatak 3 µl proteinaze K, dostižući finalnu koncentraciju od 100 µg/ml enzima u 0,5% SDS-a (Sigma, Sent Luis, SAD). Nakon 30 min inkubacije na 37 °C, u uzorke je dodato po 100 µl 5M NaCl. Nakon vorteksovanja, uzorci su tretirani sa 300 µl 3% (w/v) CTAB + PVP puferom. Smeša je inkubirana 20 min na 65 °C i zatim je dodato 800 µl hloroforma. Nakon 10 min centrifugiranja na 13000 × g, gornja faza je sakupljana i prebacivana u nove mikrotube. U sledećem koraku je dodata 1/10 volumena 3M Na-acetata (pH 4,8) i 1 volumen izopropanola. Smeša je centrifugirana 15 min na 13000 × g. Talog DNK je ispiran sa 96% etanolom i resuspendovan u 50 µl TE pufera sa dodatkom 1 µl RNaze (10 mg/ml). DNK je do upotrebe čuvana na –20 °C.

3.2.3.4. Izolovanje genomske DNK iz kultivabilnih izolata gljiva

Totalna genomska DNK 11 izolata *Monilinia* spp. i 5 kvasaca poreklom sa četiri sorte šljive je izolovana pomoću ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ Kit (Zymo Research, SAD). Za ekstrakciju genomske DNK je sakupljeno 100 mg marginale micelije sa kultura *Monilinia* spp. koje su rasle 7 dana na PDA podlozi. Micelija je resuspendovana u 200 µl sterilne vode i dalje podvrgnuta ekstrakciji DNK sa ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ Kit prema uputstvu proizvođača (Zymo Research, SAD).

3.2.3.5. Umnožavanje fragmenata DNK metodom PCR

Molekularna identifikacija bakterijskih izolata je urađena parcijalnim umnožavanjem gena za 16S rRNA sa univerzalnim prajmerima UN1–16SF i UN1–16SR (Tabela 3). PCR reakciona smeša je sadržala u 25 µl ukupne zapremine: 1 µg genomske DNK, 25 mM MgCl₂ u finalnoj koncentraciji od 2,5 mM, dNTP smešu (svaki dNTP po 200 µmol/l), prajmere (svaki po 1 µl) i 1 U DNK Taq polimeraze (Fermentas UAB, Vilnius, Litvanija). PCR reakcija je rađena po sledećem programu: inicijalna denaturacija na 94 °C u trajanju od 5 min praćena je sa 30 ciklusa koji su se sastojali od: denaturacija 30 sec na 94 °C, vezivanje prajmera 1 min na 50 °C, polimerizacija 30 sec na 72 °C i poslednji ciklus polimerizacije na 72 °C u trajanju od 7 min.

Za dodatnu karakterizaciju izolata R3/3 umnoženi su i geni *tuf*, *pycA* i *ccpA*, a za izolat P4/16_1 je umnožen gen *gyrB* (Tabela 3). Sproveden je i PCR skrining na prisustvo gena koji kodiraju enzime od interesa. Distribucija antibiotičkih gena u genomu dva antagonistička izolata je takođe ispitana umnožavanjem odgovarajućih gena. Umnožavanje ovih gena je sprovedeno po protokolima objavljenim u literaturi (Tabela 4). Svi korišćeni prajmeri, njihove sekvence i karakteristike sumirani su u Tabeli 3 i 4.

Za molekularnu identifikaciju izolata *Monilinia* spp. i kvasaca su umnožena dva DNK regiona: ITS1 (parcijalna 18S rRNK + unutrašnji transkribovani spejser 1 + parcijalna

5,8S rRNK) i ITS2 (parcijalna 5,8S rRNK + unutrašnji transkribovani spejser 2 + parcijalna 28S rRNK). Korišćeni su parovi prajmera ITS1-F i ITS4-R za ITS1 region i ITS3-F i TW13-R za ITS2 region (Tabela 3). PCR reakcija je programirana na sledeći način: inicijalna denaturacija na 94 °C u trajanju od 4 min praćena je sa 30 ciklusa koji su se sastojali od: denaturacija 30 sec na 94 °C, vezivanje prajmera 50 sec na 55 °C, polimerizacija 50 sec na 72 °C i poslednji ciklus polimerizacije na 72 °C u trajanju od 10 min.

3.2.3.6. Horizontalna elektroforeza DNK na agaroznom gelu

Elektroforeza izolovane DNK i amplifikona DNK umnoženih PCR metodom je sprovedena na horizontalnom agaroznom gelu. Gelovi su pravljani otapanjem agaroze u $0,5 \times$ TBE puferu (50 mM Tris-borat, 0,5 M EDTA, pH 8) uz dodavanje etidijum bromida (0,5 µg/ml finalna koncentracija) i kao pufer za elektroforezu je takođe korišćen $0,5 \times$ TBE. Na gel je nanošeno 5 µl ispitivanih uzoraka koji su mešani sa 1,5 µl boje ($0,5 \times$ TBE, 50% glicerol, 0,25% bromfenol plavo) i elektroforeza je na 1% agaroznim gelovima tekla pri konstantnom naponu od 95 V u trajanju od 90 min. Gelovi su fotografisani na UV transiluminatoru (LKB Brooma, Švedska) i veličina umnoženih DNK fragmenata je određivana u odnosu na DNK fragmente poznatih veličina (100 bp standard DNA Ladder, 100-3000 bp) (Nippon Genetics, Dueren, Nemačka). Gelovi su fotografisani pod UV osvetljenjem (Biometre, Getingen, Nemačka) na 260 nm talasne dužine. Ovako dobijeni PCR produkti su nakon prečišćavanja uz pomoć kita (QIAquick PCR Purification; Qiagen GmbH, Hilden, Nemačka) slati na sekvenciranje u centar za sekvenciranje (Macrogen's sequencing service, Koreja).

Tabela 3. Sekvence prajmera korišćenih za identifikaciju izolata bakterija i gljiva, i detekciju kodirajućih gena za enzime

Ciljni gen	Oznaka prajmera	Sekvenca prajmera (5'-3')	T _m (°C)	Br. ciklusa hibridizacije	Očekivana dužina amplifikona (bp)	Referenca
16S rDNK	UN1-16SF	GAGAGTTTGATCCTGGC	51	30	1500	Dimkić et al., 2013
	UN1-16SR	AGGAGGTGATCCAGCCG				
<i>tuf</i> gen za elongacioni faktor Tu	tufGPF	ACGTTGACTGCCAGGACAC	55	35	791	Caamano-Antelo et al., 2015
	tufGPR	ATACCAGTTACGTCAGTTGTACGGA				
<i>pycA</i> gen za piruvat karboksilazu	pycA-F	GCGTTAGGTGGAAACGAAAG	57	35	363	Jolley et al., 2004
	pycA-R	CGCGTCCAAGTTTATGGAAT				
<i>ccpA</i> gen za katabolički kontrolni protein A	ccpA-F	GTTTAGGATACCGCCCAAATG	59	40	418	Helgason et al., 2014
	ccpA-R	TGTAACCTTCTTCGCGCTTCC				
<i>gyrB</i> gen za B subjedinicu DNK žiraze	gyrB-F	MGGCGGYAAGTTCGATGACAAYTC	58	35	620	Sarkar & Guttman, 2004
	gyrB-R	TRATBKCAGTCARACCTTCRCGSGC				
ITS1 region DNK	ITS1-F	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	55	30	550	White et al., 1990
	ITS1-R	TCCTCCGCTTATTGATATGC				
ITS2 region DNK	ITS3-F	GCATCGATGAAGAACGCAGC	55	30	900	White et al., 1990; Tedersoo et al., 2015
	TW13-R	GGTCCGTGTTTCAAGACG				
<i>aiiA</i> gen za AHL-laktonazu	AiiA1-F	ATGACAGTAAARAARCTTTATTTTC	55	30	753	Pan et al., 2008
	AiiA2-R	TCACTATATATAYTCMGGGAACACTC				
<i>chit</i> gen za endohitinazu	Chit-F	ATTCACACTGCTATTACTATC	50	35	1997	Djenane et al., 2017
	Chit-R	TGACGGCATTAAAAGTTTCGGC				
<i>chi36</i> gen za egzohitinazu	Chi36-F	GATGTTAAACAGGT CAA	50	35	1083	Djenane et al., 2017
	Chi36-R	TTATTTTTTGCAAGGAAAG				
<i>acc</i> gen za ACC deaminazu	ACC-F	ATGAACCTGCAACGATTC	58	35	700	Sheehy et al., 1991
	ACC-R	TCAGCCGTCTCGGAAGAT				
<i>nifH</i> gen za nitrogenazu	nifH-F2	TGYGAYCCIAAIGCIGA	51	35	359	Marusina et al., 2001
	nifH-R6	TCIGGIGARATGATGGC				

Tabela 4. Sekvence prajmera korišćenih za detekciju kodirajućih gena za antibiotike

Ciljni gen	Oznaka prajmera	Sekvenca prajmera (5'-3')	T _m (°C)	Br. ciklusa hibridizacije	Očekivana dužina amplifikona (bp)	Referenca
Cvitermicin A biosintetski klaster	ZWTF2	TTGGGAGAATATAACAGCTCT	52	45	779	Athukorala et al., 2009
	ZWTR1	GACCTTTTGAAATGGGCGTA				
Delovi gena <i>ituA</i> i <i>ituB</i> sa intergenskim regionom	ITUP1-F	AGCTTAGGGAACAATTGTCATCGGGGCTTC	60	30	2000	Tsuge et al., 2005
	ITUP1-R	TCAGATAGGCCGCCATATCGGAATGATTCG				
<i>sfp</i> gen surfaktin sintetaze	P17	ATGAAGATTTACGGAATTTA	45	35	675	Hsieh et al., 2004
	P18	TTATAAAAGCTCTTCGTACG				
<i>bamC</i> gen bacilomicin D sintetaze	BACC1-F	GAAGGACACGGCAGAGAGTC	60	35	875	Ramarathnam et al., 2007
	BACC1-R	CGCTGATGACTGTTTCATGCT				
<i>fenD</i> gen fengicin sintetaze	FEND1-F	TTTGGCAGCAGGAGAAGTT	62	45	964	Ramarathnam et al., 2007
	FEND1-R	GCTGTCCGTTCTGCTTTTTTC				
<i>krsA</i> , <i>krsB</i> i <i>krsC</i> geni kurstakinskog operona	AKS-F	TCHACWGGRAATCCAAAGGG	44,4	30	1125, 1152, 1161, 1167, 1173	Abderrahmani et al., 2011
	TKS-R	CCACCDKTCAAACAARKWATC				
<i>phcA</i> gen za fenazin-1-karboksilnu kiselinu	PhCA-F	TTGCCAAGCCTCGCTCCAAC	67	30	1150	Raaijmakers et al., 1997
	PhCA-R	CCGCGTTGTTCTCGTTCAT				
<i>prnD</i> gen za pirolnitrin	PRN-F	GGGGCGGGCCGTGGTGATGGA	68	30	786	de Souza & Raaijmakers, 2003
	PRN-R	YCCCGCSGCCTGYCTGGTCTG				
<i>pltC</i> gen za pioluteorin	PLTC1-F	AACAGATCGCCCCGGTACAGAACG	67	30	438	de Souza & Raaijmakers, 2003
	PLTC2-R	AGGCCCGGACACTCAAGAACTCG				
<i>hcnBC</i> gen HCN sintaze	HCN-F	ACTGCCAGGGGCGGATGTGC	63	30	587	Ramette et al., 2003
	HCN-R	ACGATGTGCTCGGCGTAC				

3.2.3.7. Filogenetske analize

Za identifikaciju bakterijskih sojeva, za dobijene sekvence 16S rRNK gena tražene su homologe sekvence referentnih sojeva u NCBI GenBank bazi podataka pomoću BLAST 16S programa. Identifikacija izolata *Monilinia* spp. vršena je upoređivanjem sekvenci umnoženih ITS1 i ITS2 regiona, pomoću BLASTn programa NCBI baze. Pozicija nukleotida je proveravana ručnim poravnanjem. Korišćene su sekvence najrodnijih sojeva kako bi se obezbedila taksonomska relevantnost. Za precizniju identifikaciju antagonističkih izolata u filogenetsku analizu je uključen veći broj gena. Za izolat P4/16_1, dobijene sekvence za 16S rRNK i *gyrB* su korišćene za konstrukciju spojenih sekvenci, tzv. konkatemera. Sekvence referentnih sojeva su preuzete iz GenBank baze podataka. Konkatermerne sekvence za 16S rRNK i *gyrB* referentnog izolata *P. aeruginosa* ATCC 15692 (NCBI accession number: CP017149) je uključen kao “out” group. Za izolat R3/3, umnožene sekvence gena za 16S rRNK i za *tuf*, *pycA* i *ccpA* gene, koji kodiraju elongacioni faktor Tu, piruvat karboksilazu A i katabolički protein A, redom, su korišćene za konstrukciju konkatemera. Kao “out” group je korišćena odgovarajuća konkatemerna sekvenca referentnog izolata *Clostridium botulinum* ATCC 3502 (NCBI accession number: NC009495).

Sekvence su poravnate pomoću CLUSTAL W algoritma (Thompson et al., 1997) implementiranog u BioEdit 7.1.3 programu (Hall, 1999). Dendogrami su konstruisani primenom “Neighbor-joining” algoritma sa Kimura dvoparametarskim modelom supstitucije nukleotida u MEGA 6 programu (Tamura et al., 2013). Topologija stabala je ocenjena “bootstrap” metodom od 1000 ponavljanja.

3.2.4. Metode rada sa bakterijama

3.2.4.1. Morfološka identifikacija bakterijskih izolata

Morfološke karakteristike bakterijskih izolata su praćene zasejavanjem čistih kultura na LA podlogu. Posmatrane su sledeće karakteristike kolonija: oblik, veličina, izgled ivica i površine, ispupčenost, boja i konzistencija. Pored morfološke karakterizacije kolonija, praćena je i reakcija po Gramu prema standardnom protokolu i preparati su posmatrani pod svetlosnim mikroskopom (Leica Microsystems, Nemačka).

3.2.4.2. Hipersenzitivna reakcija (HR) na listovima duvana

Kolekcija izolata *Pseudomonas* spp. filosofere šljive je testirana na hipersenzitivnu reakciju listova duvana (*Nicotiana tabacum* L.) sorte White Burley. Bakterijske suspenzije patogena su podešene na 10^7 CFU/ml. Inokulacija listova duvana između dva bočna nerva sa bakterijskim suspenzijama je vršena pomoću medicinskog šprica. Negativnu kontrolu su predstavljali listovi duvana koji su tretirani destilovanom vodom. Rezultati su očitavani nakon 48 časova. Pojava nekroze inokulisanog tkiva lista duvana predstavlja pozitivnu reakciju.

3.2.4.3. *Ex situ* testiranje patogenosti autohtonih izolata na listu šljive

Sposobnost potencijalnih patogena *P. syringae* ČL2/2 i P7/16_2, *P. congelans* (ČR1/16_2), *E. persicina* (ČL3/16_1) i *Clavibacter michiganensis* (R3/1) da izazovu nekrozu je testirana prema Moragrega et al. (2003) inokulacijom ubranih listova četiri sorte šljive. U test je bio uključen izolat *Rhizobium nepotum* (V1/16_2) poreklom sa kruške. Za svaki izolat je inokulisano po pet listova svake sorte šljive. Listovi su sterilisani 2 minuta u 70% etanolu i isprani dva puta u sterilnoj vodi. Kako bi se uklonio višak vlage, listovi su izloženi strujanju vazduha u laminarnoj komori. Na naličju lista, između bočnih nerava, je

naneta rana sterilnim skalpelom. Rane su inokulisane sa 20 µl bakterijskih suspenzija. Za negativnu kontrolu listovi su inokulisani sa 20 µl sterilne vode. Listovi su postavljeni na filter papir natopljen vodom i zatvoreni u kutije kako bi se održavao visoki procenat vlage u atmosferi vlažne komore. Nekroze su praćene nakon 48 i 96 časova. Virulencija izolata (*engl.* severity index, SI) je određivana prema formuli:

$$SI = \frac{\sum_{n=1}^N In}{N \times I_{max}} \times 100,$$

gde je *In* odgovarajući indeks intenziteta virulencije, *N* broj inokulisanih listova, a *I_{max}* najveći indeks virulencije (odgovara broju 4). Indeks intenziteta virulencije, u opsegu od 0 do 4, određivan je na osnovu prisustva simptoma prema skali: 0- nema infekcije; 1- lezija na listu do 5 mm; 2- lezija između 5-10 mm; 3- lezija preko 10 mm i 4- više od 50% lisne ploče je zahvaćeno infekcijom.

3.2.4.4. *In vitro* skrining antagonističke aktivnosti izolata

Potencijalna antagonistička aktivnost 50 bakterijskih izolata i 5 kvasaca filofere šljive je testirana *in vitro* na 22 autohtona fitopatogena bakterijska izolata. Bakterijski izolati su gajeni u LB medijumu, a kvasci u YPD medijumu tokom 24 časa na 30 °C. Nakon prekonoćne inkubacije, suspenzija patogena je podešena na 1×10^7 CFU/ml. LB soft agar je inokulisan sa 50 µl suspenzije patogena i razliven na LA podlogu. Prekonoćna kultura (10 µl) potencijalnih antagonista je automatskom pipetom nanošena na razliveni LA soft agar u triplikatu. Nakon inkubacije tokom 48 časova na 30 °C, antagonistička aktivnost je ocenjivana na osnovu pojave prosvetljenih zona oko bakterijskih kolonija (Hu et al., 2009). Izolat sa antagonističkom aktivnošću je dalje testiran na referentne fitopatogene sojeve *P. syringae* pv. *syringae* GSPB 1142, *X. campestris* pv. *campestris* NCPPB 1144 i *E. amylovora* NCPB 683. Testiranje je sprovedeno i na četiri prirodna izolata *E. amylovora* poreklom sa dunje.

Za testiranje na sposobnost proizvodnje antimikrobnih jedinjenja izolat je gajen u LB medijumu na 30 °C uz aeraciju pri rotaciji od 180 rpm-a tokom noći. Prekonoćna

bakterijska kultura je oslobođena ćelija centrifugiranjem 15 min na 13 000 rpm-a i dobijeni supernatant je sterilisan filtriranjem kroz 0,45 µm Durapore™ (Milipore, Billerica, SAD) filtre. Antimikrobna aktivnost supernatanta na autohtone i referentne fitopatogene sojeve je testirana difuzionim metodom u bunarčićima (Harris et al., 1989). Ukratko, 7 ml LA soft agara je inokulisano sa 70 µl suspenzije patogena i razliveno na LA podlogu na koju su bili postavljene modle za bunarčiće napravljene od sterilnih nastavaka, tako da je prečnik bunarčića iznosio oko 5 mm. U bunarčiće je nanošeno po 50 µl supernatanta i Petrijeve šolje su inkubirane 24 časa na 30 °C. Antagonistička aktivnost je procenjivana na osnovu pojave zone inhibicije bakterijskog rasta oko bunarčića. Svaki eksperiment je rađen u triplikatu, u dva nezavisna ponavljanja.

3.2.4.5. Kvalitativno određivanje produkcije egzoenzima

Hidrolitička aktivnost izolata praćena je na čvrstim hranljivim medijumima koji su sadržali supstrat za svaki testirani enzim. Na Petrijevu šolju je automatskom pipetom nanošeno po 5 µl prekonocne kulture izolata. Petrijeve šolje su inkubirane preko noći na temperaturama 25, 37 i 55 °C. Svaki eksperiment je rađen u triplikatu.

Detekcija amilaza

Nakon inkubacije na odgovarajućoj temperaturi, podloge su prelivene sa sveže pripremljenim Lugolovim rastvorom. Odsustvo tamno plave boje oko bakterijskih kolonija je potvrda proizvodnje amilaze.

Detekcija proteinaza

Nakon inkubacije na odgovarajućoj temperaturi, podloge su prelivene vodenim rastvorom taninske kiseline. Odsustvo belog taloga oko bakterijskih kolonija je potvrda proizvodnje proteinaze.

Detekcija lipaza

Nakon inkubacije na odgovarajućoj temperaturi, podloge su prelivene 0,2% vodenim rastvorom boje kongo crveno. Nakon 15 minuta su nekoliko puta ispirane 1M rastvorom NaCl. Pojava prosvetljenih zona oko bakterijskih kolonija na crveno obojenim podlogama je potvrda proizvodnje lipaza.

Detekcija mananaza

Nakon inkubacije na odgovarajućoj temperaturi, podloge su nekoliko puta prelivene 0,1% vodenim rastvorom NaCl. Pojava prosvetljenih zona oko bakterijskih kolonija na crveno obojenim podlogama je potvrda proizvodnje mananaza.

3.2.4.6. Testiranje PGPR osobina antagonističkih izolata

Test tolerancije izolata na abiotski stres

Izolati su ispitani na sposobnost tolerancije različitih abiotskih stresova- visoka temperatura (50 °C), salinitet (7% NaCl) i suša (polietilen glikol, PEG). Bakterijske kulture su gajene u LB medijumu na 30 °C uz aeraciju pri 180 rpm-a. Suspenzije su podešene na 2×10^5 CFU/ml i sa 2 µl suspenzije je inokulisan svež LB medijum. Bakterijske kulture su gajene na 50 °C, u LB medijumu sa 7% NaCl i u LB medijumima sa 32,6%, 40%, 55% i 70% PEG 6000. Rast izolata je praćen spektrofotometrijski (MRC UV-6300PC Double Beam, Izrael) i pravljena su odgovarajuća razblaženja suspenzija koja su zasejavana na LA podlogu i inkubirana 24 časa. Bakterijski izolati su smatrani tolerantnim na testirani abiotski stres ukoliko je vrednost optičke gustine bila veća od 0,1.

Merenje indeksa rastvorljivosti fosfata na podlozi sa nerastvorljivim fosfatom

Prekonoćna bakterijska kultura gajena u LB medijumu na 30 °C je isprana dva puta i resuspendovana u 0,9% NaCl. Automatskom pipetom je nanošeno 5 µl bakterijske suspenzije na Pikovski agar koji sadrži trikalcijum fosfat ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). Petrijeve šolje su inkubirane na 30 °C i praćene su narednih 7 dana na pojavu prosvetljenih zona oko bakterijskih kolonija.

Test produkcije indol-3-sirćetne kiseline

Za testiranje sposobnosti proizvodnje indol-3-sirćetne kiseline izolat je gajen u LB medijumu na 30 °C u šejkeru pri rotaciji od 180 rpm-a tokom noći. Prekonoćna bakterijska kultura je oslobođena ćelija centrifugiranjem 15 min na 13 000 rpm-a. U dobijeni supernatant je dodat Salperov reagens (1 ml 0,5 M FeCl_3 u 50 ml 37% HClO_4) u odnosu 2:1 i zatim inkubiran 30 min u potpunom mraku, na sobnoj temperaturi. Merena je optička gustina na 535 nm i na osnovu standardne krive je određena koncentracija indol-3-sirćetne kiseline.

Test produkcije cijanovodonika (HCN)

Bakterijske kulture su gajene 24 časa na 30 °C uz aeraciju pri 180 rpm-a. Komadić Cyantesmo papira (Machery-Nagel GmbH & Co., Nemačka) je uronjen u mikrotubu sa 700 µl prekonoćne kulture, tako da je deo papira ostao iznad rastvora. Nakon 15 minuta u zatvorenoj mikrotubi, praćena je promena boje Cyantesmo papira u plavu što ukazuje na oslobađanje HCN u atmosferu.

Test produkcije siderofora

Produkcija siderofora je praćena promenom boje CAS agara. Prekonoćna bakterijska kultura je zasejana ezom na polovini LA podloge koja je bila u dodiru sa

polovinom CAS agara. Petrijeve šolje su inkubirane 21 dan na 30 °C i promena boje CAS agara iz plavo-zelene u žutu je praćena na 7 dana.

3.2.4.7. Test produkcije biofilma

Iz prekonocne bakterijske kulture je podešena suspenzija antagonističkih izolata R3/3 i P4/16_1 na 1×10^8 CFU/ml. Za testiranje sposobnosti formiranja biofilma korišćene su mikrotitracione ploče sa 96 mesta i ravnim dnom. Bunarčići su naliveni sa 180 μ l MHB medijuma i 20 μ l bakterijske suspenzije. Pored bunara sa ispitivanim izolatima, postavljena je i negativna kontrola sa MHB medijumom. Nakon 48 časova inkubacije mikrotitarske ploče su odlivene i bunarčići su isprani tri puta sa 300 μ l PBS-a (temperiran na 25 °C). Bakterije koje su ostale zakačene za dno bunarčića su fiksirane sa 200 μ l metanola i nakon 20 min su ploče odlivene i ostavljene da se suše na vazduhu. Nakon sušenja, adherirane bakterije su u bunarčićima obojene sa po 150 μ l 2% kristal violeta (Lach-Ner, Republika Češka) u trajanju od 15 min. Višak nevezane boje je ispran tekućom česmenskom vodom, a boja vezana za adherirane bakterije je nakon 24 i 48 časova očitana na 570 nm (Multiskan FC reader, Thermo Fisher Scientific, Kina). Nakon očitavanja OD (*engl.* optical density, OD) izračunate su srednje vrednosti triplikata za sve testirane izolate i negativne kontrole. Eksperiment je ponovljen u triplikatu.

Da bi se odredila kategorija produkcije biofilma, za svaku mikrotitracionu ploču je definisana „cut off” vrednost (OD_c) koja predstavlja srednju vrednost apsorbance negativnih kontrola uvećane za vrednost od 3 SD (srednja vrednost OD negativne kontrole + 3SD). Prema dobijenoj vrednosti OD_c utvrđena je odgovarajuća kategorija (Stepanović et al., 2003):

$OD \leq OD_c$ - nema formiranja biofilma (kategorija 0);

$OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$ - slaba sposobnost formiranja biofilma (kategorija 1 ili +);

$2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$ - umerena sposobnost formiranja biofilma (kategorija 2 ili ++);

$4 \times OD_c < OD$ - izražena sposobnost formiranja biofilma (kategorija 3 ili +++).

3.2.4.8. Test produkcije bakteriocina

Potencijal izolata R3/3 da produkuje bakteriocine je testirana nanošenjem 10 μ l prekonocne kultura na centar LA podloge. Nakon inkubacije od 48 časova na 30 °C, Petrijeve šolje su okrenute na vatu natopljenu hloroformom tokom 45 min kako bi se uništile sve vijabilne ćelije. Preostali hloroform je isparen tako što su otvorene Petrijeve šolje izložene strujanju vazduha u laminarnoj komori. Nakon uklanjanja hloroforma, Petrijeva šolja je prelivena sa 5 ml LA soft agara inokulisanog sa 100 μ l prekonocne kulture senzitivnog autohtonog izolata *P. syringae*. Podloge su inkubirane 24 časa na 30 °C. Praćena je pojava zone inhibicije kao pozitivan rezultat na produkciju bakteriocina.

3.2.4.9. Test degradacije AHL signala

Sposobnost antagonističkog izolata da degraduje AHL signale (“quorum quenching”) je testirana difuzionim metodom u bunarčićima prema Romero et al. (2011). Sintetički acil-homoserin lakton (10 μ mol/l) je dodat u 500 μ l prekonocne kulture izolata R3/3 u LB medijumu i inkubiran tokom 24 časa na 30 °C uz aeraciju pri 180 rpm-a. Ista koncentracija AHL-a je dodata u 500 μ l LB medijuma i inkubirana 24 časa na 30 °C kao negativna kontrola. Za testiranje produkcije endogenog AHL-a, izolat je u istim uslovima gajen bez dodavanja sintetičkog AHL-a. Nakon inkubacije su bakterijske kulture oslobođene ćelija centrifugiranjem 15 min na 13000 rpm-a. Prisustvo AHL-a je detektovano inokulacijom 7 ml LA soft agara sa 700 μ l indikatorskog soja *Chromobacterium violaceum* CV026 koji je razliven na LA podlogama. U bunarčice, koji su formirani modlama od sterilnih nastavaka, je dodavano po 50 μ l supernatanta. Petrijeve šolje su inkubirane na 30 °C tokom 24 časa i praćena je promena boje oko bunarčića u ljubičastu. Izolat se smatra sposobnim za degradaciju AHL-a ako ne dolazi do promene boje oko bunara u koji je nanet supernatant sa dodatim AHL-om.

3.2.4.10. *In vitro* ko-kultivacija izolata R3/3 sa patogenima

Aktivnost izolata R3/3 na odabrane fitopatogene tokom ko-kultivacije je testirana u tečnom medijumu. Bakterijske kulture su gajene u LB medijumu do 1×10^8 CFU/ml na 30 °C uz aeraciju pri 180 rpm-a. Za ko-kulturu su bakterijske suspenzije razblažene do 1×10^7 i pomešane u odnosu 1:1 (Bragonzi et al., 2012). Ko-kultura je inokulisana čistom kulturom izolata R3/3 i pojedinačnim fitopatogenima: *P. syringae* GSPB 1142, *X. campestris* NCPPB 1144 i *E. amylovora* NCPPB 683 (referentni sojevi) i sa dva autohtona *P. syringae* izolata ČL2/2 i P7/16_2 iz filofsere šljive. Zapremina ko-kultura je iznosila 50 ml. Čiste kulture svake od bakterijskih kultura su postavljene za kontrole. Uzorkovanja su vršena na svakih sat vremena od nultog vremena do 10. časa i u 24. času i pravljena su odgovarajuća serijska razblaženja u sterilnom $1 \times$ PBS. Razblaženja su zasejavana na King's B agar (TM media, India) i inkubirana 48-72 časa na 30 °C. Na King's B agaru su dve vrste bile jasno razlikovane prema izgledu kolonija i razlikama u brzini rasta. Nakon 24 časa su bile uočljive kolonije izolata R3/3, dok su se kolonije patogenih izolata razvile nakon 48-72 časa. Na osnovu dobijenih rezultata izračunati su CFU/ml. Eksperiment je ponovljen u triplikatu, u dva nezavisna ponavljanja.

3.2.4.11. *In vitro* testiranje antibakterijske aktivnosti benzenovog ekstrakta izolata P4/16_1

Antibakterijski potencijal benzenovog ekstrakta izolata P4/16_1 je testiran na referentne fitopatogene sojeve *P. syringae* pv. *syringae* GSPB 1142, *X. campestris* pv. *campestris* NCPPB 1144 i *E. amylovora* NCPB 683 i na dva autohtona izolata *P. syringae* ČL2/2 i P7/16_2. Izolati su gajeni u LB medijumu 24 časa na 30 °C. Bakterijske suspenzije su podešene na 1×10^8 CFU/ml. Antibakterijska aktivnost ekstrakta je testirana difuzionim metodom u bunarčićima (Harris et al., 1989). Na LA podlogu sa modlama za bunarčiće je razliveno 7 ml LA soft agara inokulisanog sa 70 μ l suspenzije patogena. U bunarčiće je nanošeno po 50 μ l ekstrakta i Petrijeve šolje su inkubirane 24 časa na 30 °C. Testiran je i supernatant izolata P4/16_1 koji je dobijen oslobađanjem prekonocne kulture od ćelija. U

bunarčiče je nanošeno po 50 µl supernatanta. Za kontrolu rastvarača je bunarčić naliven sa 50 µl metanola. Aktivnost ekstrakta je procenjena na onovu pojave zone inhibicije bakterijskog rasta oko bunarčića. Svaki eksperiment je rađen u triplikatu u dva nezavisna ponavljanja.

3.2.5. Metode rada sa gljivama

3.2.5.1. Morfološka identifikacija gljiva

Identifikacija filamentoznih gljiva je izvršena na osnovu makroskopskih odlika kolonija i mikroskopskih karakteristika reproduktivnih struktura monosporičnih kultura. Praćeni su izgled i brzina razvoja kolonija na PDA podlozi, pigmentacija supstrata i izgled naličja kolonije. Od mikroskopskih karakteristika reproduktivnih struktura monosporičnih kultura praćene su: tip i građa konidiogenog aparata, oblik, veličina i ornamentura konidija, kao i način klijanja konidija. Korišćeni su dostupni ključevi za identifikaciju: Booth (1971a i 1971b); Ainsworth et al. (1973); Pitt (1979); Gerlach & Nirenberg (1982), Nelson et al. (1983), Brown (1987), Burgess et al. (1994); Ellis & Ellis (1997) i Kirk (2008). Za izolate *Monilinia* spp. su posmatrane karakteristične osobine prema Lane (2002): boja i oblik kolonije, odlike margine, sporulacija, prisustvo koncentričnog prstena spora, brzina porasta i prisustvo crne marginalne linije.

3.2.5.2. *Ex situ* testiranje patogenosti autohtonih izolata *Monilinia laxa* na plodu šljive

Patogenost tri izolata *M. laxa* (M1, M8 i M13) je testirana na plodovima sorti Čačanska rodna i Požegača. Plodovi su dezinfikovani 2 minuta u 70% etanolu, dva puta isprani u sterilnoj vodi i izloženi strujanju vazduha u laminarnoj komori kako bi se uklonio višak vlage. Na plodovima su nanošene rane prečnika 6 mm pomoću bušača i inokulisane su fragmentima micelije uzorkovane sa periferije kultura starih sedam dana. Kao negativna kontrola postavljeni su plodovi sa fragmentima sterilne PDA podloge. Za svaki izolat je

inokulisano pet plodova. Plodovi su postavljeni na vlažnu vatu u kutije koje su zatvorene kako bi se održavao visok nivo vlage i inkubirane na 25 °C. Nakon 72 časa inkubacije vizuelno je procenjivan procenat zahvaćenosti ploda micelijom *M. laxa* u odnosu na ukupnu površinu ploda. Procenat zahvaćenosti ploda je ocenjivan proizvoljno u rasponu od 0%, čime je predstavljeno potpuno odsustvo micelije, pa do vrednosti od 100%, kako je ocenjena potpuna zahvaćenost ploda micelijom *M. laxa*.

3.2.5.3. *In vitro* testiranje antagonističke aktivnosti bakterija i kvasaca na *Monilinia* spp.

Potencijal 53 bakterijska izolata i 5 kvasaca izolovanih iz filofsere četiri sorte šljive da inhibiraju rast autohtonih izolata roda *Monilinia* je testiran na PDA podlozi. Bakterijski izolati su gajeni u LB medijumu, a izolati kvasaca u YPD medijumu tokom 24 časa na 30 °C. U primarnom skriningu je testiranje sprovedeno na svih 11 izolata *Monilinia* spp. Po četiri izolata bakterija i kvasaca su zasejavana ezom na PDA podloge i poravnata u pravougaonom obliku na udaljenosti od 25 mm od fungalnog inokuluma postavljenog u centralni deo podloge. Inokulum prečnika 5 mm je uziman sa periferije kulture stare sedam dana. Nakon sedam dana inkubacije na 25 °C, ocenjivan je potencijal izolata za antifungalnu aktivnost na osnovu sposobnosti kontaktne inhibiciju rasta micelije ili potencijala da inhibiraju miceliju sa vidljivim suzbijanjem rasta micelije. Tri najosetljivija izolata (M1, M8 i M13) i najaktivniji bakterijski izolat (P4/16_1) su odabrani za dalji skrining na antagonističku aktivnost u dualnoj kulturi. Fungalni inokulum je uzorkovan sa periferije kolonije stare 7 dana i postavljen u sredinu PDA podloge, sa udaljenošću 25 mm od ivice Petrijeve šolje. Prekonočna bakterijska kultura antagonističkog izolata je zasejana na udaljenosti 30 mm od fungalnog inokuluma u vidu linije. Kontrolu su predstavljale podloge zasejane samo izolatima *Monilinia* spp. Sve kulture su inkubirane 7 dana na 25 °C. Eksperiment je rađen u triplikatu za svaki izolat *Monilinia* spp. Antifungalna aktivnost izolata je određena na osnovu inhibicije rasta micelije prema formuli za procenat inhibicije rasta (PGI%):

$$PGI\% = \frac{100(KR-R1)}{KR},$$

gde je *KR* rastojanje od fungalnog inokuluma do margine kolonije u kontroli, a *RI* je rastojanje od fungalnog inokuluma do margine kolonije u pravcu P4/16_1 izolata u tretmanu. Vrednosti su izražene u mm.

3.2.5.4. *In vitro* testiranje antifungalne aktivnosti isparljivih organskih jedinjenja izolata P4/16_1

Potencijal izolata P4/16_1 da produkuje VOC je testiran na tri izolata *Monilinia* spp. u zatvorenoj atmosferi prema Giorgio et al. (2015). Jedna PDA podloga je inokulisana fragmentom micelije, a na drugoj je utrljana dvostruko razblažena prekonocna kultura izolata P4/16_1. Inokulisane podloge su bez poklopca postavljene jedna naspram druge, zatvorene Parafilm[®]-om i inkubirane na 25 °C tokom dve nedelje. Postavljena je i pozitivna kontrola bez bakterijskog izolata. Prečnik kolonije je izmeren i izračunat je procenat radialne inhibicije rasta (PIRG%), prema formuli datoj u potpoglavlju 3.2.5.3. U ovom slučaju *KR* predstavlja prečnik kolonije u kontroli, a *RI* je prečnik kolonije u prisustvu ekstrakta.

3.2.5.5. *In vitro* testiranje antifungalne aktivnosti benzenovog ekstrakata izolata P4/16_1

Potencijal benzenovog ekstrakta izolata P4/16_1 da inhibira rast tri *M. laxa* izolata je testirana *in vitro*. Na PDA podlogu je utrljano 100 µl benzenovog ekstrakta rastvorenog u metanolu. Fungalni inokulum sa periferije kulture stare sedam dana je postavljen na centar PDA podloge sa ekstraktom. Postavljena je i kontrola samo sa inokulumom izolata *M. laxa*. Eksperiment je urađen u triplikatu za svaki izolat. Inokulisane Petrijeve šolje su inkubirane

na 25 °C i meren je prečnik kolonije nakon 7 dana. Izračunat je procenat radijalne inhibicije rasta (PIRG%) na prethodno opisani način.

3.2.5.6. Analiza uticaja pune kulture i benzenovog ekstrakata na morfologiju hifa gljiva

Morfo-fiziološke promene na hifama izolata *M. laxa* nastale pod uticajem benzenovog ekstrakta i ko-kulture sa izolatom P4/16_1 su posmatrane pod svetlosnim i skening elektronskim mikroskopom (SEM). Za svetlosnu mikroskopiju uzorci su bojeni bojom Laktofenol pamuk plavo. Mikroskopiranje je vršeno na svetlosnom mikroskopu AxioImager M.1 (Zeiss) uz primenu programa AxioVision Release 4.6. Za SEM, uzorci na aluminijumskim cilindrima prekrivani su slojem zlata ($d=15$ nm, $\rho=19,2$ g/cm³) primenom Leica EM SCD005 (Leica Microsystems, Nemačka). Mikroskopiranje je vršeno u SEM laboratoriji Rudarsko-geološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu korišćenjem mikroskopa JSM-6610LV (Jeol, Japan), pri naponu ubrzanja od 20kV, pritisku od 15-30 μ Pa i uveličanju u rasponu od 150 do 30.000 puta.

3.2.5.7. Testiranje uticaja pune kulture i benzenovog ekstrakta na redukciju nekroze ploda šljive *ex situ*

Sposobnost izolata R3/3 i P4/16_1, kao i benzenovog ekstrakta izolata P4/16_1 da suzbiju rast tri izolata *M. laxa* (M1, M8 i M13) *ex situ* je testirana na plodovima sorti Požegača i Ranka. Plodovi su dezinfikovani 2 minuta u 70% etanolu i dva puta isprani u sterilnoj vodi. Višak vlage je uklonjen strujanjem vazduha u laminarnoj komori. Na plodovima su nanošene rane prečnika 6 mm pomoću bušača. Biokontrolni potencijal bakterijskih izolata R3/3 i P4/16_1 je testiran tako što su rane na plodovima inokulisane sa 50 μ l bakterijskih suspenzija podešenih na 1×10^8 . Za testiranje aktivnosti benzenovog ekstrakta izolata P4/16_1 rane na plodovima su inokulisane sa 20 μ l metanolnog rastvora ekstrakta. Nakon nanošenja suspenzija i ekstrakata, plodovi sorti Požegača i Ranka su

inokulisani sa fragmentima micelije uzorkovane sa periferije kultura starih sedam dana. Kao negativna kontrola postavljeni su plodovi sa fragmentima sterilne PDA podloge. Plodovi sa inokulumom *M. laxa* izolata su predstavljali kontrole rasta. Da bi se isključio negativan efekat bakterija, odnosno rastvarača na plod šljive, testirano je i po 50 μ l bakterijskih kultura i metanola. Za svaki izolat *M. laxa* je inokulisano pet plodova po sorti šljive. Plodovi su postavljeni na vlažnu vatu u kutije koje su zatim zatvorene da bi se održavao visok nivo vlage i inkubirane su na 25 °C. Eksperiment je ponovljen u triplicatu. Procenat inficiranosti ploda micelijom izolata *M. laxa* i efekat bakterijskih suspenzija i benzenovog ekstrakta je izračunat nakon 5 dana inkubacije ocenjivanjem procenta zahvaćenosti ploda micelijom kao što je prethodno objašnjeno u potpoglavlju 3.2.5.2.

3.2.6. Metode izolacije i detekcije antimikrobnih supstanci

3.2.6.1. *In vitro* testiranje potencijala izolata P4/16_1 za produkciju fenazin-1-karboksilne kiseline

Test na produkciju fenazin-1-karboksilne kiseline (*engl.* phenazine-1-carboxylic acid, PCA) je sproveden prema metodi Parejko et al. (2012). Izolat P4/16_1 je gajen preko noći u LB medijumu na 25 °C. Prekonoćna kultura je podešena na 1×10^5 CFU/ml i 10 μ l suspenzije je naneto automatskom pipetom na PDA, kao i na kontrolne TSA podloge. Rezultati su praćeni nakon 2, 4 i 7 dana inkubacije na 25 °C. Izolat se smatra pozitivnim na produkciju PCA ukoliko se uoče tamnozeleni kristali na kolonijama koje su rasle na PDA podlozi.

3.2.6.2. Izolacija fenazina benzenovom ekstrakcijom

Ekstrakcija fenazinskih jedinjenja iz izolata P4/16_1 je izvršena benzenovom ekstrakcijom prema Jain & Pandey (2016). Bakterijska kultura je gajena 4 dana u MSM medijumu na 25 °C. Nakon inkubacije, bakterijska kultura je oslobođena ćelija centrifugiranjem i supernatant je acidifikovan na pH 2 koncentrovanom HCl. Ekstrakcija je izvršena dva puta sa jednakom zapreminom benzena. Benzenova frakcija je odvojena u levku za razdvajanje, filtrirana kroz filter papir i isparena do suva na rotacionom uparivaču (Buchi Rotavapor R-114, Švajcarska) na 55 °C. Sirovi ekstrakt je rastvoren u metanolu u finalnoj koncentraciji od 10 mg/ml i korišćen je za dalju hemijsku analizu i testiranje antimikrobne aktivnosti.

3.2.6.3. Analiza hemijskog sastava benzenovog ekstrakta izolata P4/16_1

Sirov benzenov ekstrakt rastvoren u metanolu je analiziran ThermoFisher Scientific Accela tačnom hromatografijom visokih performansi (UHPLC) kuplovanom sa linearnim Ion Trap/OrbiTrap hibridnim masenim spektrometrom (LTQ OrbiTrap MS, Thermo Fisher Scientific, SAD). Maseni detektor je bio podešen na negativni jonizacioni mod. Synchronis C18 (100 × 2,1 mm, veličina čestica 1,7 μm) analitička kolona je korišćena za razdvajanje jedinjenja iz ekstrakta. Mobilna faza se sastojala iz (A) ultračiste vode + 0,2% mravlje kiseline (MS stepen čistoće) i (B) acetonitrila (MS stepen čistoće). Korišćen je program linearnog gradijenta pri protoku od 0,275 ml/min: 0,0–1,0 min 5% B, 1,0–16,0 min od 5 do 95% B, 16,0–16,1 min od 95 do 5% B, zatim 5% B tokom 6 min. Parametri izvora jona i podešavanja koja su zavisna od dobijenih podataka postavljani su prema Vasić et al. (2019). Analiza potpunog skeniranja je korišćena za otkrivanje monoizotopnih masa deprotonovanih nepoznatih jedinjenja, dok je MS⁴ eksperiment pokazao put fragmentacije. Program za crtanje molekula ChemDraw (verzija 12.0) je korišćen kao referentna biblioteka za izračunavanje tačne mase jedinjenja koja su bila od interesa. Tentativna identifikacija

jedinjenja od interesa ostvarena je masenom spektrometrijom visoke rezolucije (HRMS) i MSⁿ fragmentacijom.

3.2.7. Statističke analize

Dobijeni rezultati su nakon provere normalnosti Kolmogorov-Smirnovim testom, obrađeni analizom standardne varijanse (One-way ANOVA test). Srednje vrednosti nekroza u testovima patogenosti na listovima i plodovima šljive i srednje vrednosti brojnosti populacije u *in vitro* testu ko-kultivacije antagoniste sa patogenima su dobijeni korišćenjem Tukey's HSD (honest significant difference) testa. Takođe, isti test je primenjen i u slučaju dobijanja srednjih vrednosti procenata inhibicije rasta micelije u *in vitro* uslovima i procenata nekroze ploda šljive *ex situ*. Statistička značajnost primenjena u svim testovima je bila $P < 0,05$. Statistička analiza je izvršena primenom softverskog programa IBM SPSS Statistics v.23 (SPSS, Inc.).

4. REZULTATI

4. REZULTATI

4.1. Diverzitet mikrobijalnih zajednica filofsere šljive

Tokom dve fenološke faze u razvoju ploda šljive (rana faza u maju i faza sazrevanja u julu) su sakupljeni uzorci listova i plodova u cilju analiziranja bakterijskih i fungalnih zajednica filofsfera dve autohtone sorte (Ranka i Požegača) i dve hibridne sorte šljive (Čačanska Rodna i Čačanska Lepotica). U svakom uzorku je ukupna zajednica analizirana primenom metagenomskog pristupa, a kultivabilna zajednica je izolovana tradicionalnim kultivabilnim pristupom.

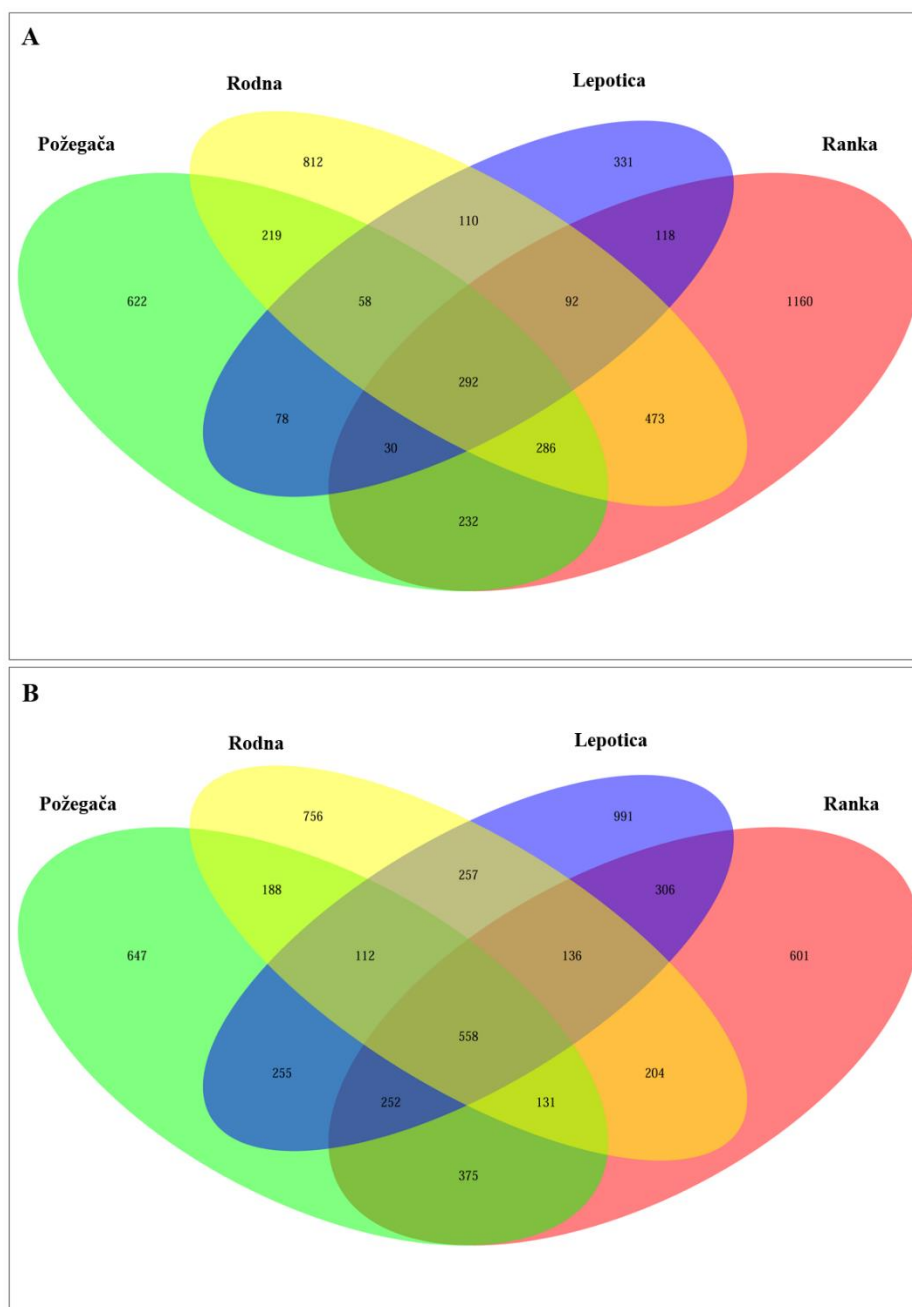
4.1.1. Diverzitet bakterijskog mikrobioma

4.1.1.1. Metagenomski podaci i diverzitet bakterija

Za analizu sastava bakterijskog mikrobioma umnožen je i sekvenciran V1-V3 region gena za 16S rRNK iz osam izolovanih DNK uzoraka. Prosečna dužina dobijenih sekvenci je iznosila 574 bp. Uklanjanjem adapterskih sekvenci i filtriranjem sekvenci odgovarajućih dužina, u uzorcima iz maja je zadržano 1 074 944 sekvenci sa uparenim krajevima, a u uzorcima iz jula 1 052 610 sekvenci (Prilog 1).

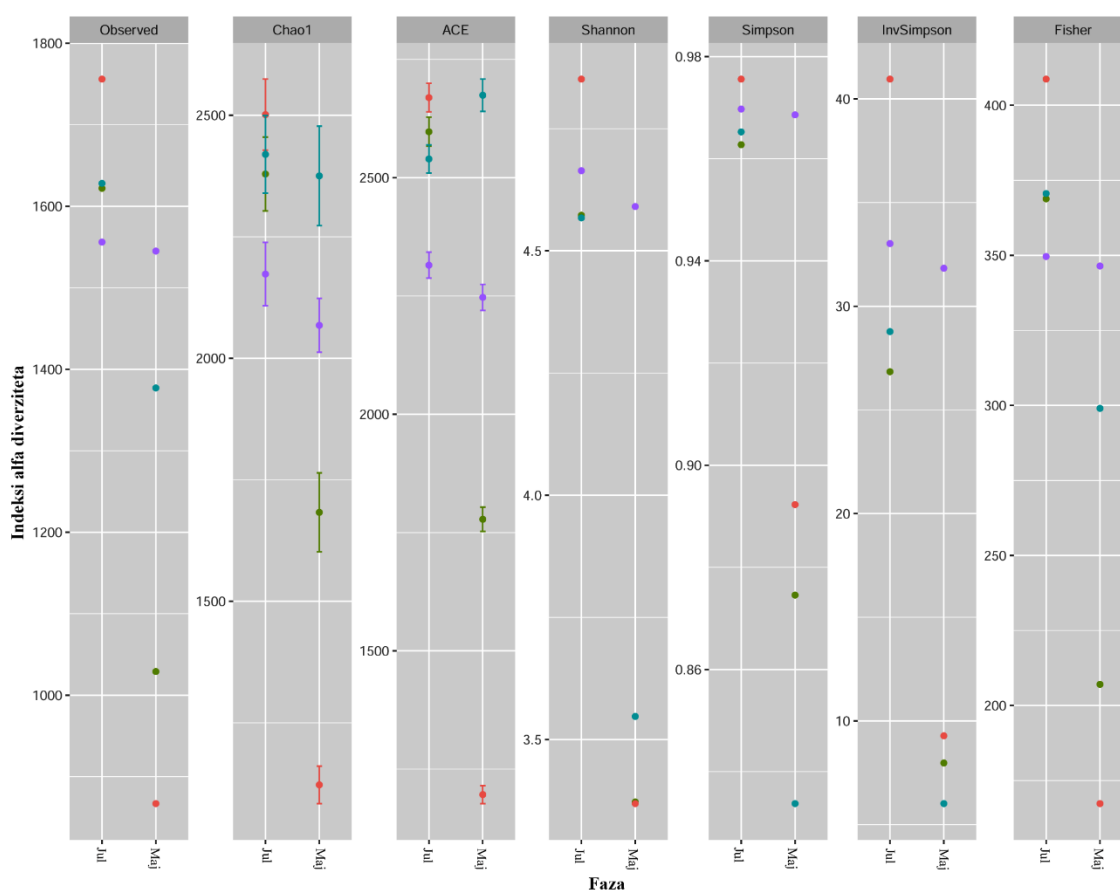
Grupisanjem dobijenih OTU-a, uklanjanjem himera i sekvenci poreklom od hloroplasta, određen je ukupan broj OTU-a koji je iznosio 7 951 u maju i 10 848 u julu. Na Venovom dijagramu je predstavljen broj jedinstvenih i zajedničkih OTU-a za analizirane sorte šljive (Slika 4). U maju su sorte delile 292 detektovana OTU-a, dok je u julu uočeno povećanje na 558 zajedničkih OTU-a. Između dve fenološke faze su zapažene razlike u distribuciji broja OTU-a jedinstvenih za svaku sortu. Kod sorte Lepotica se broj jedinstvenih OTU-a značajno povećao u julu mesecu, kada je vrednost bila veća za 1 758 OTU u odnosu na maj. Rodna je imala identične vrednosti OTU-a za oba uzorkovanja, a

kod Ranke je njihov broj opao u uzorcima iz jula. Ukupan broj OBS kod Rodne, Ranke, Požegače i Lepotice u maju je bio, redom, 2 342, 2 683, 1 817 i 1 109, a u julu je detektovano 2 342, 2 563, 2 518 i 2 867 OTU-a.



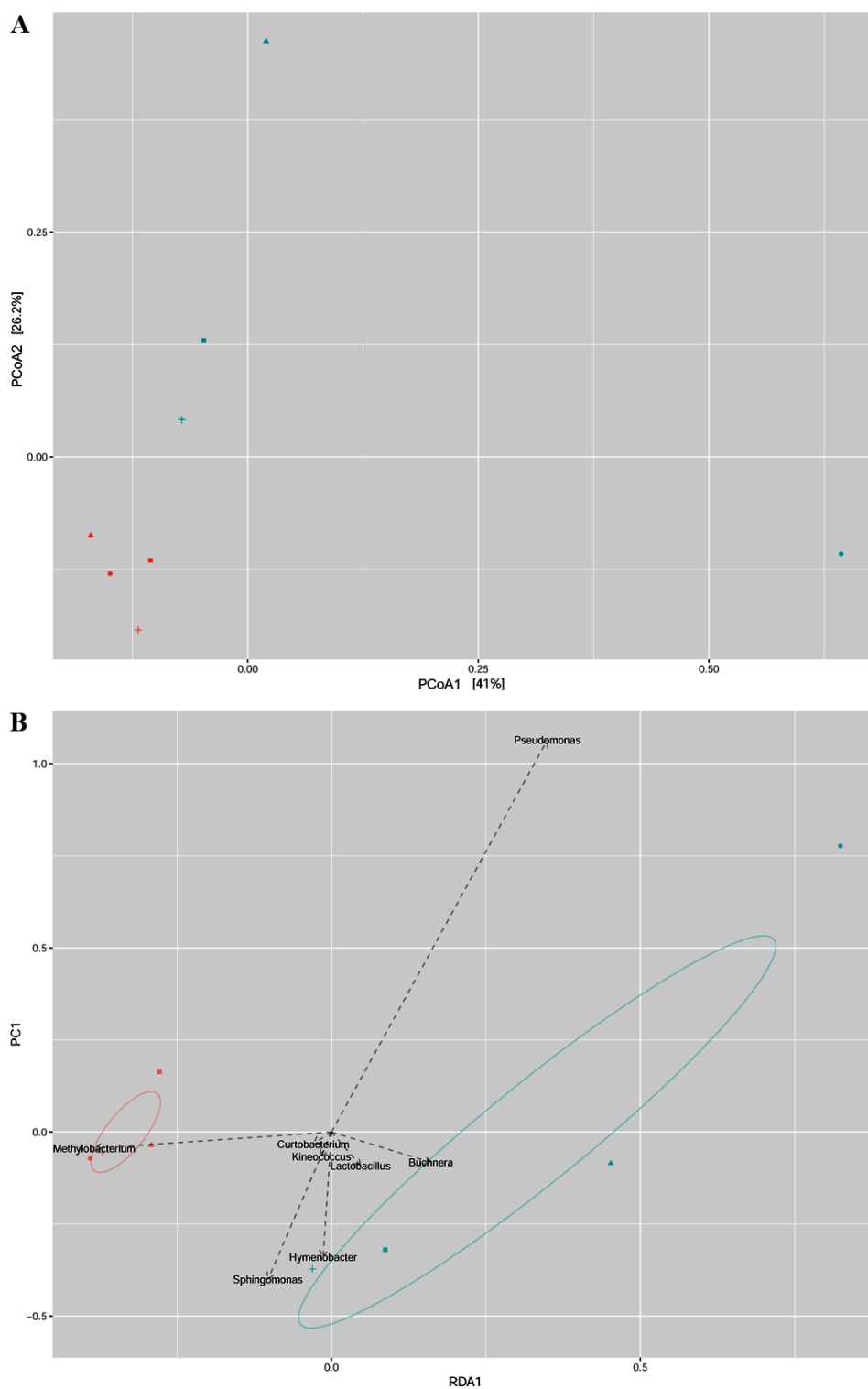
Slika 4. Venov dijagram distribucije OTU-a za uzorke bakterija između četiri sorte šljive u dve fenološke faze: maj (A); juli (B).

Na Slici 5. su prikazani indeksi alfa diverziteta bakterijskih zajednica na nivou roda. Najveći diverzitet tokom rane fenološke faze je detektovan na sorti Rodna i bio je u pozitivnoj korelaciji sa procenjenim bogatstvom rodova. Na sortama Lepotica i Požegača je zabeleženo znatno veće bogatstvo rodova u julu u odnosu na maj. Prema Chao1 indeksu, koji procenjuje bogatstvo rodova, sorte Ranka i Rodna su imale slične vrednosti u maju i julu. Indeksi diverziteta su bili značajno veći kod uzoraka u julu u odnosu na maj na svim sortama, osim za Rodnu, sa zabeleženim konstantnim diverzitetom u obe analizirane faze.



Slika 5. Alfa diverzitet bakterijskih zajednica 4 sorte šljive (Lepotica ●, Rodna ●, Požegača ● i Ranka ●) u dve fenološke faze. Prikazani rezultati se odnose na raznovrsnost bakterijskih rodova.

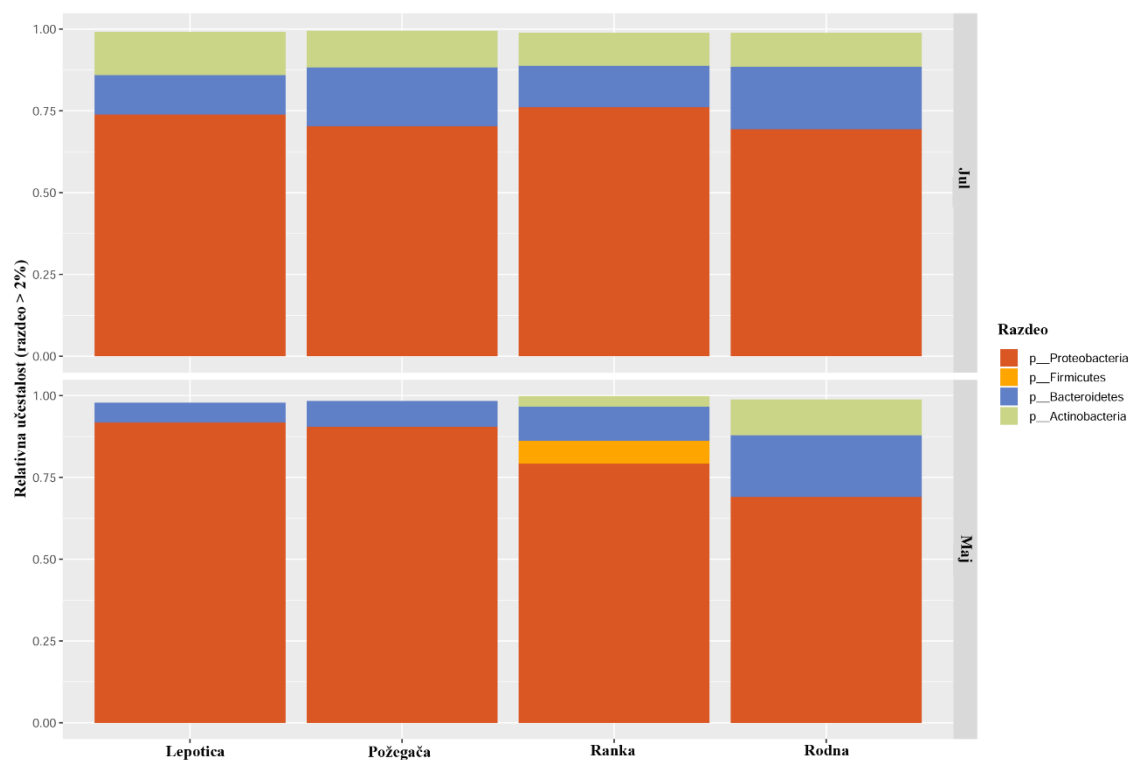
Za određivanje beta diverziteta konstruisani su PCoA i RDA grafici (Slika 6). PCoA analiza je korišćena u cilju poređenja sastava bakterijskih zajednica između sorti i različitih fenoloških faza. Sorta Lepotica je u maju bila jasno odvojena od ostalih uzoraka, u odnosu na glavnu PCoA1 osu. Prema PCoA2 osi, koja objašnjava 26,2% varijacija u uzorcima, Požegača se takođe razdvojila u maju od drugih sorti (Slika 6A). U julu, svi uzorci su jasno grupisani u odnosu na obe ose i odvojeni od uzoraka iz maja meseca. RDA analiza je odredila koji bakterijski rodovi su najviše doprineli strukturnoj razlici između bakterijskih zajednica (Slika 6B). Prema RDA1 osi, Lepotica se u maju izdvaja sa vrstama roda *Pseudomonas* kao dominantnim u sastavu zajednice. Uzorci sa sve četiri sorte su u julu jasno grupisani sa dominantnim vrstama roda *Methylobacterium*.



Slika 6. Analiza beta diverziteta bakterijskih zajednica tokom dve fenološke faze 4 sorte šljive (Lepotica ●, Rodna +, Požegača ▲ i Ranka ■): PCoA analiza (A); RDA analiza (B). Plavi i crveni simboli predstavljaju uzorke iz maja i jula, redom.

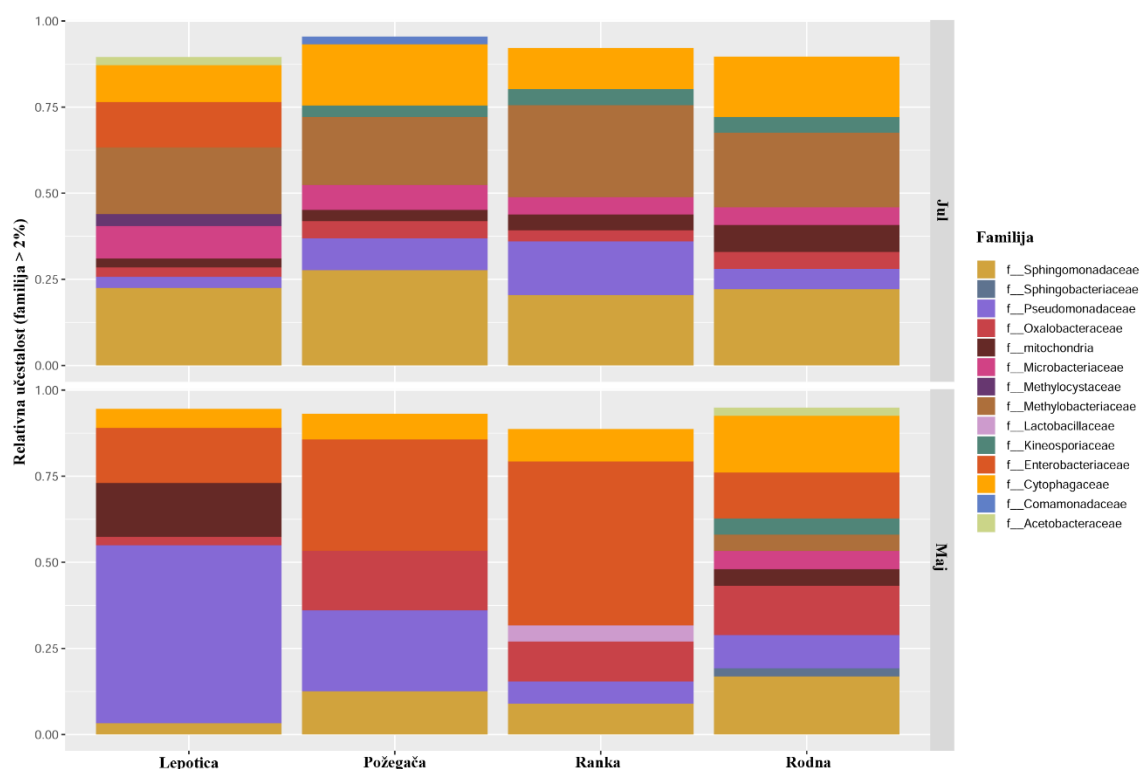
4.1.1.2. Sastav ukupne bakterijske zajednice

Klasifikacija je izvršena upoređivanjem OTU sekvenci sa SILVA bazom. U Prilogu 2. su prikazani identifikovani razdeli, familije i rodovi, kao i relativna učestalost (*engl.* relative abundance, RA) njihovih predstavnika. Na osnovu analiziranih sekvenci pokazano je da su predstavnici razdela Proteobacteria najzastupljeniji na svim sortama i u svim fenološkim fazama. Najmanja zastupljenost iznosila je 69% na Rodnoj u maju, a najveća 92% na Lepotici, takođe u maju. Pored svih identifikovanih razdela samo su još predstavnici razdela Bacteroidetes i Actinobacteria bili zastupljeni sa preko 2% u najvećem broju uzoraka (Slika 7). Kod sorte Ranka je u maju relativna zastupljenost pripadnika razdela Firmicutes iznosila 7%. U drugim uzorcima je zabeležen značajno manji udeo predstavnika ovog razdela sa procentima u opsegu od 0,1 – 0,6%. Predstavnici preostalih 13 razdela su bili zastupljeni u jako malim procentima.



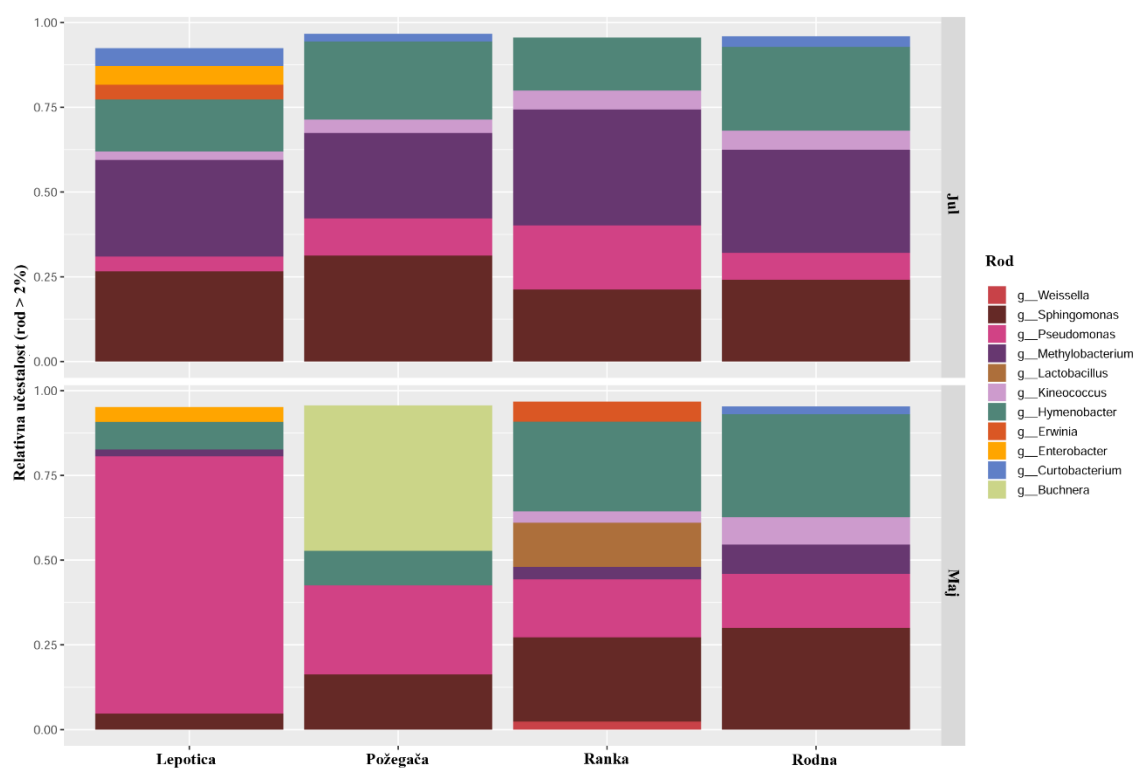
Slika 7. Relativna učestalost predstavnika bakterijskih razdela četiri sorte šljive u dve fenološke faze. Prikazani su razdeli sa predstavnicima iznad 2% relativne zastupljenosti.

Na Slici 8. su prikazane familije sa predstavnicima koji imaju RA veću od 2%. Na nivou familije, najveći deo bakterijskih zajednica su činili pripadnici Pseudomonadaceae sa 52% (Lepotica u maju) i Sphingomonadaceae u opsegu od 17% do 28% (Rodna u maju i julu, Požegača i Lepotica u julu). Visok procenat zastupljenosti vrsta familije Enterobacteriaceae u maju su imale sorte Požegača (32%) i Ranka (47%). Vrste familije Methylobacteriaceae sa 27% zastupljenosti su dominirale na Ranki u julu, a na ostale tri sorte su bile druge po zastupljenosti u istom periodu. Familije sa predstavnicima čija je RA veća od 10% su Oxalobacteraceae u maju (na Rodnoj, Požegači i Ranki) i Cytophagaceae (na Rodnoj u maju i kod svih sorti u julu). Od 14 determinisanih familija, predstavnici većine su bili zastupljeni sa nižim RA vrednostima koje su varirale među sortama i fenološkim fazama (Prilog 2).



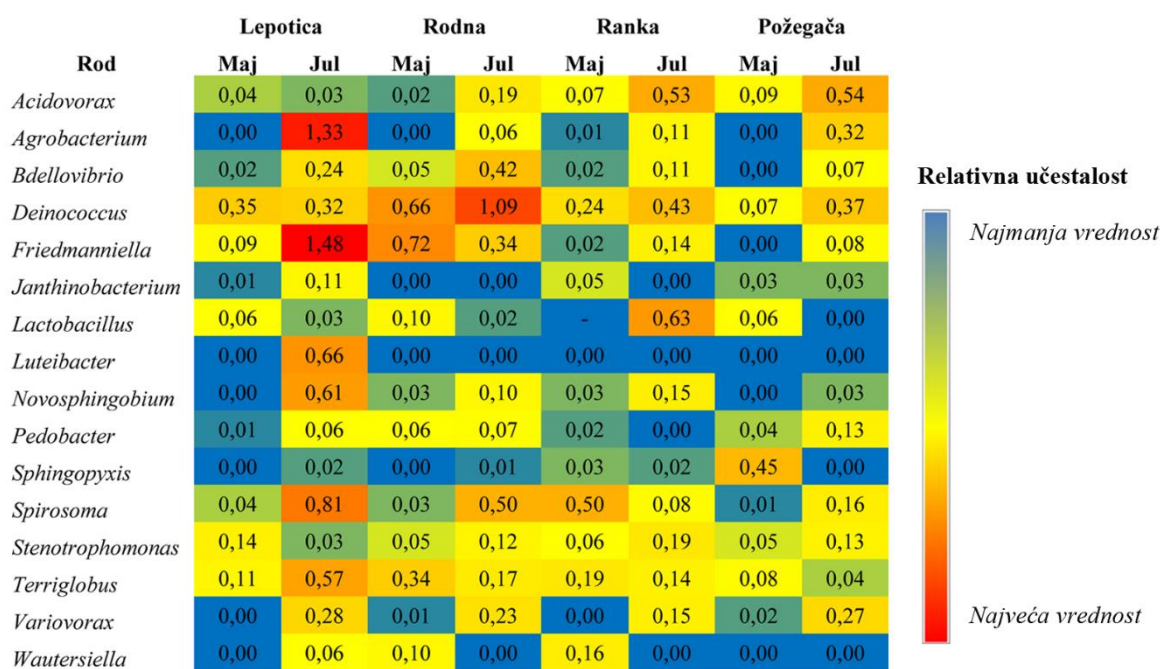
Slika 8. Relativna učestalost predstavnika bakterijskih familija četiri sorte šljive u dve fenološke faze. Prikazane su familije sa predstavnicima iznad 2% relativne zastupljenosti.

Na Slici 9. je prikazana relativna zastupljenost predstavnika rodova sa vrednostima većim od 2%. Vrste različitih rodova su dominirale među sortama u maju. Vrste roda *Pseudomonas* su bile najzastupljenije na Lepotici sa 76%, dok ih u drugim uzorcima ima u znatno manjem udelu, od 16 do 26%. Na Požegači su dominirale vrste roda *Buchnera* sa 43% koje nisu detektovane ni u jednom drugom uzorku ili fenološkoj fazi. Vrste roda *Hymenobacter* su imale najvišu relativnu zastupljenost na sortama Rodna i Ranka sa 30% i 26%, redom. U julu na Lepotici, Rodnoj i Ranki bile su dominantne vrste roda *Methylobacterium*, a na Požegači, pored vrsta roda *Sphingomonas*, bile su druge po udelu u bakterijskoj zajednici. Vrste roda *Sphingomonas* su detektovane u svim uzorcima i uvek među tri najzastupljenija roda, nezavisno od fenološke faze.



Slika 9. Relativna učestalost predstavnika bakterijskih rodova četiri sorte šljive u dve fenološke faze. Prikazani su predstavnici rodova iznad 2% relativne zastupljenosti.

Preko 2% relativne učestalosti imali su vrste rodova *Enterobacter*, *Curtobacterium*, *Erwinia*, *Kineococcus* i *Weissella*. Iz osam uzoraka filosofere šljive ukupno su identifikovani predstavnici 142 roda, ali je najveći broj predstavnika ovih rodova imao malu zastupljenost u ukupnoj bakterijskoj zajednici sa vrednostima između 0,01 i 2% (Slika 10). Vrste roda *Bacillus* su detektovane u veoma malim procentima sa vrednostima ispod 0,1% (Prilog 2).

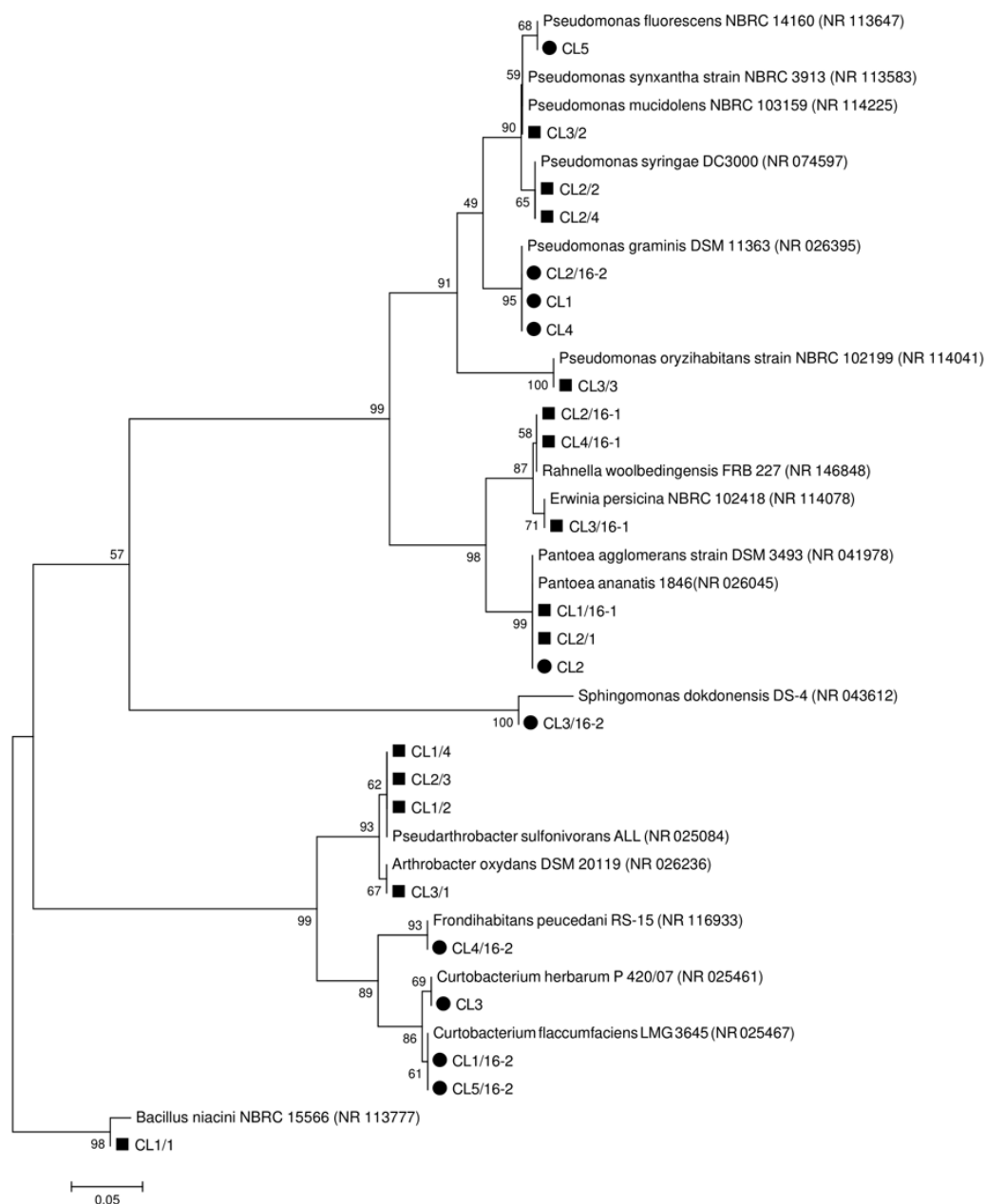


Slika 10. Relativna zastupljenost predstavnika bakterijskih rodova do 2% četiri sorte šljive u dve fenološke faze.

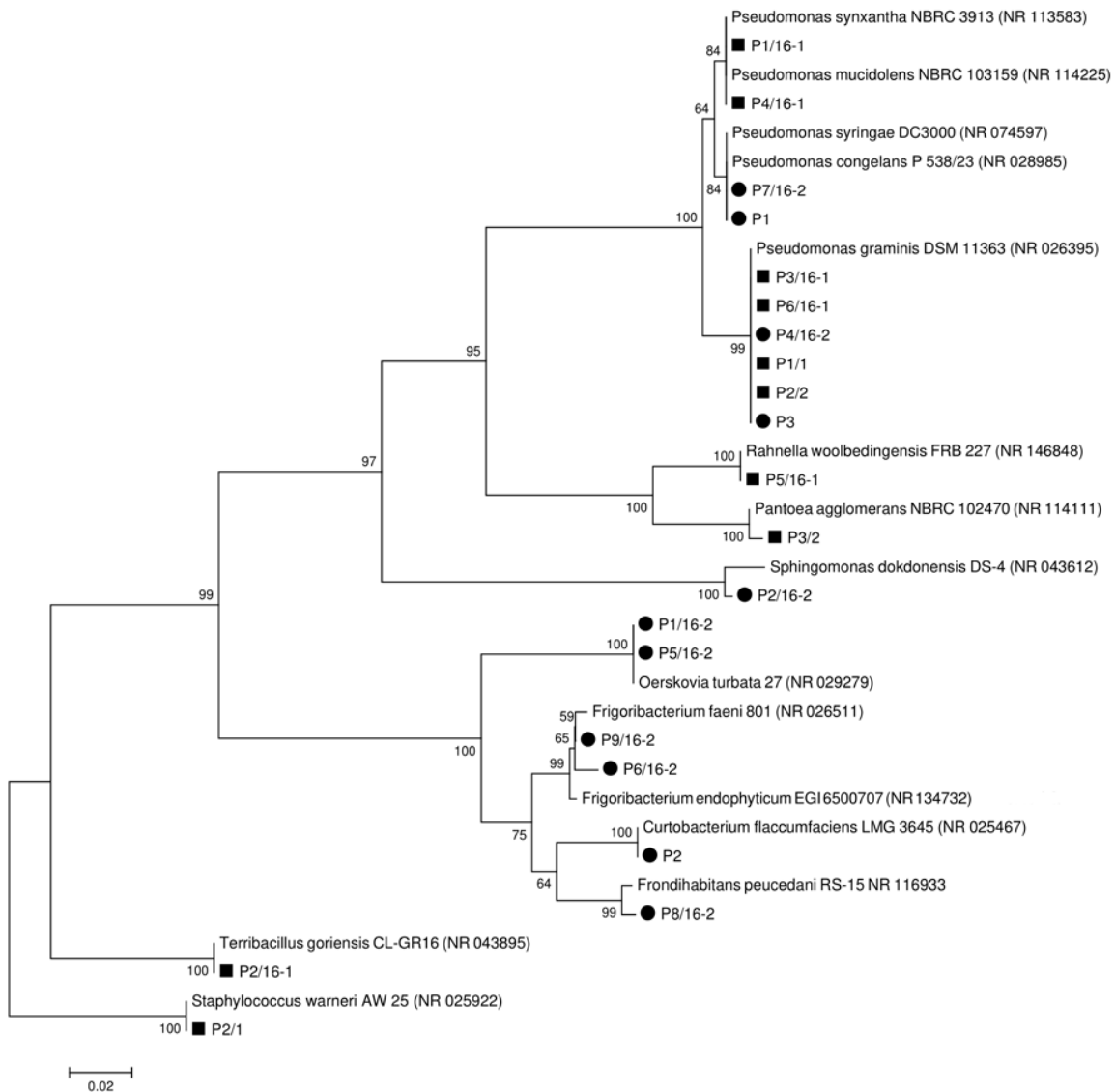
4.1.1.3. Kultivabilna bakterijska zajednica

Isti biljni materijal koji je bio pripremljen za metagenomsku analizu zajednica korišćen je i za tradicionalni kultivabilni pristup. Iz uzoraka filosofere 4 sorte šljive u dve fenološke faze je na osnovu morfologije razdvojeno i izolovano ukupno 85 potencijalno različitih bakterijskih kolonija. Preliminarna identifikacija izvršena je bojenjem po Gramu. Prema Gram reakciji bilo je 35 gram-pozitivnih i 50 gram-negativnih izolata iz kojih je izolovana ukupna DNK za dalju karakterizaciju. Analizom sekvenciranih gena za 16S

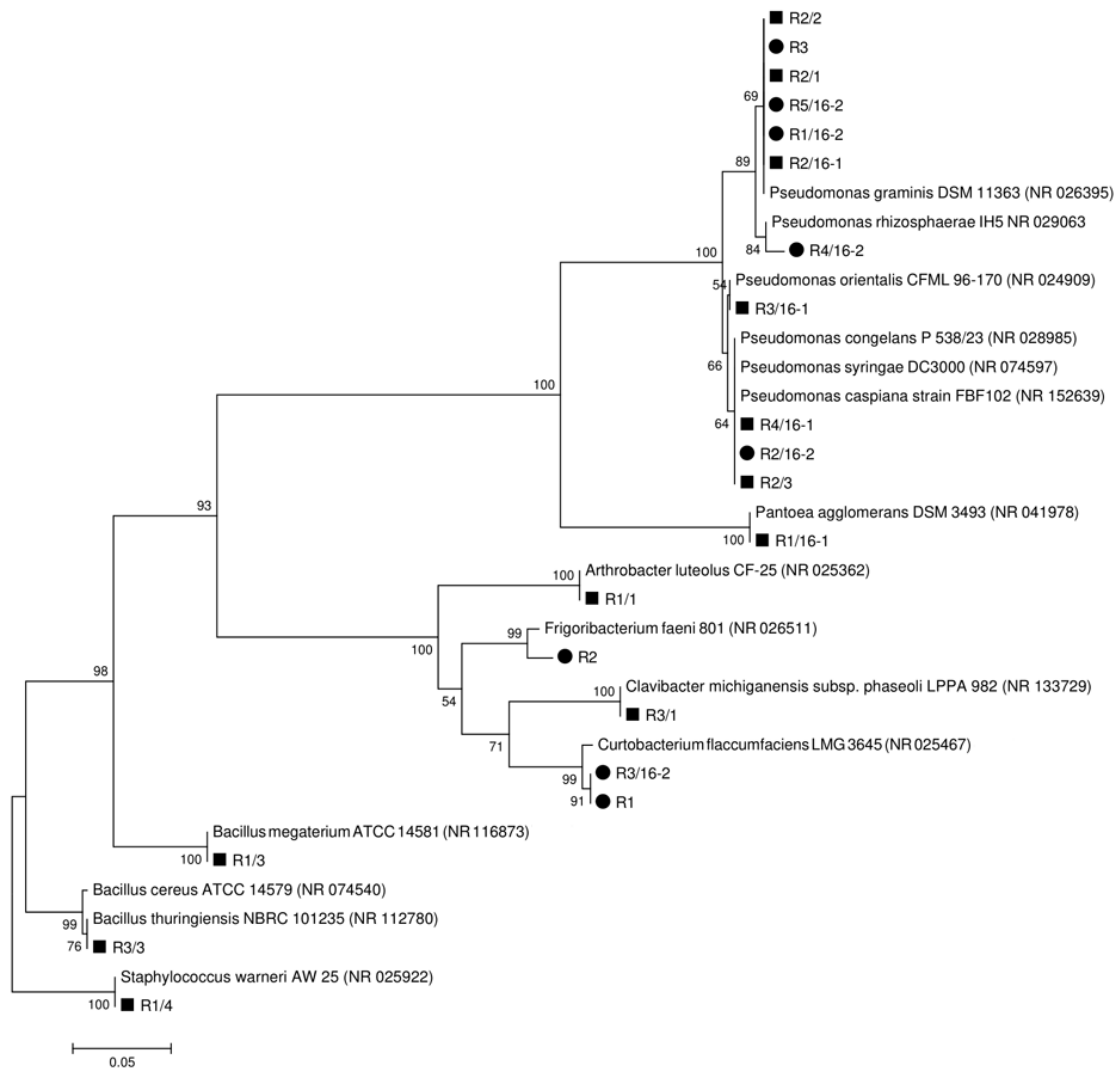
rRNK ukupno je identifikovano 32 vrste iz 17 rodova sa sve 4 sorte šljive. Filogenetski odnosi izolata sa svake sorte šljive su prikazani na slikama 11-14.



Slika 11. Filogenetski odnosi izolata sa sorte Čačanska leptotica na osnovu sekvence gena za 16S rRNK. Filogenetska stabla su konstruisana Neighbor-joining metodom i distance su izračunate Kimura dvo-parametarskim modelom. Na stablu su izolati iz maja i jula prikazani simbolima ■ i ●.

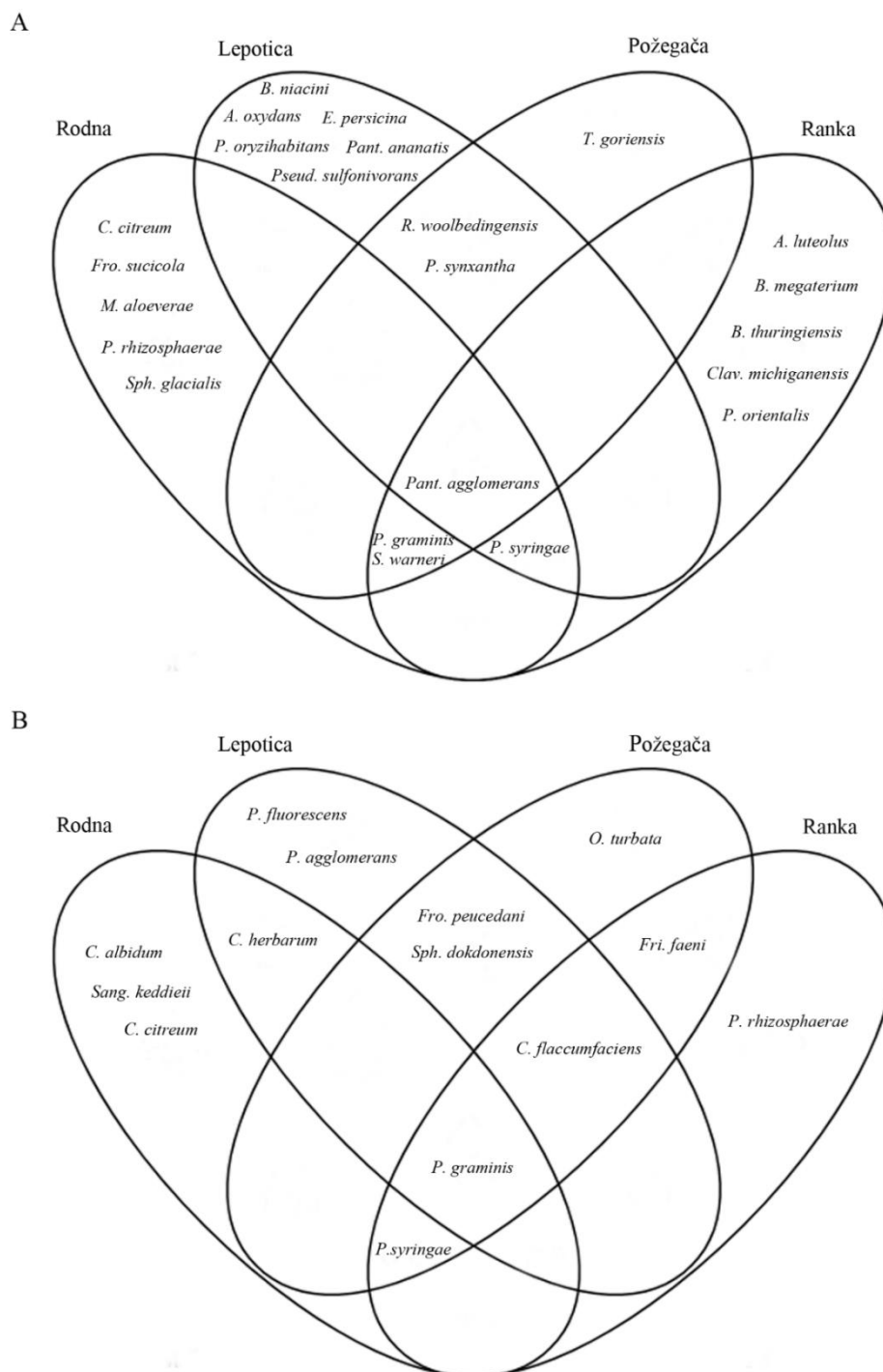


Slika 13. Filogenetski odnosi izolata sa sorte Požeगाča na osnovu sekvence gena za 16S rRNK. Filogenetska stabla su konstruisana Neighbor-joining metodom i distance su izračunate Kimura dvo-parametarskim modelom. Na stablu su izolati iz maja i jula prikazani simbolima ■ i ●.



Slika 14. Filogenetski odnosi izolata sa sorte Ranka na osnovu sekvence gena za 16S rRNK. Filogenetska stabla su konstruisana Neighbor-joining metodom i distance su izračunate Kimura dvo-parametarskim modelom. Na stablu su izolati iz maja i jula prikazani simbolima ■ i ●.

Primetna je dominacija predstavnika klase γ -Proteobacteria u kultivabilnoj zajednici jer je najveći broj izolata pripadao rodu *Pseudomonas* (42%). Takođe, značajan deo izolovanih bakterija su bili predstavnici rodova *Curtobacterium* (13%) i *Pantoea* (8%) (Prilog 3). Pored njih izolovane su vrste iz rodova: *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Clavibacter*, *Erwinia*, *Frigoribacterium*, *Frondehabitans*, *Labedella*, *Micrococcus*, *Oerskovia*, *Pseudarthrobacter*, *Rahnella*, *Sanguibacter*, *Sphingomonas*, *Staphylococcus* i *Therribacillus*, koje su bili zastupljene sa manje od 5%. Najčešće su bile izolovane *Pseudomonas graminis* (22%) i vrste patogena iz filogenetske grupe *P. syringae* (10%) (Prilog 4). Distribucija vrsta u odnosu na sorte šljive i vreme uzorkovanja su prikazani Venovim dijagramima (Slika 15). Sa svih sorti u maju je izolovana *Pantoea agglomerans*, dok je u julu *P. graminis* bila prisutna u svim uzorcima. Uočava se da je u maju detektovan veći broj vrsta u odnosu na juli i da je tada većina vrsta bila jedinstvena za određenu sortu. U julu je primetan manji broj izolovanih vrsta i veći udeo njih je izolovan sa više sorti nego što je to bio slučaj u maju.



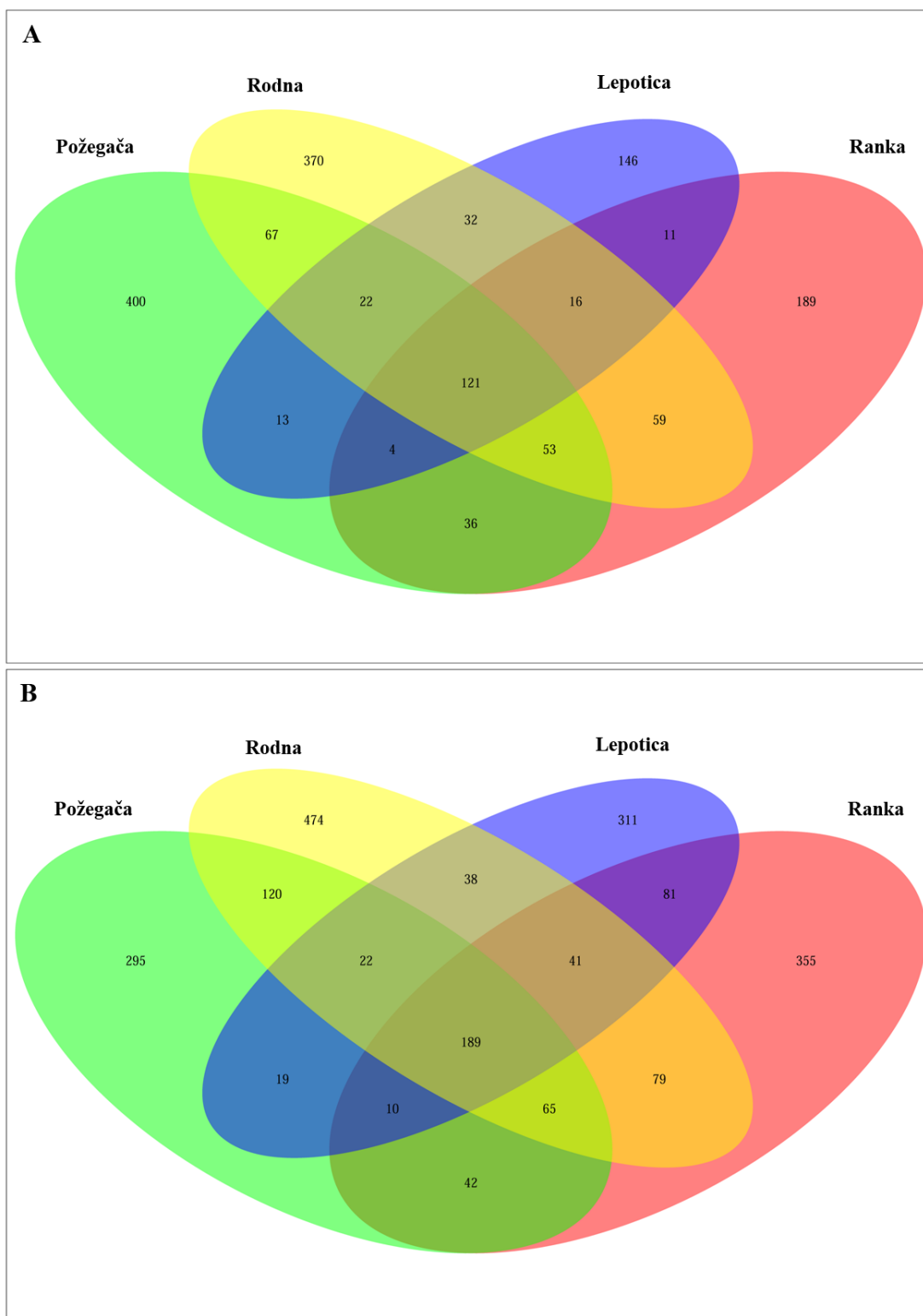
Slika 15. Venov dijagram distribucije bakterijskih izolata četiri sorte šljive u dve fenološke faze: maj (A); juli (B). Prikazana je distribucija vrsta rodova *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Clavibacter*, *Curtobacterium*, *Erwinia*, *Frigoribacterium*, *Fronidihabitans*, *Micrococcus*, *Oerskovia*, *Pantoea*, *Pseudarthrobacter*, *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Sanguibacter*, *Sphingomonas*, *Staphylococcus* i *Therribacillus*.

4.1.2. Diverzitet mikrobioma

4.1.2.1. Metagenomski podaci i diverzitet gljiva

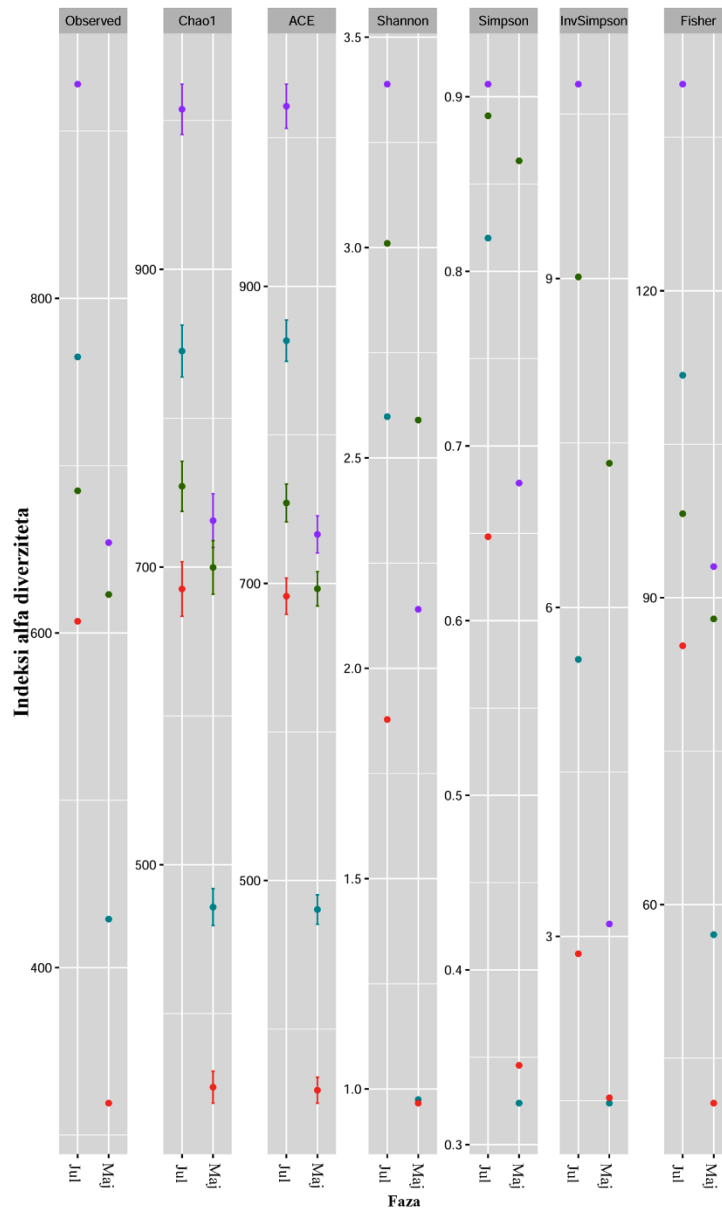
Zajednice gljiva filofere četiri sorte šljive analizirane su u dve fenološke faze razvoja ploda, u maju i julu mesecu. Za identifikaciju gljiva umnožavan je i sekvenciran ITS2 region. Nakon sekvenciranja na Illumina platformi, prosečna dužina sekvenci je iznosila 525 bp. Trimovanjem i filtriranjem podataka, zadržano je 1 144 352 sekvenci sa uparenim krajevima iz DNK uzoraka uzetih u maju i 1 066 790 sekvenci iz uzoraka uzetih u julu (Prilog 5).

Nakon grupisanja OTU-a i uklanjanja himera i sekvenci hloroplasta, ukupan broj OTU-a u maju i julu je iznosio 2 310 i 3 363. Na Venovom dijagramu (Slika 16) se uočava da su u maju sorte delile 121 detektovani OTU, a u julu 189. Uzimajući u obzir broj jedinstvenih OTU-a, postojale su razlike između fenoloških faza i sorti šljive. U julu se njihov broj znatno povećao kod sorti Rodna, Lepotica i Ranka, dok je kod Požegače bilo obrnuto. Ukupan broj uočenih OTU-a detektovanih kod Lepotice, Rodne, Požegače i Ranke bio je 365, 740, 716 i 489 u maju, i 711, 1 028, 762 i 862 u julu.



Slika 16. Venov dijagram distribucije OTU-a za uzorke gljiva između četiri sorte šljive u dve fenološke faze: maj (A); juli (B).

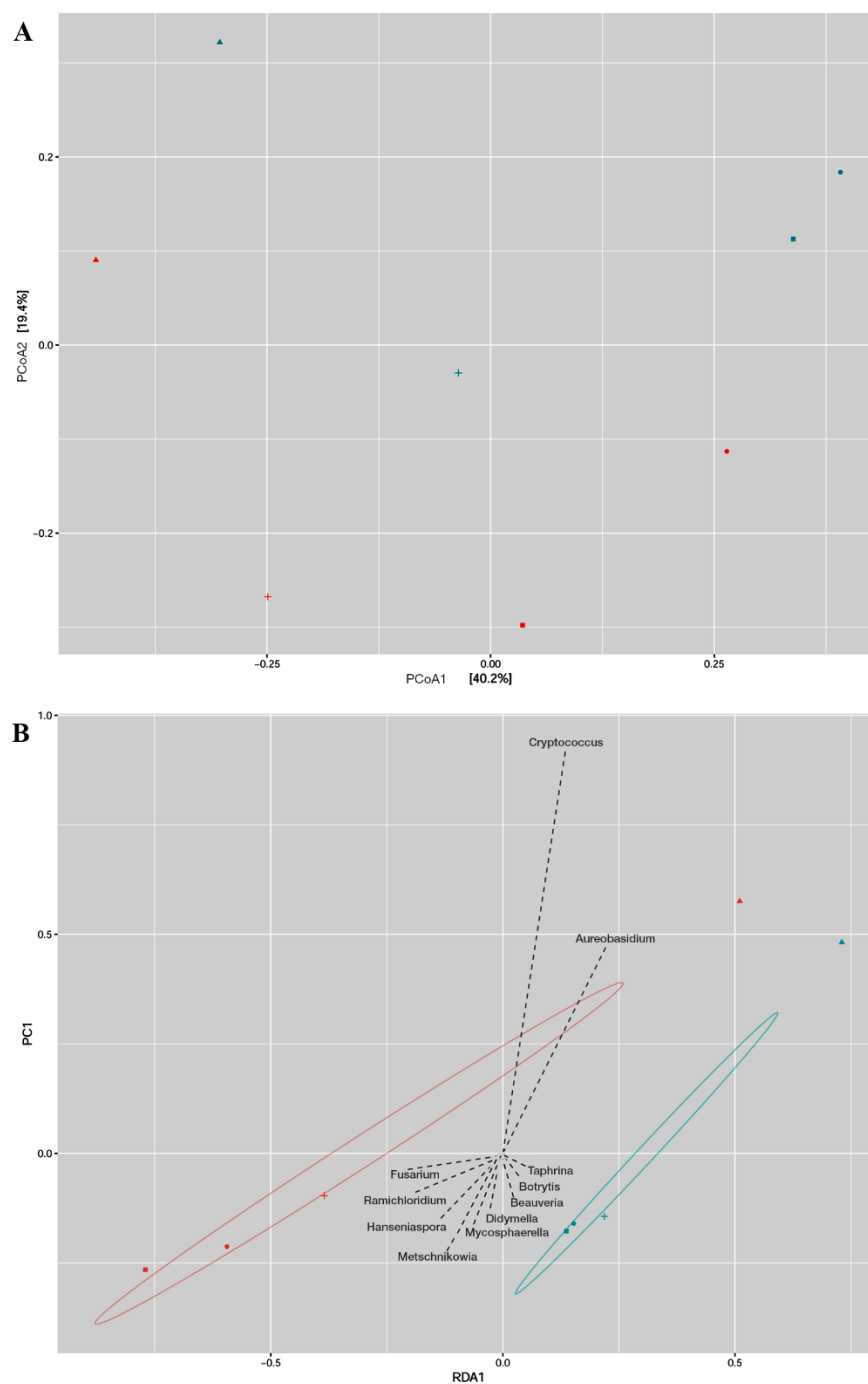
Na Slici 17. su za svaki uzorak prikazani indeksi alfa diverziteta na nivou roda. Najveći diverzitet u maju je zabeležen na Požegači, a zatim je on opadao po redosledu sorti Rodna, Ranka i Lepotica. Kod svih sorti se za uzorke u maju uočavaju niži diverzitet i bogatstvo rodova u odnosu na juli, kada su njihove vrednosti bile značajno veće. U julu su vrednosti indeksa diverziteta bile najveće kod sorte Rodna dok su najmanje vrednosti detektovane za Lepoticu. Kod Požegače se indeksi diverziteta za dve fenološke faze nisu značajno razlikovali. Indeksi Chao 1 i ACE su u julu zabeležili veće bogatstvo rodova u odnosu na maj mesec. Najveće vrednosti su detektovane za Rodnu, a najmanje za Lepoticu u obe fenološke faze. Rezultati procene bogatstva rodova su bili u pozitivnoj korelaciji sa indeksima diverziteta.



Slika 17. Alfa diverzitet zajednica gljiva 4 sorte šljive (Lepotica ●, Rodna ●, Požegača ● i Ranka ●) u dve fenološke faze. Prikazani rezultati se odnose na raznovrsnost rodova gljiva.

Beta diverzitet zajednica gljiva procenjivan je na osnovu PCoA i RDA analize. U obe fenološke faze, sorte Ranka i Lepotica su bile blisko grupisane i odvojene od drugih uzoraka na PCoA grafiku (Slika 18A). Na osnovu PCoA1 ose koja predstavlja 40,2% varijabilnosti u uzorcima, Rodna i Požegača su se međusobno grupisale u obe fenološke faze. RDA analiza je sugerisala da se uzorci svih sorti, osim Požegače, razdvajaju prema

fenološkim fazama na osnovu RDA1 ose. Uzorci Požegače su grupisani prema obe ose sa dominantnim kvascima iz rodu *Cryptococcus* i *Aureobasidium* (Slika 18B).



Slika 18. Analiza beta diverziteta zajednice gljiva tokom dve fenološke faze 4 sorte šljive (Leptotica ●, Rodna +, Požegača ▲ i Ranka ■): PCoA analiza (A); RDA analiza (B). Plavi i crveni simboli predstavljaju uzorke iz maja i jula.

4.1.2.2. Sastav fungalnih zajednica

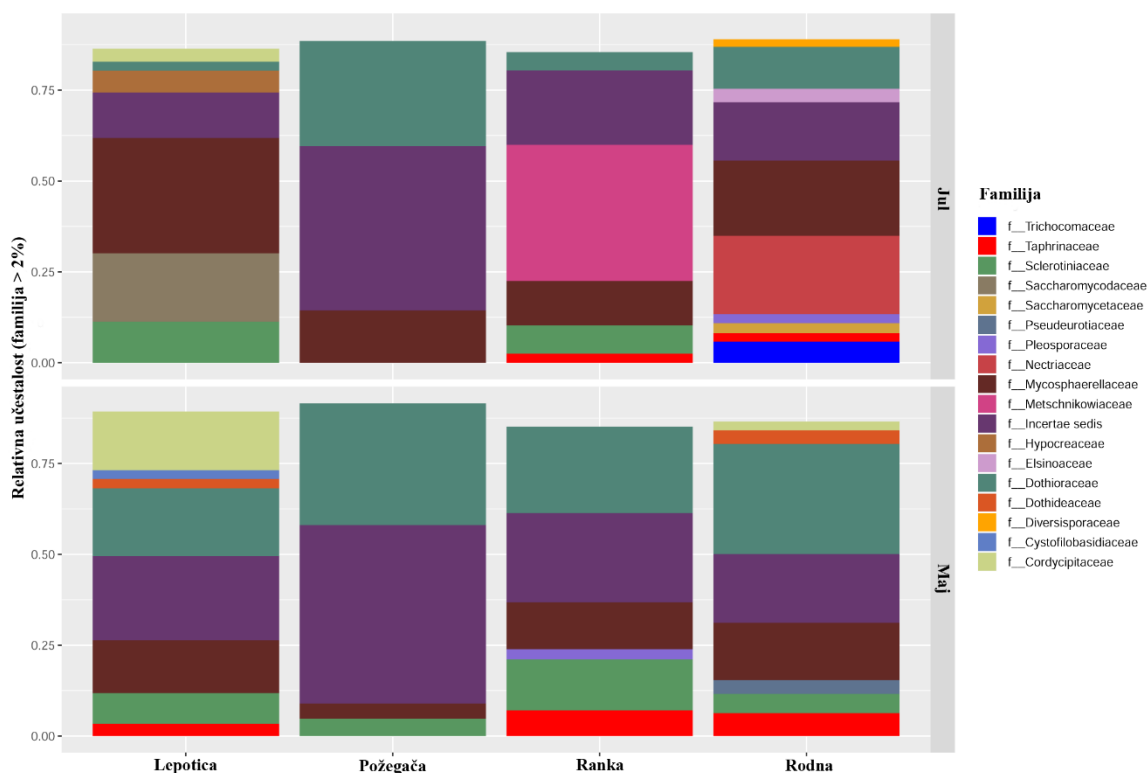
Na osnovu taksonomske anotacije reprezentativnih OTU sekvenci analiziran je sastav mikrobioma filofsere šljive. Određene su RA identifikovanih razdela, familija i rodova. Analiza sekvenci ITS2 regiona je utvrdila da su predstavnici razdela Ascomycota imali najveću zastupljenost u svim uzorcima sa RA između 46% na Požegači u maju i 89% na Lepotici u julu (Prilog 6). Drugi po zastupljenosti su bili predstavnici razdela Basidiomycota sa znatno manjim RA vrednostima, od 10 do 23%. Izuzetak je Požegača na kojoj su predstavnici razdela Basidiomycota bili zastupljeni sa 53 i 44% u maju i julu, redom. Pored ova dva razdela, detektovano je još samo prisustvo predstavnika razdela Glomeromycota preko 2% na sorti Rodna u julu (Slika 19).



Slika 19. Relativna zastupljenost predstavnika razdela gljiva četiri sorte šljive u dve fenološke faze. Prikazani su razdeli čiji su predstavnici imali više od 2% učestalosti.

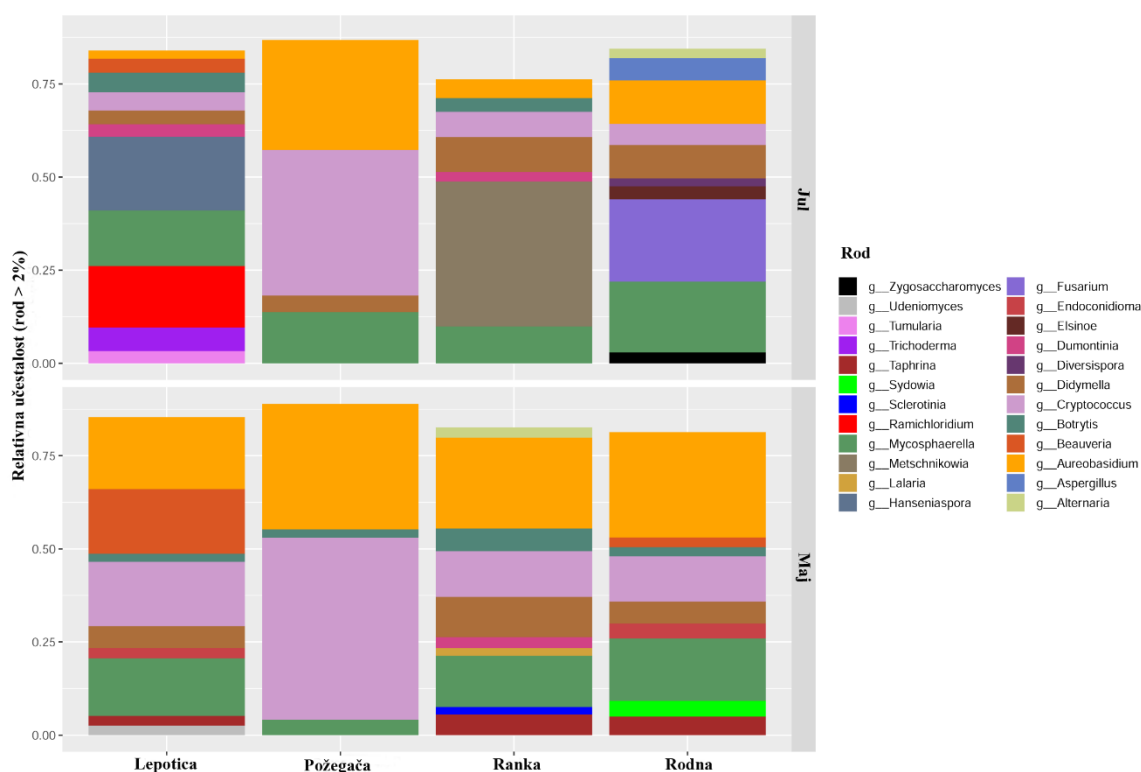
Iz svih uzoraka determinisani su predstavnici ukupno 94 familije koji su bili zastupljeni u različitom procentu (Prilog 6). Na Slici 20. su prikazane familije čiji su

predstavnicima imali RA veću od 2%. Najzastupljenije su vrste porodice Mycosphaerellaceae sa RA između 4% (Požegača) i 32% (Lepotica), Dothioraceae od 2% (Lepotica) do 33% (Požegača), Sclerotiniaceae od 0,2% (Požegača) do 15% (Ranka) i Taphrinaceae od 0,5% (Lepotica) do 7% (Ranka). Sve navedene porodice pripadaju razdelu Ascomycota. Visok procenat neidentifikovanih "Incertae Sedis" taksona za uzorke sa sorte Požegača je detektovan unutar razdela Basidiomycota i reda Tremellales sa RA u maju 49% i u julu 41%. Za druge sorte relativna zastupljenost nedefinisanih taksona u okviru ovog reda je varirala od 6 do 18%. Tokom kasnije fenološke faze je uočeno za predstavnike manjeg broja porodica da su imali visoke RA vrednosti samo na određenoj sorti. Predstavnicima porodica Saccharomycodaceae (19%) i Hypocreaceae (6%) su u visokom procentu bili zastupljeni na Lepotici; Nectriaceae (21%) i Trichocomaceae (6%) na Rodnoj; i Metschnikowiaceae (38%) na sorti Ranka.



Slika 20. Relativna zastupljenost predstavnika porodica gljiva četiri sorte šljive u dve fenološke faze. Prikazane su porodice sa predstavnicima koji su imali više od 2% učestalosti.

Taksonomska anotacija je pokazala prisustvo vrsta iz 217 rodova (Prilog 6) među kojima su predstavnici 24 roda bili zastupljeni sa više od 2% (Slika 21). U maju je na svim sortama zabeležena dominantna zastupljenost kvasaca iz rodova *Aureobasidium* (razdeo Ascomycota) sa 19 do 34% i *Cryptococcus* (razdeo Basidiomycota) sa RA vrednostima između 5 i 49%. Sastav fungálnih zajednica se u julu razlikovao prema dominantnosti vrsta određenih rodova: na sorti Ranka je to bio rod *Metschnikowia* sa 39%, na Lepotici *Hanseniaspora* sa 20%, a na Rodnoj *Fusarium* sa 22%. Požegača se izdvaja po dominaciji vrsta roda *Cryptococcus* sa RA vrednostima od 49% i 39%, u maju i julu.

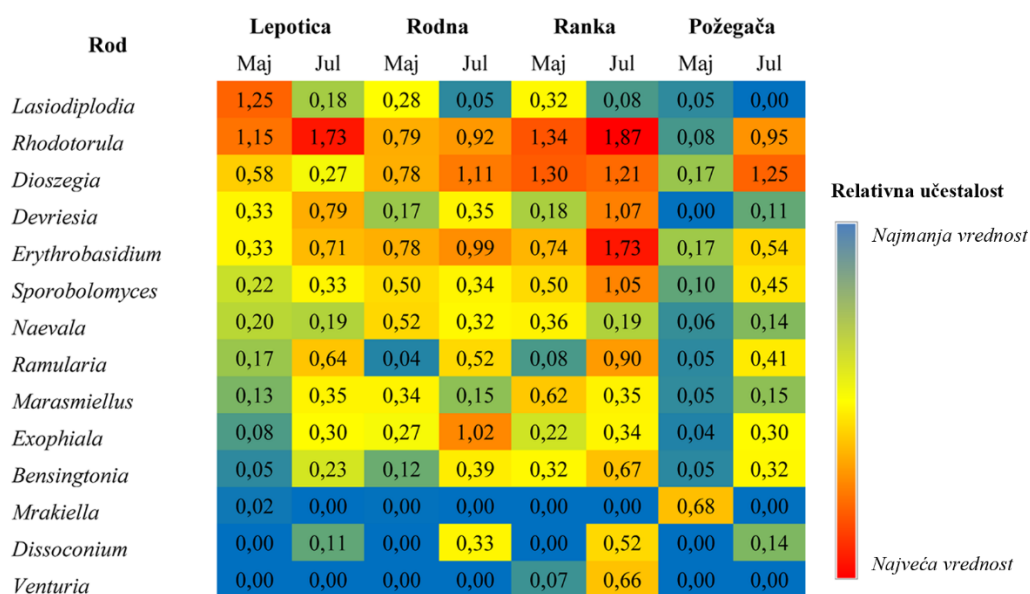


Slika 21. Relativna zastupljenost predstavnika rodova gljiva četiri sorte šljive u dve fenološke faze. Prikazani su rodovi sa predstavnicima koji su imali više od 2% učestalosti.

Pored navedenih rodova, na svim sortama detektovano je i prisustvo predstavnika roda *Mycosphaerella*, bez obzira na fenološku fazu. Takođe, ovaj rod je bio jedan od tri najučestalija roda u svakom analiziranom uzorku, sa RA vrednostima njegovih

predstavnik između 4 i 17%. U maju su na sorti Ranka u većem procentu detektovani predstavnici rodova sa značajnim patogenima šljive: *Didymella* (11%), *Botrytis* (6%), *Taphrina* (6%), *Alternaria* (3%) i *Sclerotinia* (2%). Procenat vrsta ovih rodova je značajno opao u julu mesecu.

Znatan je bio i broj rodova sa predstavnicima zastupljenim između 0,5 i 2% (Slika 22). Na sorti Ranka su to bili: *Rhodotorula*, *Erythrobasidium*, *Sporobolomyces*, *Ramularia*, *Bensingtonia* i *Venturia*, a na Rodnoj *Exophiala*. Predstavnici rodova sa najvažnijim patogenima šljiva, kao što su *Monilinia*, *Cladosporium* i *Penicillium*, detektovani su u procentima ispod 0,1%.



Slika 22. Relativna zastupljenost predstavnika fungalnih rodova između 0,5 i 2% četiri sorte šljive u dve fenološke faze.

Na Slici 23. prikazana je relativna učestalost vrsta gljiva u obrađivanim uzorcima. Njihova zastupljenost je bila u pozitivnoj korelaciji sa procentualnim udelom odgovarajućih rodova u fungalnoj zajednici. Unutar razdela Ascomycota, *Aureobasidium pullulans*, *Mycosphaerella tumulosa* i *Didymella phacae* su bile najzastupljenije na svim sortama. Entomopatogene gljive *Beauveria felina* i *Endoconidioma populi* su uočene u maju na sorti Lepotica. Na istoj sorti je u julu zabeleženo i prisustvo *Ramichloridium ducassei* i

Trichoderma alni kao i kvasca *Hanseniaspora uvarum*. *Fusarium fujikuroi* i *Aspergillus flavus* su u najvećem procentu detektovane na sorti Rodna. Unutar razdela Basidiomycota najveća raznovrsnost je zabeležena u okviru roda *Cryptococcus* sa 14 vrsta (Prilog 6). Među njima najčešće su bile vrste *C. victoriae*, *C. wieringae* i *C. carnescens*, naročito na sorti Požegača, u obe fenološke faze. *Diversis poracelata* i *Funneliformis mosseae* su bile predstavnici razdela *Glomeromycota*.

Vrsta	Lepotica		Rodna		Ranka		Požegača	
	Maj	Jul	Maj	Jul	Maj	Jul	Maj	Jul
Ascomycota								
<i>Beauveria felina</i>	16,91	3,22	2,34	0,74	0,85	0,55	0,63	0,39
<i>Aureobasidium pullulans</i>	15,75	1,86	20,96	7,87	19,51	3,22	29,27	21,66
<i>Mycosphaerella tumulosa</i>	14,25	11,79	13,03	13,09	10,87	6,49	3,65	10,37
<i>Didymella phacae</i>	5,32	3,30	4,69	6,91	9,21	7,05	0,87	3,67
<i>Endoconidioma populi</i>	2,45	0,90	2,85	0,49	0,49	0,21	0,69	1,14
<i>Metschnikowia</i> sp.	2,29	0,01	0,02	0,00	0,18	32,62	0,01	0,00
<i>Botrytis caroliniana</i>	2,17	4,55	1,96	0,19	5,45	2,84	2,19	0,07
<i>Taphrina pruni</i>	2,00	0,29	2,48	0,62	3,30	0,84	0,70	0,56
<i>Lasiodiplodia macrospora</i>	1,51	0,25	0,17	0,03	0,22	0,07	0,04	0,01
<i>Dumontinia tuberosa</i>	0,98	2,82	1,14	0,13	2,65	1,97	1,47	0,04
<i>Sydowia polyspora</i>	0,85	0,38	3,65	0,27	1,14	0,14	0,05	0,03
<i>Lalaria</i> sp.	0,73	0,10	1,26	0,33	1,59	0,61	0,32	0,37
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	0,60	1,47	0,70	0,10	1,78	1,01	0,73	0,02
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	0,00	19,74	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Ramichloridium ducassei</i>	0,00	14,38	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Trichoderma alni</i>	0,00	5,42	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Tumularia</i> sp.	0,18	2,69	0,01	0,05	0,02	0,06	0,04	0,01
<i>Alternaria alternata</i>	0,21	1,15	0,77	1,16	1,37	0,39	0,19	0,65
<i>Devriesia pseudoamericana</i>	0,23	0,77	0,14	0,32	0,21	0,85	0,00	0,09
<i>Ramularia collo-cygni</i>	0,11	0,52	0,03	0,39	0,11	0,53	0,03	0,32
<i>Zygosaccharomyces microellipsoides</i>	0,28	0,48	1,41	2,55	1,00	0,39	0,09	0,02
<i>Elsinoe</i> sp.	0,24	0,23	1,29	2,98	0,80	1,54	0,25	0,90
<i>Taphrina communis</i>	0,17	0,08	0,58	0,42	0,47	0,20	0,01	0,03
<i>Alternaria infectoria</i>	0,29	0,40	0,52	0,69	0,81	0,29	0,15	0,32
<i>Fusarium fujikuroi</i>	0,00	0,00	0,00	17,73	0,00	0,01	0,00	0,00
<i>Aspergillus flavus</i>	0,00	0,02	0,01	4,40	0,01	0,19	0,00	0,00
<i>Exophiala</i> sp.	0,15	0,25	0,27	0,71	0,16	0,28	0,05	0,27
<i>Venturia cerasi</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,58	0,00	0,00
Basidiomycota								
<i>Cryptococcus wieringae</i>	5,52	0,58	2,46	1,03	5,03	0,97	8,94	24,87
<i>Cryptococcus</i> sp.	4,20	2,19	2,27	1,89	2,32	2,37	3,66	2,10
<i>Cryptococcus victoriae</i>	1,91	0,36	2,81	0,20	0,67	0,68	21,90	3,36
<i>Cryptococcus carnescens</i>	1,89	0,04	1,28	0,11	1,48	0,16	1,61	0,49
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1,14	0,28	0,74	0,38	1,34	0,33	10,25	1,61
<i>Cryptococcus magnus</i>	1,05	0,43	0,17	0,08	0,18	0,12	0,07	0,04
<i>Cryptococcus chernovii</i>	0,91	1,14	0,58	0,56	1,21	0,91	0,06	0,53
<i>Udeniomyces pannonicus</i>	0,68	0,04	0,49	0,10	0,32	0,18	0,46	0,80
<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	0,34	0,45	0,67	0,64	0,88	1,11	0,13	0,47
<i>Erythrobasidium hasegawianum</i>	0,24	0,08	0,24	0,57	0,42	0,19	0,65	2,08
<i>Marasmiellus stenophyllus</i>	0,13	0,23	0,33	0,11	0,64	0,22	0,06	0,10
<i>Dioszegia hungarica</i>	0,45	0,13	0,37	0,36	0,63	0,49	0,12	0,74
<i>Rhodotorula</i> sp.	0,22	0,43	0,17	0,11	0,23	0,55	0,04	0,23
<i>Mrakiella aquatica</i>	0,01	0,00	0,01	0,00	0,03	0,00	0,63	0,00
Glomeromycota								
<i>Diversispora celata</i>	0,18	0,45	0,82	1,89	0,79	0,37	0,05	0,02

Slika 23. Relativna zastupljenost fungálnih vrsta četiri sorte šljive u dve fenološke faze.

4.1.2.3. Kultivabilna fungalna zajednica

Na osnovu makroskopskih odlika kolonija i mikroskopskih karakteristika reproduktivnih struktura filamentoznih gljiva izvršena je identifikacija ukupno 38 vrsta iz 29 rodova (Tabela 5). Distribucija vrsti po sortama i fenološkim fazama je prikazana u Prilogu 7.

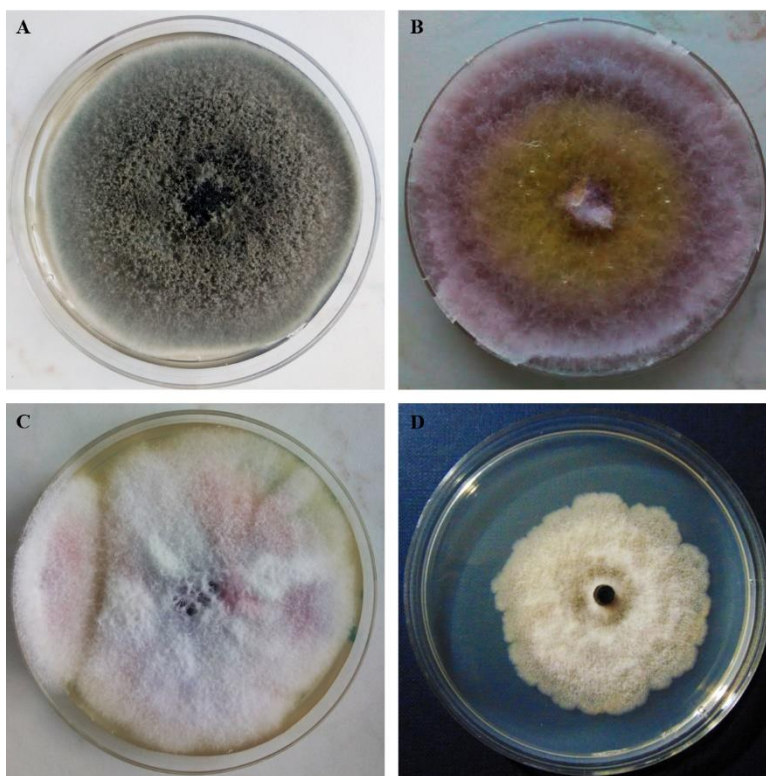
Tabela 5. Detektovani predstavnici rodova i vrste gljiva

<i>Acremonium</i> sp.	<i>Drechslera tetramera</i>	<i>Fusarium tricinctum</i>	<i>Phomopsis</i> sp.
<i>Alternaria</i> sp.	<i>Epicoccum</i> sp.	<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>Podosphaera</i> sp.
<i>Alternaria alternata</i>	<i>Epicoccum purpurascens</i>	<i>Ganoderma lucidum</i>	<i>Polystigma rubrum</i>
<i>Alternaria tenuissima</i>	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Gliocladium roseum</i>	<i>Rhizoctonia</i> sp.
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Fusarium avenaceum</i>	<i>Macrophomina phaseolina</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Fusarium culmorum</i>	<i>Macrophomina</i> sp.	<i>Rhizopus</i> sp.
<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Fusarium equiseti</i>	<i>Monilinia</i> sp.	<i>Sclerotinia</i> sp.
<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Monilinia fructicola</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Fusarium incarnatum</i>	<i>Monilinia fructigena</i>	<i>Stigmata carpophila</i>
<i>Botrytis</i> sp.	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Monilinia laxa</i>	<i>Trichoderma</i> sp.
<i>Chaetomium</i> sp.	<i>Fusarium poae</i>	<i>Nigrospora</i> sp.	<i>Trichoderma viridae</i>
<i>Cladophialophora</i> sp.	<i>Fusarium proliferatum</i>	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Trichothecium</i> sp.
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Fusarium roseum</i>	<i>Penicillium corylophilum</i>	<i>Trichothecium roseum</i>
<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Fusarium solani</i>	<i>Pestalotia</i> sp.	<i>Ulocladium</i> sp.
<i>Curvularia</i> sp.	<i>Fusarium sporotrichoides</i>	<i>Phoma</i> sp.	
<i>Curvularia lunata</i>	<i>Fusarium subglutinans</i>	<i>Phoma betae</i>	

Najveća raznovrsnost je zabeležena u okviru roda *Fusarium* i utvrđeno je da filosferu šljive čini 12 vrsta ovog roda. *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *F. sporotrichoides* i *F. subglutinans* su izolovane sa svih sorti iz obe fenološke faze. Takođe sa svih sorti, bez obzira na fenološku fazu, izolovane su i vrste rodova: *Aspergillus* (*A. niger* i *A. flavus*), *Alternaria* (*A. alternata*), *Monilinia*, *Penicillium*, *Rhizopus* i *Trichothecium* sa vrstom *T.*

roseum. Vrlo često su konstatovani i predstavnici rodova *Nigrospora* (izuzetak je na sorti Rodna) i *Sclerotinia* (izuzetak je na sorti Požegača). *Stigmina carpophila* i *Polystigma rubrum* su detektovane samo u maju na sortama Rodna i Ranka. Na Slici 24. su prikazane monosporične kulture fungalnih izolata poreklom sa lista i ploda šljive.

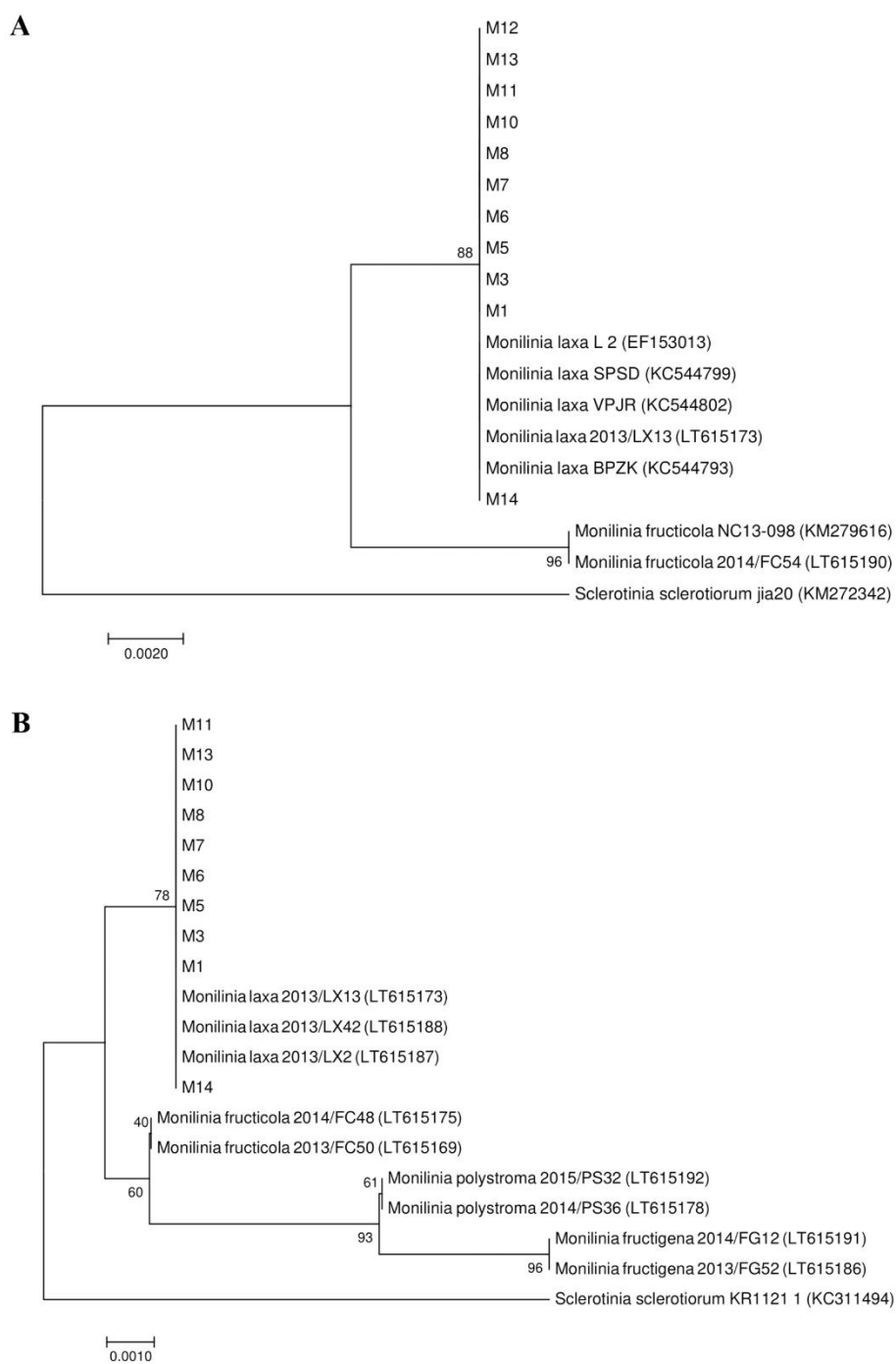
Pored filamentoznih gljiva, izolovano je pet kvasaca. Identifikacija je izvršena umnožavanjem i sekvenciranjem ITS1 regiona DNK i ustanovljeno je da se radi o vrstama: *Aureobasidium pullulans* na sortama Rodna, Ranka i Požegača; *Sporobolomyces roseus* na Rodnoj i *Metschnikowia pulcherrima* na Ranki.



Slika 24. Monosporične kulture: *Alternaria alternata* (A); *Fusarium* sp. (B); *Sclerotinia* sp. (C); *Monilinia* sp. (D) (7. dan, PDA).

4.1.2.4. Filogenetski status izolata *Monilinia* spp.

Izolacijom gljiva sa 4 sorte šljive je formirana kolekcija kultura iz koje su za dalje istraživanje odabrani izolati sa morfološkim karakteristikama roda *Monilinia*. Jedanaest izolata je presejano i inkubirano 7 dana na 25 °C u mraku nakon čega su svi formirali koloniju bele do svetlo smeđe boje, rozetastog oblika, režnjevutih ivica i sa odsustvom sporulacije. S obzirom na odsustvo reproduktivnih struktura neophodnih za preciznu identifikaciju, za dalju karakterizaciju izolata su umnoženi ITS1 i ITS2 regioni DNK i dobijene su sekvence dužina 550 i 900bp. Molekularna identifikacija 11 odabranih izolata je izvršena sekvenciranjem umnoženih ITS1 i ITS2 regiona. Prema analiziranim sekvencama su svi izolati bili najsirodniji vrsti *Monilinia laxa*. Za ITS1 region, umnožene sekvence su imale 100% nukleotidne sličnosti sa izolatima *M. laxa* u bazi GenBank. U slučaju regiona ITS2 je uočen samo jedan nukleotid razlike u odnosu na sekvence iz baze, za sve ispitivane sekvence. Sekvence oba umnožena regiona su pokazale da su izolati iz ove studije međusobno identični. Filogenetsko stablo je rekonstruisano korišćenjem sekvenci *M. laxa* izolata i ITS sekvenci iz GenBank baze podataka, sa sekvencom *S. sclerotiorum* kao nesrodnom grupom. Iz filogenetskog stabla dobijenog rekonstrukcijom sekvenci ITS2 regiona je izostavljen izolat M12 zbog slabog kvaliteta sekvence. Na filogenetskim stablima se u oba slučaja sekvence grupišu u jedan klaster sa izolatima *M. laxa* iz baze podataka (Slika 25).

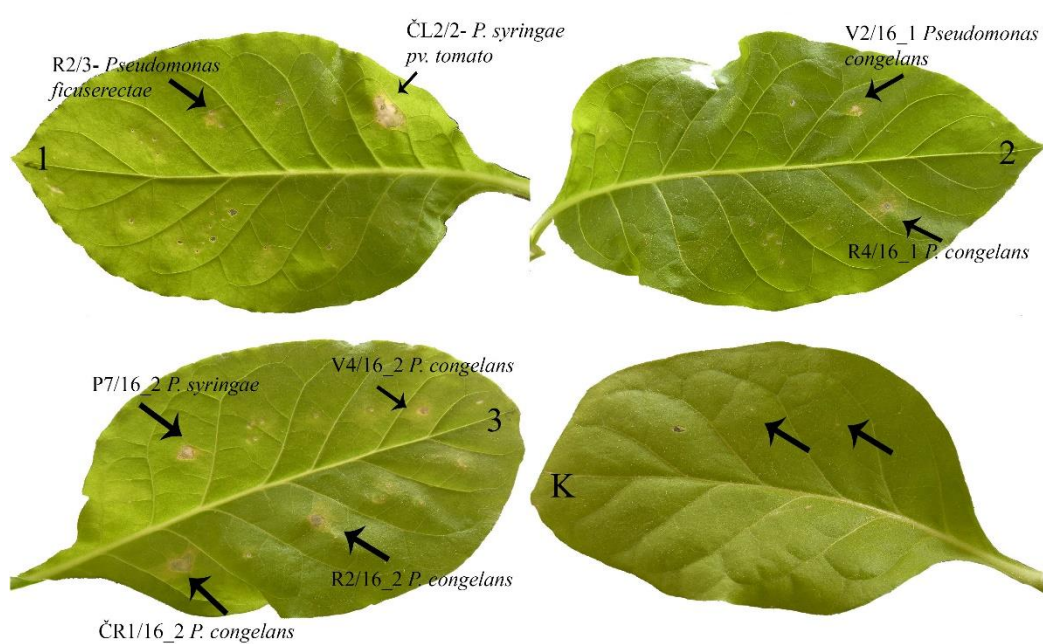


Slika 25. Filogenetski odnosi izolata *Monilinia laxa* na osnovu umnoženih sekvenci: ITS1 regiona (A); ITS2 regiona DNK (B). Filogenetska stabla su konstruisana Neighbor-joining metodom i distance su izračunate Kimura dvo-parametarskim modelom. Kao „out group” je korišćena sekvenca referentnog soja *Sclerotinia sclerotiorum*.

4.2. Patogenost izolata filsofere šljive

4.2.1. Hipersenzitivnost duvana na izolate *Pseudomonas* spp.

Iz bakterijske kolekcije kultura je izdvojeno 22 izolata *Pseudomonas* spp. čija je potencijalna patogenost ispitivana u testu hipersenzitivnosti duvana. Najintenzivnije pege su formirali izolati *P. syringae* ČL2/2 i P7/16_2 i *P. congelans* ČR1/16_2 (Slika 26).



Slika 26. Nekroze lista duvana indukovane patogenim izolatima *Pseudomonas* spp. detektovane nakon 48 časova. Obeleženi izolati su izazvali najveće nekroze. (foto I. Dimkić)

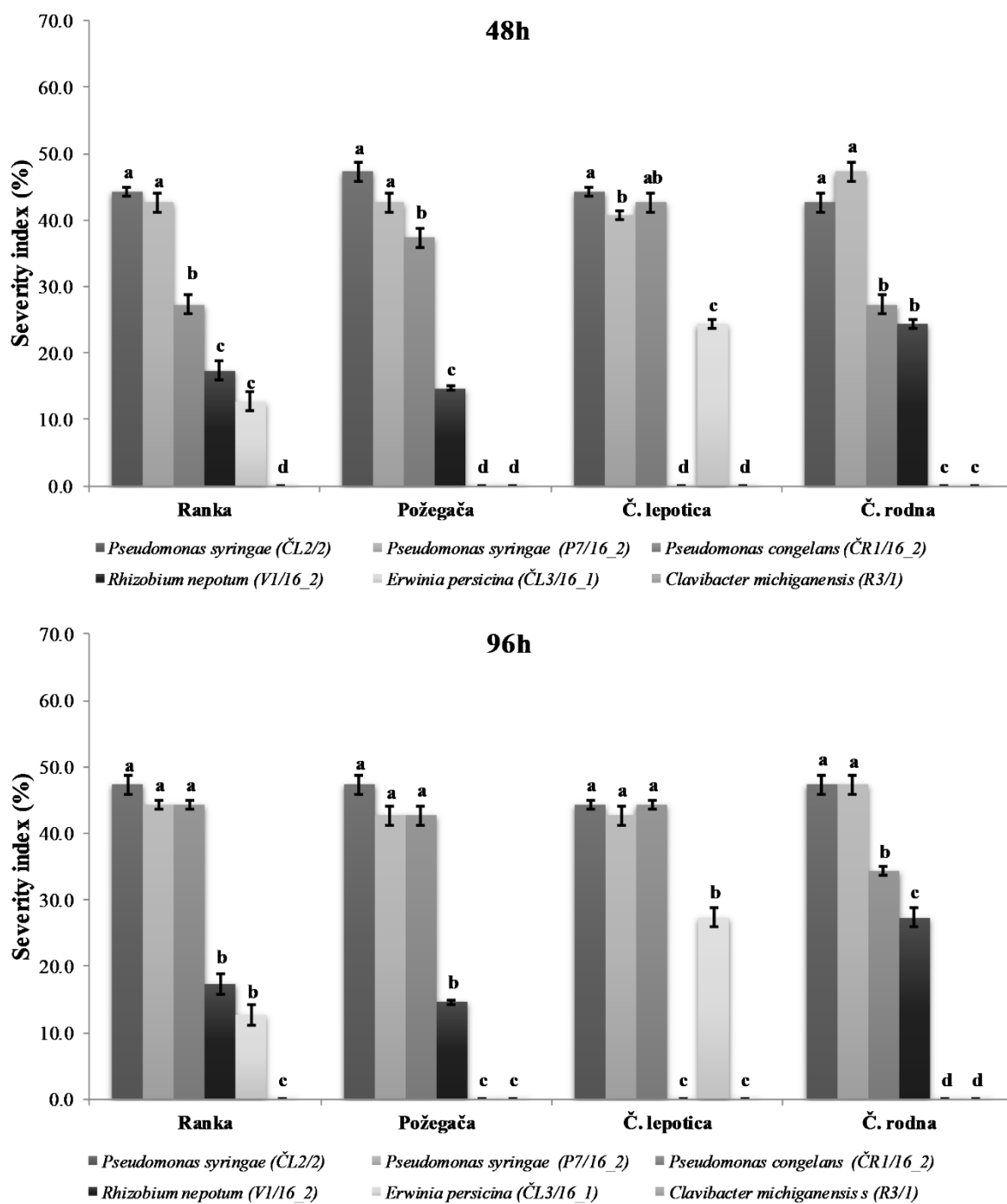
4.2.2. Patogenost bakterijskih izolata na listu šljive

Na osnovu rezultata testa hipersenzitivnosti na listu duvana odabrani su izolati *P. syringae* ČL2/2 i P7/16_2 i *P. congelans* (ČR1/16_2), za testiranje patogenosti na ubranim listovima šljive. U test su takođe uključeni i izolati: *E. persicina* (ČL3/16_1), *C. michiganensis* (R3/1) i *R. nepotum* (V1/16_2). Izolat *E. persicina* (ČL3/16_1) je doveo do razvoja simptoma na listovima Lepotice i na sorti Ranka, dok su na druge dve sorte simptomi izostali. Na listu Lepotice, sa koje izolat vodi poreklo, indeks intenziteta virulencije (SI) je nakon 96 časova inkubacije iznosio 27%. Na Ranki je SI bio znatno manji i iznosio je 13% (Slika 27).



Slika 27. Patogenost izolata *Pseudomonas syringae* ČL2/2 na listovima sorti: Ranka (A); Lepotica (B); Požegača (C); Rodna (D). Prikazane su nekrotične promene nakon 96 časova inkubacije (foto T. Janakiev).

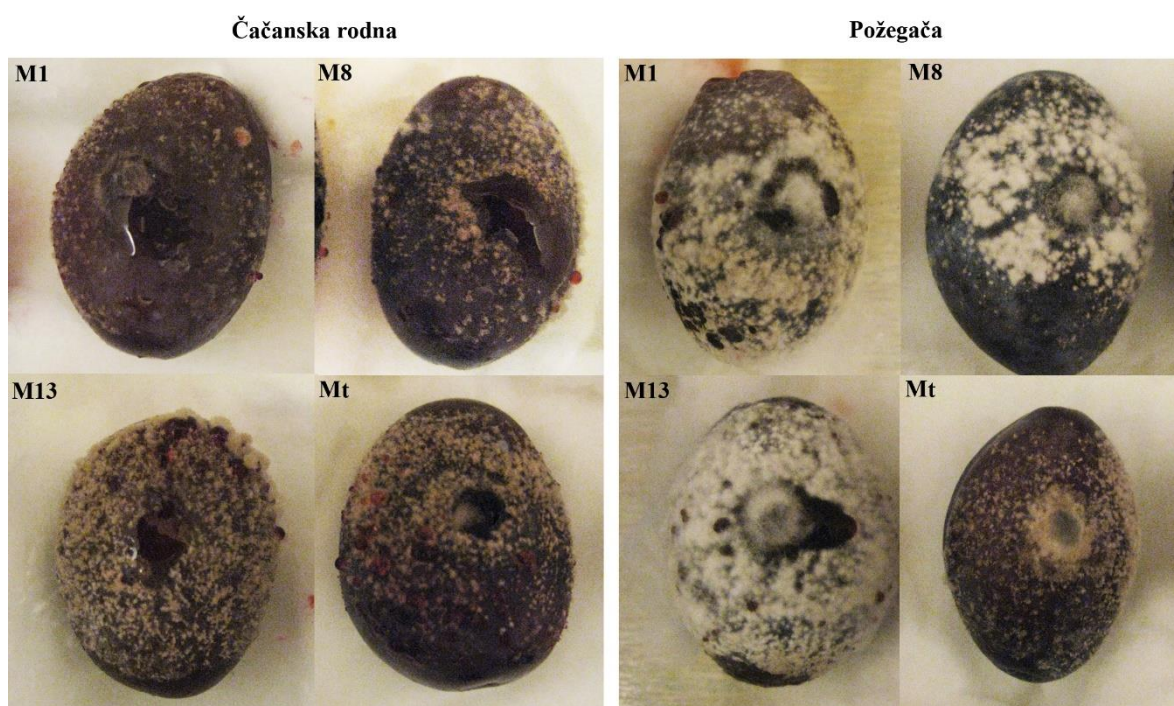
Izolat *R. nepotum* V1/16_2, poreklom sa kruške, je ispoljio virulenciju na listovima svih sorti sa izuzetkom Lepotice. Najveću SI vrednost od 27% je imao na sorti Rodna. Izolat *C. michiganensis* (R3/1) nije izazvao vidljive simptome na površini listova ni jedne od ispitivanih sorti. Najveće vrednosti intenziteta patogenosti detektovane su za izolate roda *Pseudomonas*, na listovima svih sorti šljive. Izolati *P. syringae* (ČL2/2 i P7/16_2) su formirali intenzivne simptome već nakon 48 časova. Vrednosti SI indeksa su bile u opsegu 41 – 47%. Intenzitet patogenosti drugih testiranih izolata je statistički značajno manji što je uočljivo na svim sortama. Nakon 96 časova inkubacije simptomi koje izazivaju *Pseudomonas* izolati se međusobno statistički značajno nisu razlikovali, sem na listovima sorte Rodna (Slika 28).



Slika 28. Indeks intenziteta virulencije šest bakterijskih izolata na četiri sorte šljive nakon 48 i 96 časova. Vrednosti označene istim slovom nisu statistički značajne ($P < 0,05$), prema Tukey's HSD testu.

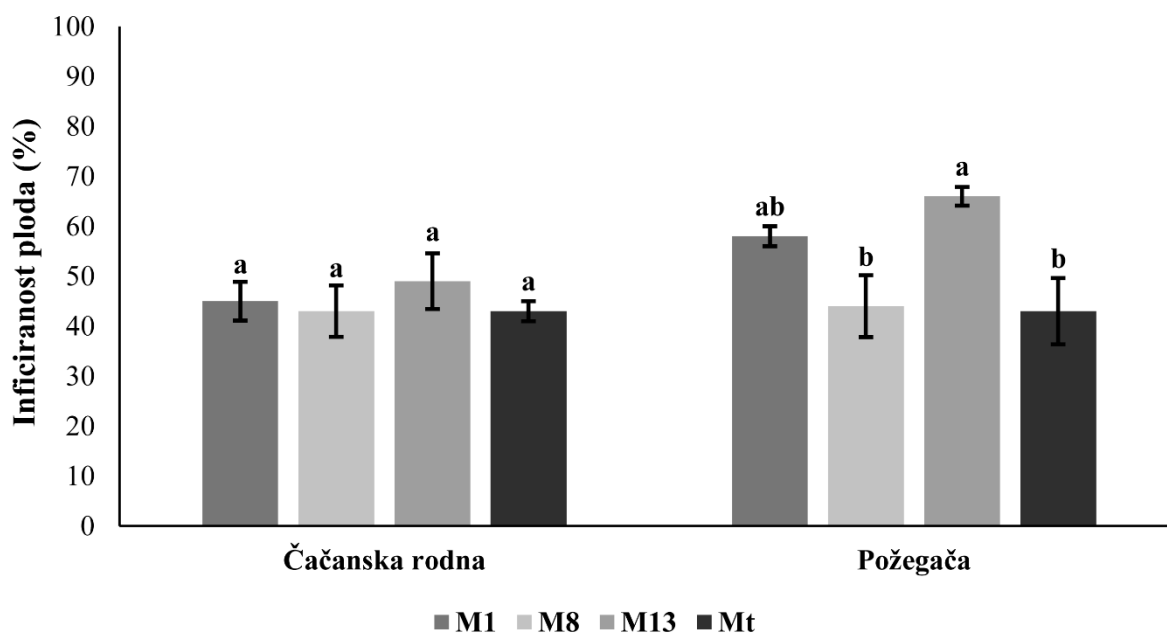
4.2.3. Patogenost izolata *Monilinia laxa* na plodu šljive

Patogenost je testirana inokulacijom ploda sorti Čačanska rodna i Požegača micelijom tri izolata *M. laxa*. Na kontrolnim plodovima nije uočena pojava simptoma mrke truleži što ukazuje na to da nije postojala latentna infekcija. Na svim inokulisanim plodovima je došlo do razvoja tipičnih simptoma mrke truleži bez obzira na izolat *M. laxa* ili na sortu šljive (Slika 29).



Slika 29. Simptomi mrke truleži izazvane izolatima *Monilinia laxa* na plodovima šljiva sorti Čačanska rodna i Požegača. Testirani su izolati M1, M8, M13 i izolat *Monilinia laxa* (Mt) poreklom sa trešnje (foto T. Janakiev).

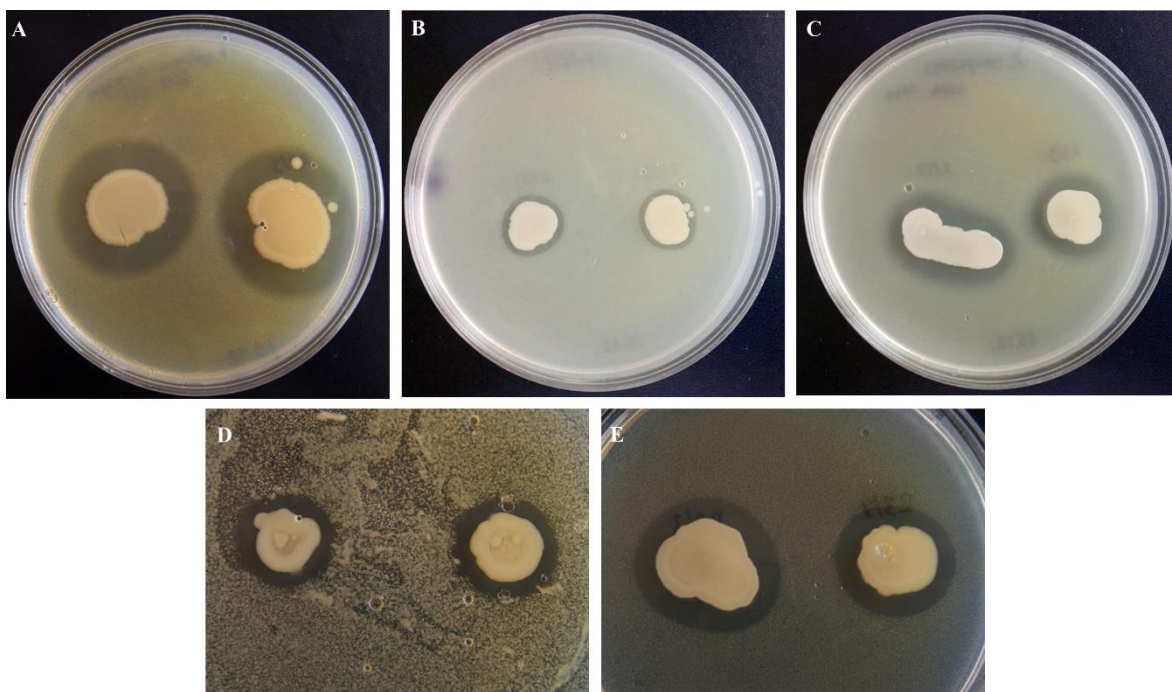
Sva tri izolata *M. laxa* sa šljive i izolat *M. laxa* sa trešnje su na sorti Rodna pokazali slični patogeni potencijal sa procentom infekcije ploda koji je varirao između 43 i 49% nakon 72 časa inkubacije (Slika 30). Nije postojala statistički značajna razlika u procentu zahvaćenosti plodova između 4 testirana izolata. Požegača je pokazala veću osetljivost na *M. laxa* sa procentom inficiranosti ploda između 43 i 66%. Intenzitet patogenosti izolata M8 i *M. laxa* sa trešnje je bio statistički značajno manji od izolata M13.



Slika 30. Procenat inficiranosti ploda šljive sorti Čačanska rodna i Požegača izazvan delovanjem tri izolata *Monilinia laxa* poreklom sa šljive. Kao kontrola je korišćen izolat poreklom sa trešnje (Mt). Vrednosti označene istim slovom nisu statistički značajne ($P < 0,05$), prema Tukey's HSD testu.

4.3. Antibakterijski potencijal izolata filofere šljive

Inicijalni skrining antibakterijske aktivnosti sproveden je sa 50 bakterijskih izolata na 22 fitopatogena poreklom sa šljive. Testirana je prekonoćna kultura potencijalnih antagonista. Od ukupnog broja testiranih izolata, 10 je pokazalo minimalnu antagonističku aktivnost formiranjem slabih zona inhibicije. Izolat R3/3 je pokazao antagonističku aktivnost sa izraženim zonama inhibicija na autohtone fitopatogene identifikovane kao *P. syringae*, *E. persicina*, *C. flaccumfaciens*, *C. michiganensis*, *Pantoea agglomerans* i *P. ananatis*. Takođe, aktivnost je ispoljio i na referentne sojeve *P. syringae* pv. *syringae* GSPB 1142, *X. campestris* pv. *campestris* NCPPB 1144 i *E. amylovora* NCPPB 683 (Slika 31.) kao i na četiri prirodna izolata *E. amylovora* poreklom sa dunje. Pored pune kulture, testiran je i supernatant dobijen iz prekonoćne kulture izolata R3/3, ali u tom obliku nije ispoljio antibakterijsku aktivnost. Test za produkciju bakteriocina je, takođe, bio negativan.



Slika 31. Antibakterijska aktivnost izolata R3/3 na: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* GSPB 1142 (A); *Pseudomonas syringae* P7/16_2 (B); *Xantomonas campestris* pv. *campestris* NCPPB 1144 (C) *Erwinia amylovora* NCPPB 683 (D); prirodni izolat *Erwinia amylovora* (E) (foto T. Janakiev).

4.3.1. Osobine izolata *Bacillus thuringiensis* R3/3

4.3.1.1. Genetički potencijal za produkciju antibiotika i enzima

Antagonistički izolat R3/3 je testiran na proizvodnju antibiotika i enzima umnožavanjem odgovarajućih gena. Skrining na odgovarajuće gene za sintezu iturina, surfaktin sintetaze, fengicin sintetaze i bacilomicin D sintetaze je bio negativan. Takođe, nije umnožen ni gen odgovoran za sintezu antibiotika cvitermicina A. Samo za lipopeptid kurstakin je dobijena očekivana traka od 1150 bp. Potencijal izolata da sintetiše N-acil homoserin laktonazu je potvrđen umnožavanjem *aiiA* gena sa trakom očekivane dužine od 753 bp. Umnožen je i *chit* gen koji kodira za endohitinazu i amplifikon je bio odgovarajuće dužine, 2000 bp. Umnoženi geni *aiiA* i *chit* su i sekvencirani. Prema homologiji sekvenci za oba gena sa GenBank bazom izolat R3/3 se sa najvećim procentom poklapa sa *B. thuringiensis* izolatima.

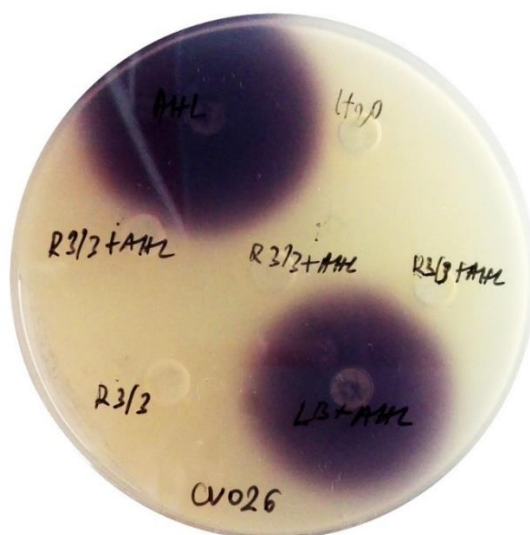
4.3.1.2. Proizvodnja egzoenzima

Izolat R3/3 je testiran na odgovarajućim podlogama za produkciju egzoenzima. Na skrobnom agaru je produkovao amilaze na 25 °C. Takođe, nakon inkubacije pri 25 °C na podlozi sa želatinom izolat je bio pozitivan na proteaze kada je prelišen taninskom kiselinom. Mananaze su detektovane na 25 i 37 °C, uz pojavu prosvetljene zone oko izolata. Sposobnost razgradnje ksilana u podlozi je detektovana na 55 °C.

4.3.1.3. “Quorum quenching” sposobnost

Produkcija N-acil-homoserin laktonaza je potvrđena u testu degradacije AHL-a. Izolat R3/3 je u prekonoćnoj kulturi gajen u prisustvu sintetičkog AHL-a. Testiranjem supernatanta dobijenog iz prekonoćne kulture, nije došlo do promene boje indikatorskog

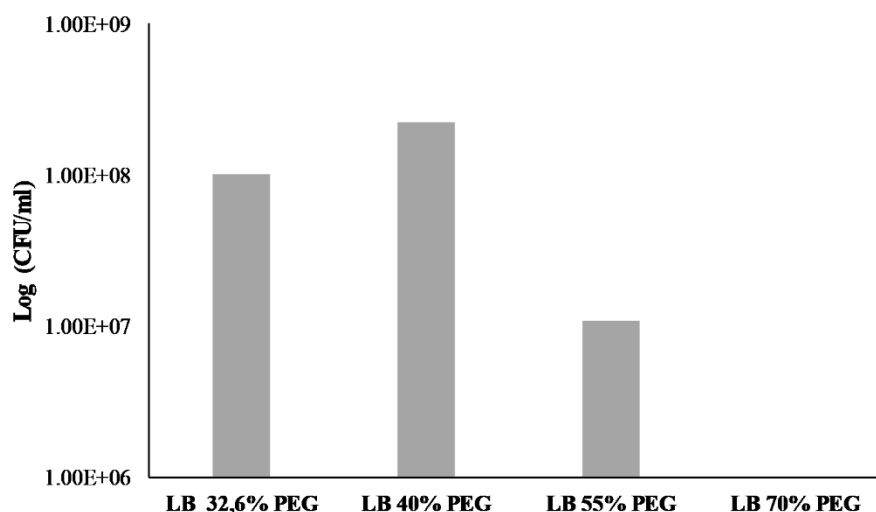
soja *C. violaceum* CV026 čime se smatra pozitivnim na utišavanje QS, odnosno da je izolat sposoban za QQ (Slika 32). U pozitivnoj kontroli, u koju je dodat čist AHL, došlo je do promene boje *C. violaceum* CV026 čija produkcija pigmenta violaceina zavisi od QS. Izolat R3/3 je bio negativan na produkciju endogenog AHL-a.



Slika 32. „Quorum quenching” aktivnost izolata R3/3 na LA podlozi sa indikatorskim sojem *Chromobacterium violaceum* CV026 (foto T. Janakiev).

4.3.1.4. PGPR osobine

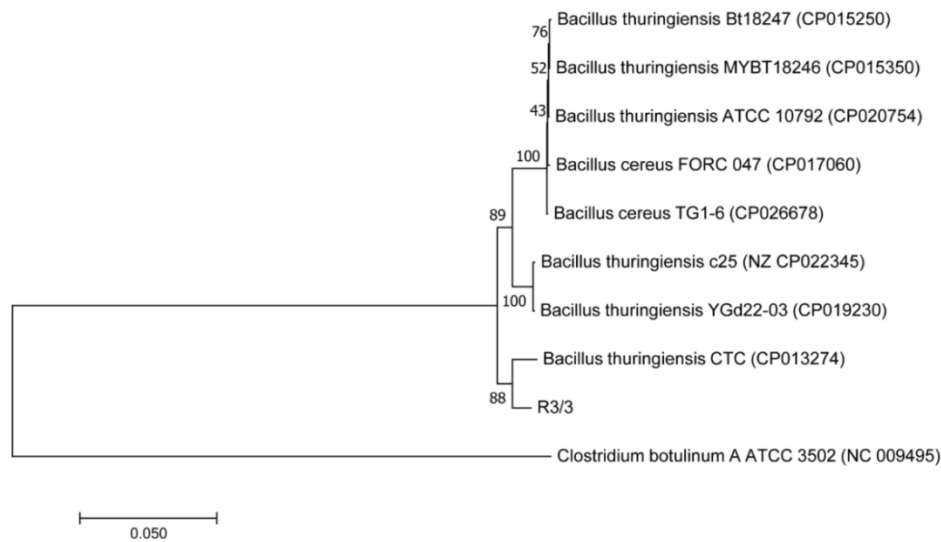
Testiranje na preživljavanje u ekstremnim uslovima je pokazalo da izolat R3/3 ne raste na temperaturi od 50 °C i na koncentraciji od 7% NaCl. Uslove suše je preživljavao u širokom opsegu koncentracija PEG-a, od 32,6% do 55% (Slika 33). Izolat R3/3 ne proizvodi siderofore, ne vrši solubilizaciju fosfata i ne proizvodi indol-3-sirćetnu kiselinu i cijanovodonik. Izolat nema sposobnost formiranja biofilma.



Slika 33. Preživljavanje izolata R3/3 u uslovima suše pri različitim koncentracijama PEG.

4.3.1.5. Filogenetski status

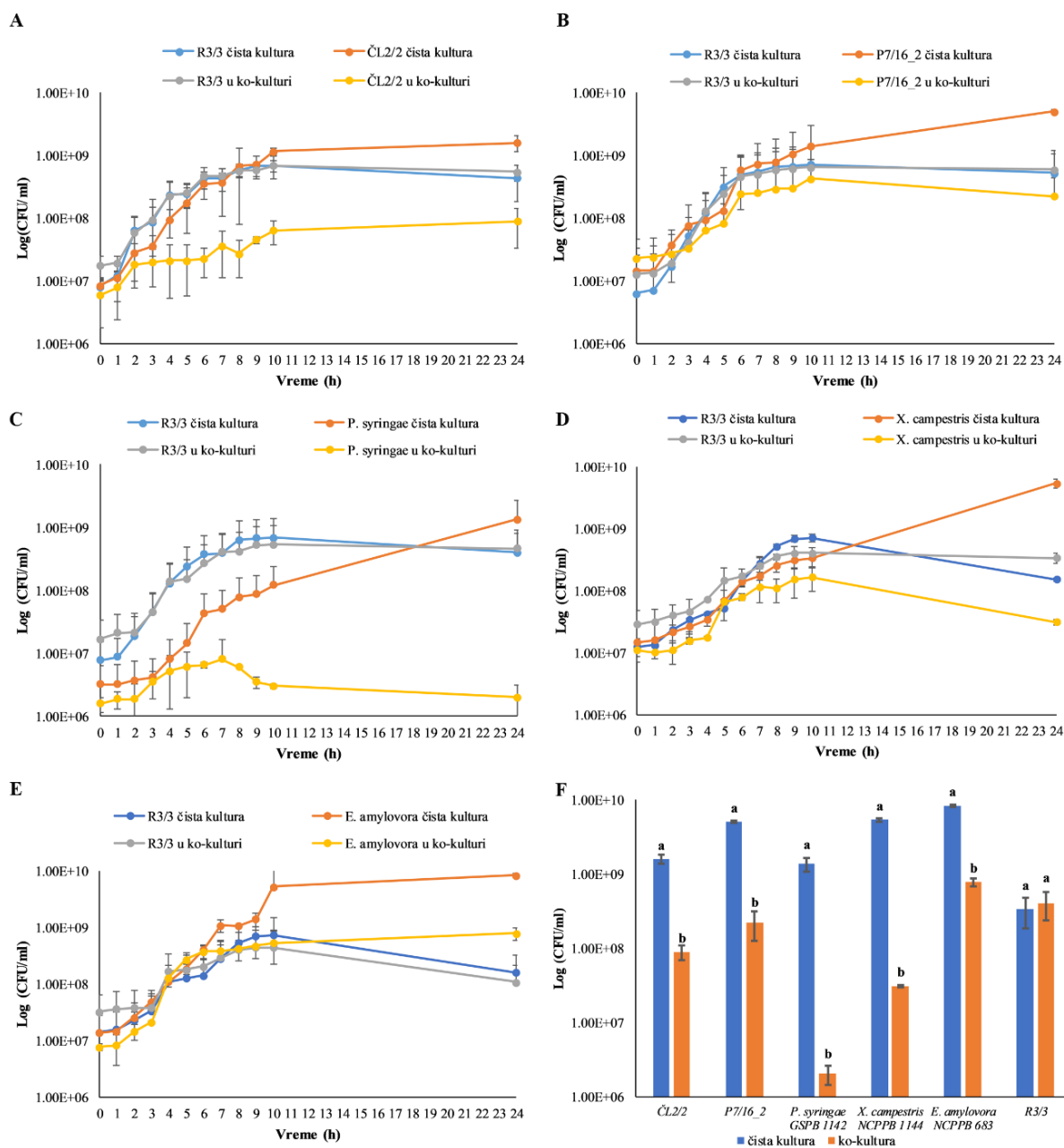
Za molekularnu identifikaciju izolata R3/3 je umnožena kodirajuća sekvenca za 16S rRNK, ali nakon analize sekvenci nije bilo moguće uspješno razlikovanje *B. cereus* i *B. thuringiensis* (Slika 14). Takođe, takav rezultat je dobijen i nakon sekvenciranja umnoženog *tuf* gena. Za dalju detekciju su amplifikovani „housekeeping” geni *pycA* i *ccpA*. Dobijene sekvence sva četiri gena za R3/3 izolat su povezana u jedinstvenu sekvencu (konkatemer) koja je iskorišćena za konstrukciju filogenetskog stabla, zajedno sa odgovarajućim sekvencama izolata iz GenBank baze. Rekonstrukcijom filogenetskih odnosa utvrđeno je da se izolat R3/3 grupiše sa *B. thuringiensis* CTC sojem (Slika 34).



Slika 34. Filogenetski odnosi izolata R3/3. Filogenetsko stablo rekonstruisano je Neighbor-joining metodom na osnovu spojenih sekvenci za gen za 16S rRNK i gena: *tuf*, *pycA* i *ccpA*. Kao „out group” je korišćena odgovarajuća sekvenca referentnog izolata *Clostridium botulinum* A ATCC 3502.

4.3.1.6. Antibakterijska aktivnost u ko-kulturi

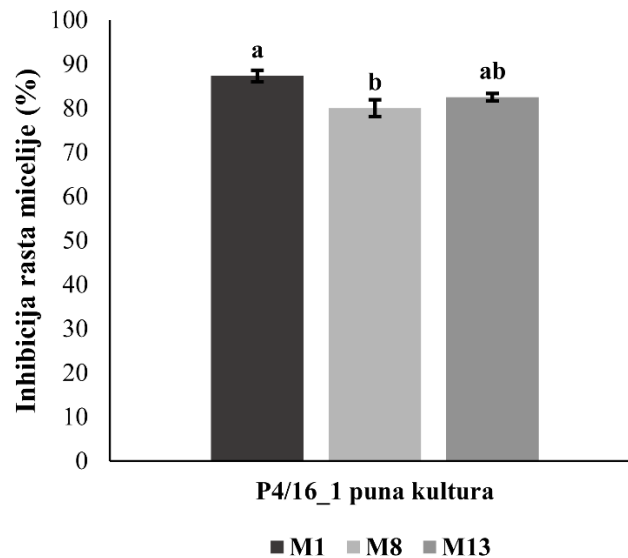
Pored sposobnosti da inhibira rast na hranljivoj podlozi, *B. thuringiensis* R3/3 je testiran i u ko-kultivaciji u tečnom medijumu sa različitim fitopatogenima. Ko-kultivacija sa tri referentna soja (*P. syringae* pv. *syringae*, *X. campestris* pv. *campestris* i *E. amylovora*) i 2 autohtona izolata sa šljive, *P. syringae* (ČL2/2 i P7/16_2), pokazala je da *B. thuringiensis* R3/3 ima potencijal da redukuje brojnost populacije patogena (Slika 35). Najveća redukcija CFU/ml je uočena prilikom ko-kultivacije *B. thuringiensis* R3/3 sa referentnim sojem *P. syringae* pv. *syringae* GSPB 1142 gde je već od sedmog časa ko-inkubacije primetan pad brojnosti patogena. Izolati *P. syringae* sa šljive su se međusobno razlikovali u dinamici tokom deset časova rasta sa *B. thuringiensis* R3/3. Izolat ČL2/2 je bio značajno suprimiran u ko-kultivaciji u odnosu na kontrolu, dok je za izolat P7/16_2 uočena manja redukcija rasta. Nakon 24 časa ko-kultivacije, broj detektovanih CFU/ml patogena u ko-kulturi je bio statistički značajno manji nego u odgovarajućim kontrolama ($P < 0,05$) (Slika 35F). Nije bilo značajnijih razlika u rastu *B. thuringiensis* R3/3 u odnosu na kontrolu. Njegova populacija se održavala stabilnom i tokom rasta sa patogenim izolatima.



Slika 35. Smanjenje brojnosti vijabilnih ćelija fitopatogenih bakterija prilikom ko-kultivacije izolata *Bacillus thuringiensis* R3/3 sa izolatima: *Pseudomonas syringae* ČL2/2 (A); P7/16_2 (B); referentnim izolatima *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* GSPB 1142 (C); *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NCPPB 1144 (D); *Erwinia amylovora* NCPPB 683 (E). Dinamika populacije patogena i antagoniste nakon 24 časova u ko-kulturi i u kontroli predstavljena je na slici F. Rezultati su prikazani u formi srednje vrednosti Log (CFU/ml) za tri nezavisna eksperimenta ($n = 3$). Vrednosti označene istim slovom nisu statistički značajne ($P < 0,05$), prema Tukey's HSD testu.

4.4. Antifungalna aktivnost izolata filofsere šljive na *Monilinia laxa*

Kolekcija bakterija i kvasaca izolovanih iz filofsere šljive testirana je u dualnoj kulturi na 11 izolata *M. laxa*. U Prilogu 8. su predstavljeni rezultati primarnog skrininga na tri izolata *M. laxa* (M1, M8 i M13). Umerenu aktivnost pokazala su 23 bakterijska izolata i 5 izolata kvasaca. Uprkos tome što je *B. thuringiensis* R3/3 u PCR skriningu demonstrirao potencijal za produkciju endohitinaza, zabeležena je umerena antifungalna aktivnost na *M. laxa*. Bakterijski izolat P4/16_1 ispoljio je značajnu inhibitornu aktivnost na svim testiranim izolatima. U dualnoj kulturi P4/16_1 je doveo do inhibicije rasta micelije na M1, M8 i M13 izolatima *M. laxa* u opsegu od 80 do 88% (Slika 36). Izolati M8 i M13 su imali statistički značajno manji procenat inhibicije rasta micelije od izolata M1.

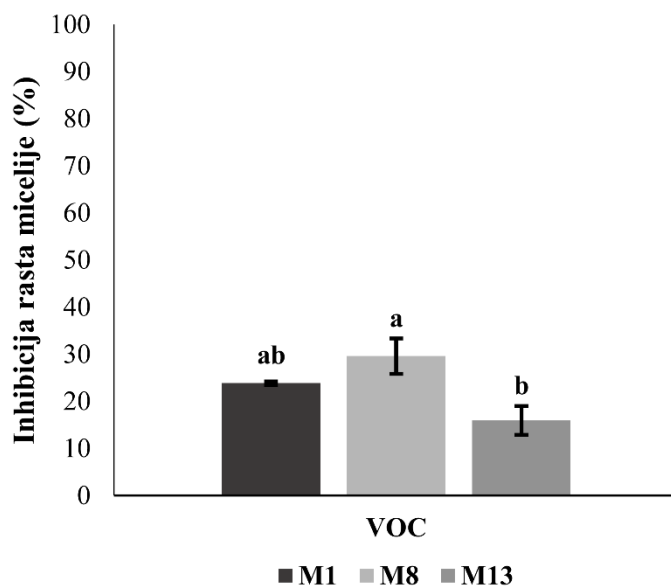


Slika 36. Antifungalna aktivnost izolata P4/16_1 u dualnoj kulturi na tri *Monilinia laxa* izolata. Prikazane su srednje vrednosti procenata inhibicije rasta micelije (n = 3). Vrednosti označene istim slovom nisu statistički značajne ($P < 0,05$), prema Tukey's HSD testu.

4.4.1. Osobine izolata *Pseudomonas synxantha* P4/16_1

4.4.1.1. Antifungalna aktivnost isparljivih organskih jedinjenja

Testirana je antifungalna aktivnost isparljivih organskih jedinjenja izolata P4/16_1 na izolate *M. laxa* u zatvorenoj atmosferi. Zabeležena je inhibicija rasta micelije, pod uticajem isparljivih jedinjenja, u opsegu od 16 do 30%. Isparljiva organska jedinjenja su imala najjači inhibitorni efekat na rast micelije izolata M8 (Slika 37).



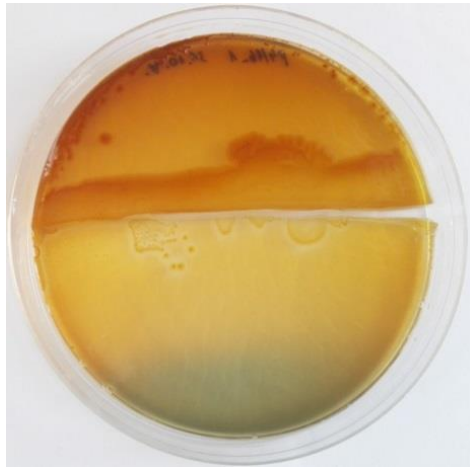
Slika 37. Antifungalna aktivnost isparljivih organskih jedinjenja (VOC) izolata P4/16_1 na tri *Monilinia laxa* izolata. Prikazane su srednje vrednosti procenata inhibicije ($n = 3$) rasta micelije. Vrednosti označene istim slovom nisu statistički značajne ($P < 0,05$), prema Tukey's HSD testu.

4.4.1.2. PGPR osobine

Testiranje P4/16_1 na preživljavanje u ekstremnim uslovima je pokazalo da izolat ne raste u tečnoj kulturi kada je gajen na temperaturi od 50 °C i pri koncentraciji od 7% NaCl u medijumu. U uslovima suše je podnosio visoke koncentracije PEG-a, od 32,6% i 40%. Pri koncentracijama od 55% PEG-a nije uočen rast izolata. Pokazao je slabu

.....

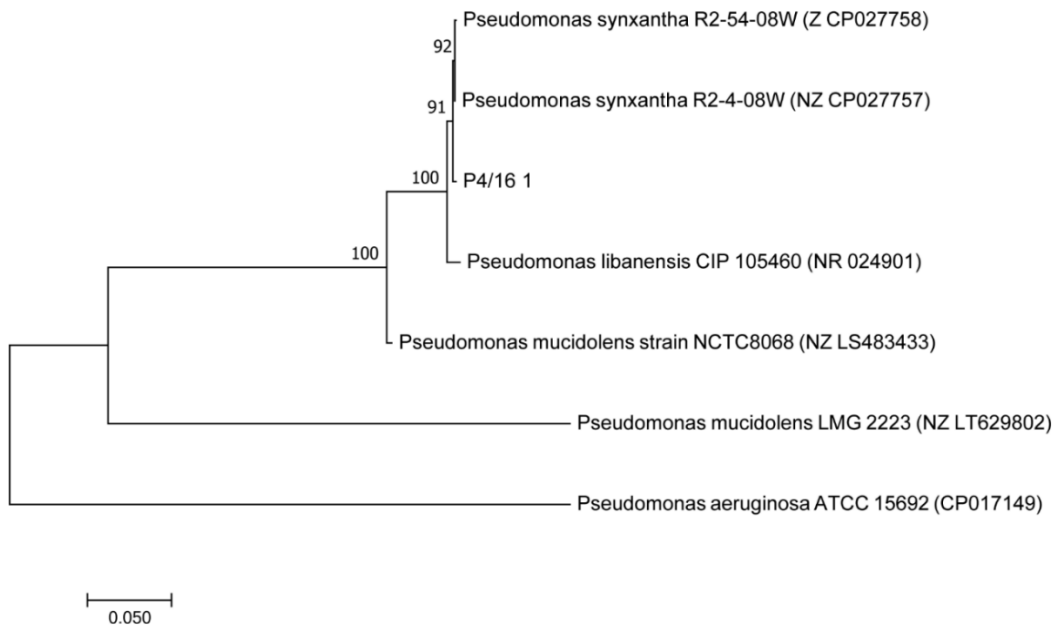
sposobnost solubilizacije fosfata i bio je negativan na produkciju indol-3-sirćetne kiseline. PCR skrining na gene koji kodiraju za nitrogenazu, deaminazu i cijanovodonik je bio negativan. Izolat je pokazao slabu sposobnost formiranja biofilma i bio je negativan na produkciju egzoenzima (amilaza, proteinaza, mananaza, ksilanaza). Na CAS agaru je detektovano da izolat P4/16_1 proizvodi siderofore (Slika 38).



Slika 38. Produkcija siderofora na CAS agaru od strane izolata P4/16_1 (foto T. Janakiev).

4.4.1.3. Filogenetski status

Izolat P4/16_1 sa izraženom antifungalnom aktivnošću na *M. laxa* je identifikovan sekvenciranjem gena za 16S rRNK. Upoređivanjem sekvence izolata sa GenBank bazom dobijeni su identični BLAST rezultati za tri vrste- *Pseudomonas synxantha*, *P. mucidolens* i *P. libanensis*. Za bolju diskriminaciju unutar *Pseudomonas* spp., umnožen je *gyrB* region. Filogenetsko stablo formirano od spojenih sekvenci 16S rDNA i *gyrB* sekvenci je pokazalo da je P4/16_1 najsrodniji *P. synxantha* izolatima (Slika 39).



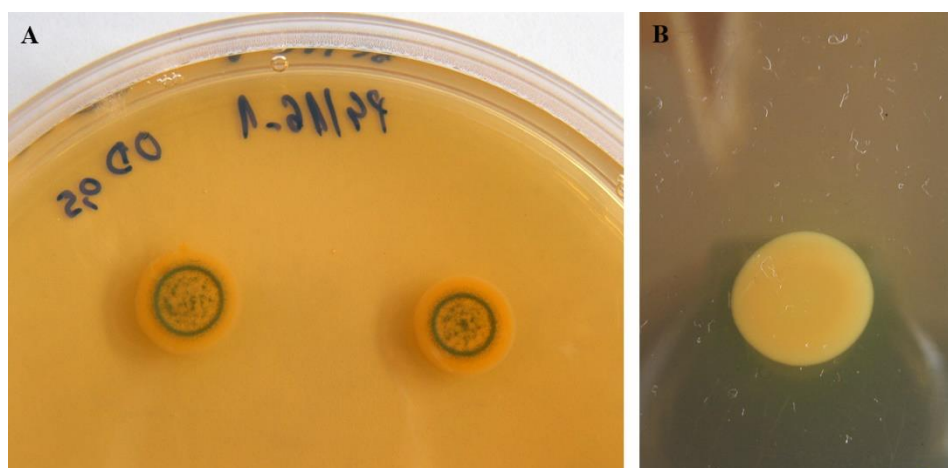
Slika 39. Filogenetski odnosi izolata P4/16_1. Filogenetsko stablo rekonstruisano je Neighbor-joining metodom na osnovu spojenih sekvenci gena za 16S rRNK i *gyrB* gena. Kao „out group” je korišćena odgovarajuća sekvenca referentnog izolata *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692.

4.4.1.4. Genetički potencijal za produkciju antibiotika

Prisustvo kodirajućih gena za antibiotike u genomu *P. synxantha* P4/16_1 je utvrđeno PCR skriningom. Rezultati su bili negativni za pirolnitrin, pioluteorin i HCN. Jasna traka na očekivanoj dužini od 1150 bp je utvrđena za amplifikone kodirajućeg gena za fenazin-1-karboksilnu kiselinu. Sekvenciranjem je potvrđeno da umnožena sekvenca ima visok nivo homologije sa *phzC* i *phzD* genima soja *P. synxantha* LBUM223 sa sledećim BLASTn rezultatima Max/Total score: 2065; Query cover: 100%; E value: 0.0; Ident.: 100%.

4.4.1.5. Produkcija fenazin-1-karboksilne kiseline

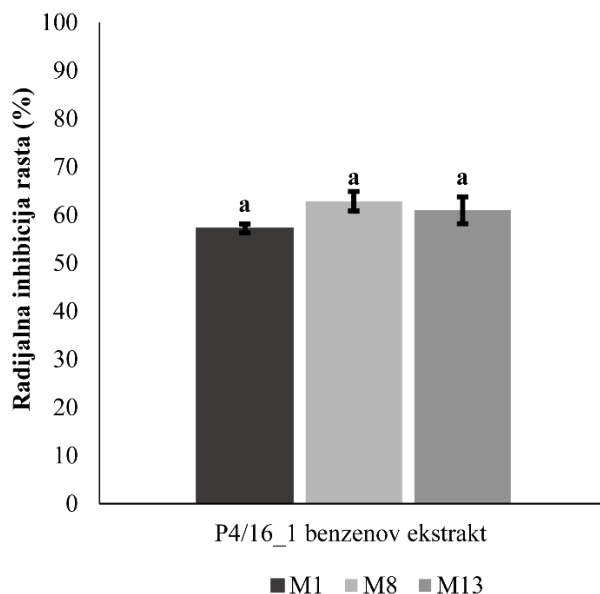
U PCA testu (Slika 40) je za *P. synxantha* P4/16_1 pokazano da već nakon 48 časova formira tamnozelenih kristala na površini kolonije što se smatra pozitivnim testom na produkciju fenazin-1-karboksilna kiseline. Uzimajući u obzir pojavu kristala u PCA testu i genetički potencijal izolata da proizvodi fenazin-1-karboksilnu kiselinu, izvršena je benzenova ekstrakcija kako bi se izolovala fenazinska jedinjenja koja on proizvodi. Iz kulture *P. synxantha* P4/16_1 gajene u MSM medijumu tokom četiri dana je dobijen sirov benzenov ekstrakt.



Slika 40. Produkcija fenazin-1-karboksilne kiseline u kulturi *Pseudomonas synxantha* P4/16_1: Prisustvo tamnozelenih kristala na PDA medijumu (A); Kontrolna kultura bez tamnozelenih kristala na TSA medijumu (B) (foto T. Janakiev).

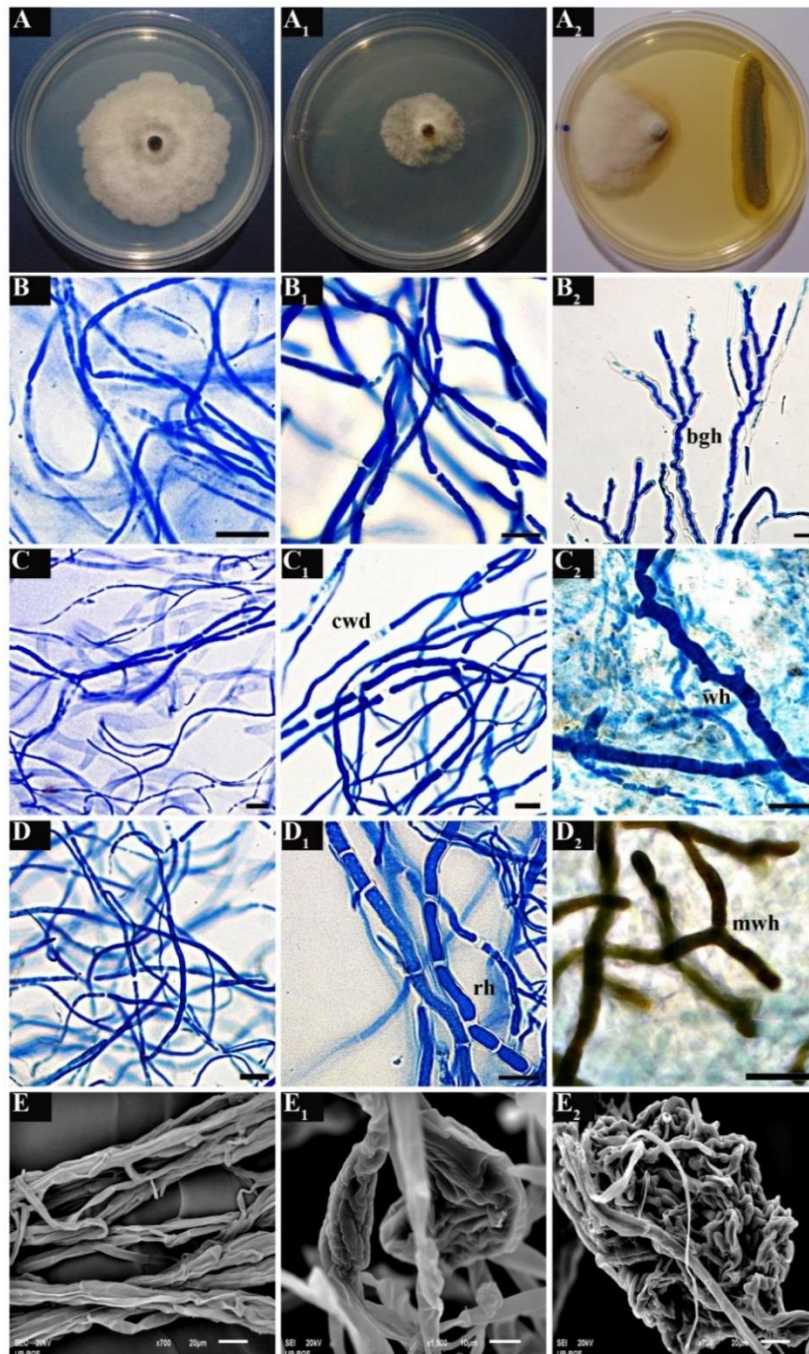
4.4.1.6. Antifungalna aktivnost benzenovog ekstrakta

Sirov benzenov ekstrakt je rastvoren u metanolu i testirana je koncentracija od 10 mg/ml na tri izolata *M. laxa* u testu radijalne inhibicije rasta. Rezultati antifungalne aktivnosti ekstrakta su prikazani na Slici 41. Benzenov ekstrakt je inhibirao rast micelije u opsegu od 57 do 63%. Nije bilo statistički značajnih razlika u inhibitornom efektu ekstrakta na rast micelije izolata M1, M8 i M13.



Slika 41. Antifungalna aktivnost benzenovog ekstrakta *Pseudomonas synxantha* P4/16_1 na tri *Monilinia laxa* izolata. Prikazane su srednje vrednosti procenata inhibicije rasta micelije (n = 3). Vrednosti označene istim slovom nisu statistički značajne ($P < 0,05$), prema Tukey's HSD testu.

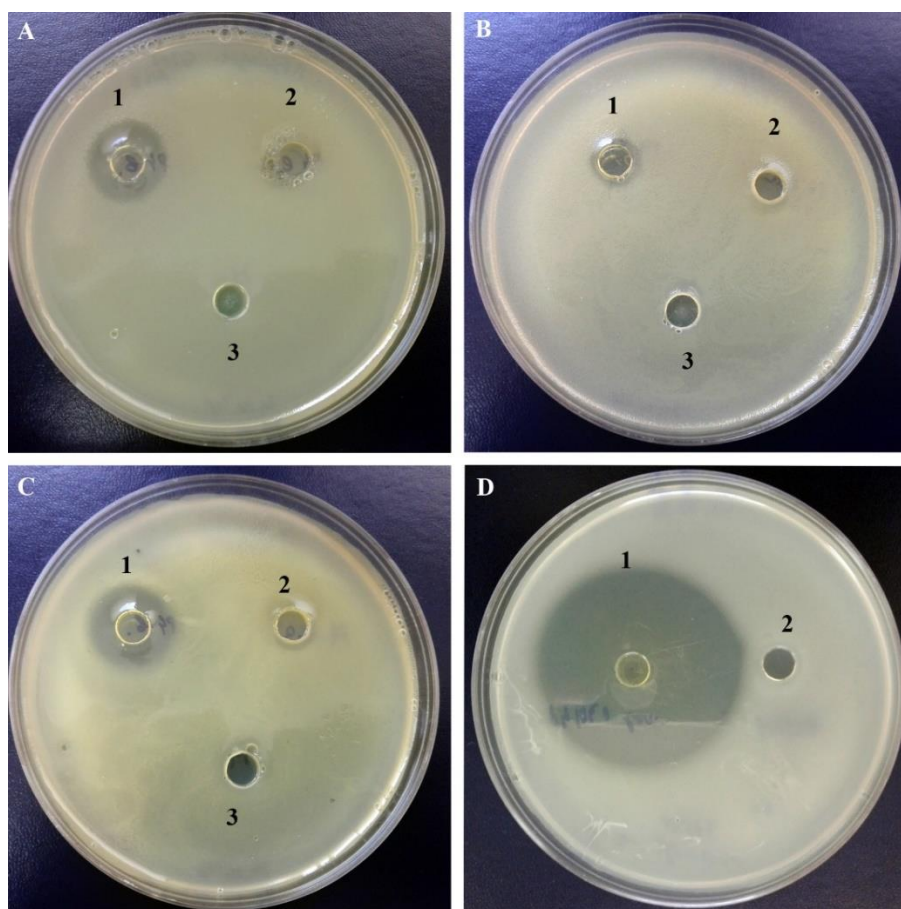
Uticaj pune kulture *P. synxantha* P4/16_1, kao i benzenovog ekstrakta na rast M1, M8 i M13 izolata *M. laxa* je analiziran i pod svetlosnim mikroskopom. Uočene su različite morfo-fiziološke promene na nivou hifa izolata M8. Promene zabeležene na hifama su obuhvatale učestalu dezintegraciju ćelijskog zida hifalnih kompartmenata, formiranje krupnih i veoma septiranih hifa izmešanih sa hifama normalne morfologije, kao i veoma granatih genikulatnih hifa (Slika 42 B1). Sedmodnevna kultivacija *M. laxa* M8 sa *P. synxantha* P4/16_1 je za posledicu imala i formiranje karakterističnih hijalinih "crvolikih" hifa uronjenih u masu micelije (Slika 42 C2). U slučaju *M. laxa* M13, na rubu kolonije okrenute ka rastu bakterije uočena je i melanizovana forma "crvolikih" hifa (Slika 42 D2). Na izolatu M8 je, takođe, analiziran izgled hifa pod elektronskom skenirajućom mikroskopijom gde je uočeno da je benzenov ekstrakt indukovao proliferaciju hifa (Slika 42 E1), kao i da se javlja velika masa izmešanih hifa formiranih u miceliji iz ko-kulture sa *P. synxantha* P4/16_1 (Slika 42 E2).



Slika 42. Morfo-fiziološke promene na hifama tri *Monilinia laxa* izolata (M1, M8 i M13) indukovane sirovim benzenovim ekstraktom *Pseudomonas synxantha* P4/16_1 (B1, C1, D1) i u dualnoj kulturi (B2, C2, D2) posmatrane svetlosnim mikroskopom. Promene na hifama *Monilinia laxa* M8 posmatrane na SEM: kontrola sa hifama normalne morfologije (E); proliferacija hifa izazvana benzenovim ekstraktom (E2). Hife normalne morfologije izolata *Monilinia laxa* u kontroli rasta pod svetlosnim mikroskopom (B-D). Kontrolna kultura (A), kultura tretirana benzenovim ekstraktom (A1); dualna kultura (A2). cwd – dezintegracija ćelijskog zida; rh –robustne hife sa ponavljajućom septacijom; bgh – granate kolenaste hife; wh – bezbojne "crvolike" hife uronjene u masu micelije; mwh – melanizovana forma hifa. Metrić = 20 μ m.

4.4.1.7. Antibakterijska aktivnost benzenovog ekstrakta

Benzenov ekstrakt dobijen iz *P. synxantha* P4/16_1 je pokazao i snažnu antibakterijsku aktivnost na referentne sojeve *P. syringae* pv. *syringae* GSPB 1142, *X. campestris* pv. *campestris* i *E. amylovora* NCPPB 683. Ekstrakt je takođe testiran i na dva autohtona izolata *P. syringae* sa šljive (ČL2/2 i P7/16_2) na kojima je imao slabu aktivnost. *In vitro* antibakterijska aktivnost benzenovog ekstrakta je prikazana na Slici 43.

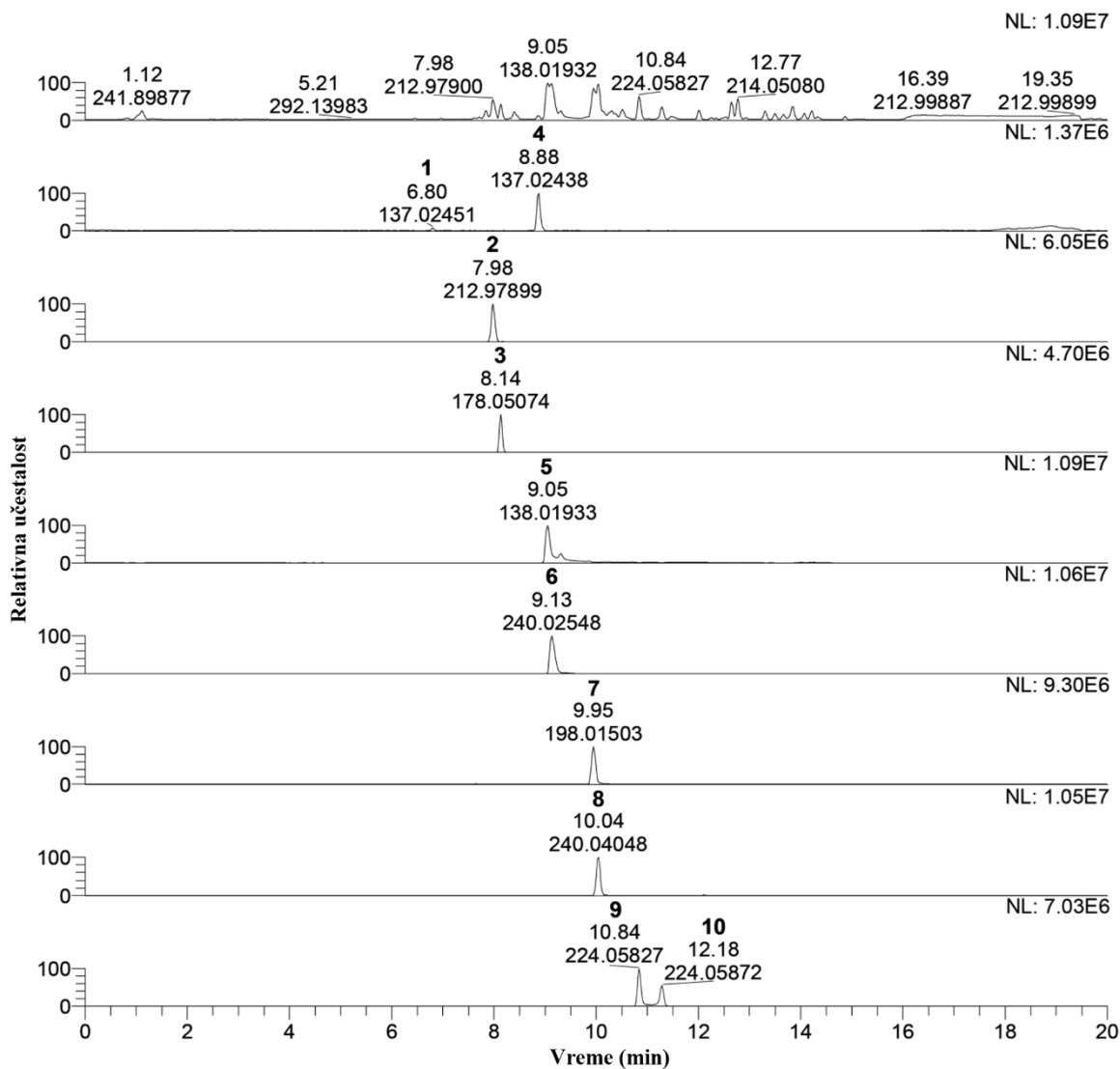


Slika 43. Antibakterijska aktivnost benzenovog ekstrakta na: *Pseudomonas syringae* (A); P7/16_2 (B); *Xanthomonas campestris* (C); *Erwinia amylovora* (D): 1. benzenov ekstrakt *Pseudomonas synxantha* P4/16_1; 2. supernatant *Pseudomonas synxantha* P4/16_1; 3. Metanol (foto T. Janakiev).

4.4.1.8. Hemijski sastav benzenovog ekstrakta

Tečna hromatografija kuplovana sa masenom spektrometrijom (HPLC-MS) je korišćena za hemijsku analizu sirovog benzenovog ekstrakta *P. synxatha* P4/16_1. Identifikacija jedinjenja je izvršena na osnovu pretrage molekulskih masa deprotonovanih molekula ($[M-H]^-$) i odgovarajućih MS^n fragmentacija. Osnovni hromatogram dobijen analizom benzenovog ekstrakta prikazan je u prvom redu Slike 44. Ispod osnovnog hromatograma prikazani su izdvojeni jonski hromatogrami za identifikovana jedinjenja. Za svako jedinjenje u Tabeli 5. navedeno je retenciono vreme (t_R , min), molekulska formula za deprotonovani jon ($[M-H]^-$), izračunate i uočene mase (m/z) kao i odstupanje uočene mase od izračunate mase (Δ ppm) i glavnim MS^2 , MS^3 i MS^4 jonskim fragmentima.

Jedinjenja **1** i **4** (sa t_R 6,80 i 8,88 min) imaju $[M-H]^-$ jone iste mase na 137 m/z , i iz tog razloga joni imaju istu bruto formulu ($C_7H_5O_3^-$) i identifikovani su kao strukturni izomeri hidroksibenzojeve kiseline: 2-hidroksibenzojeva kiselina, poznata kao salicilna kiselina; i 4-hidroksibenzojeva kiselina. Za oba jedinjenja je detektovan MS^2 osnovni pik na 93 m/z , generisan gubitkom CO_2 (44 Da). Identitet jedinjenja **1**, sa retencionim vremenom 6,80 detektovano kao prvi signal na hromatogramu, potvrđen je pomoću standarda 4-hidroksibenzojeve kiseline. Za jedinjenje **4**, signal na 8,88 min potvrđeno je da pripada 2-hidroksibenzojevoj kiselini (salicilna kiselina). Strukture jedinjenja **2**, **3**, **5**, **6** i **7** identifikovane su na osnovu egzaktnih masa i odgovarajućih MS^n fragmentacija (Tabela 6). Obrasci fragmentacije i predložene strukture fragmentisanih jona detektovanih jedinjenja prikazani su u Prilogu 9. Takođe, u Tabeli 6 MS^n prikazani podaci su za neidentifikovana jedinjenja **8**, **9** i **10**.



Slika 44. Osnovni hromatogram sa signalima dobijenim analizom benzenovog ekstrakta (vrh slike) i izdvojeni jonski hromatogrami za identifikovana jedinjenja u negativnom jonizacionom modu ($[M-H]^-$).

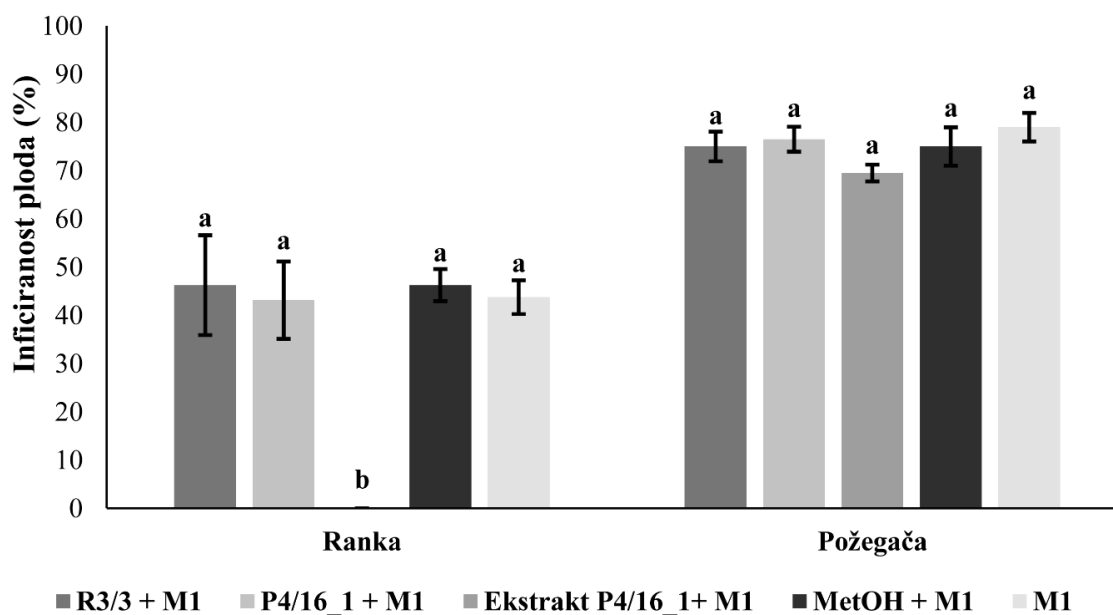
Tabela 6. Hemijski sastav sirovog benzenovog ekstrakta.

Br. pika	t_R , min	Molekularna formula za [M-H] ⁻	Izračunata masa, [M-H] ⁻ (m/z)	Uočena masa, [M-H] ⁻ (m/z)	Δ (ppm)	MS ² fragmenti (%) ^a	MS ³ fragmenti (%) ^a	MS ⁴ fragmenti (%) ^a	Ime jedinjenja
1	6,80	C ₇ H ₅ O ₃ ⁻	137,02442	137,02451	-0,66	109(5), 93 (100)	n.d.	n.d.	4-hidroksibenzoeva kiselina
2	7,98	C ₆ H ₈ N ₂ O ₇ ⁻	212,97892	212,97899	-0,33	169 (100)	138(20), 123 (100), 115(10), 107(25)	n.d.	(3Z,4Z)-3,4-bis(nitrometilen) dihidrofuran-2,5-dion
3	8,14	C ₉ H ₈ NO ₃ ⁻	178,05097	178,05074	1,29	136 (100), 134(30)	92 (100)	n.d.	4-acetamidobenzoeva kiselina
4	8,88	C ₇ H ₅ O ₃ ⁻	137,02442	137,02438	0,29	109(5), 93 (100)	n.d.	n.d.	hidroksibenzoeva kiselina
5	9,02	C ₆ H ₄ NO ₃ ⁻	138,01967	138,01942	1,81	108 (100)	n.d.	n.d.	2-hidroksifenil nitrit
6	9,13	C ₈ H ₆ N ₃ O ₆ ⁻	240,02621	240,02548	3,04	198 (100)	181 (100), 168(90), 151(5), 138(45), 89(10)	164 (100), 151(15), 134(15), 120(40), 106(10)	N-(4-hidroksi-2,5-dinitrofenil) acetamid
7	9,95	C ₆ H ₄ N ₃ O ₅ ⁻	198,01564	198,01503	3,08	181 (100), 168(85), 153(20), 138(45), 113(15)	164 (100), 153(10), 134(35), 120(30), 106(10)	118(45), 109(10), 103(20), 93(15), 65 (100)	4-amino-2,5-dinitrofenol
8	10,04	C ₁₂ H ₆ N ₃ O ₃ ⁻	240,04146	240,04048	4,08	210 (100)	182 (100), 166(10)	154 (100)	Neidentifikovano
9	10,84	C ₁₃ H ₈ N ₂ O ₂ ⁻	224,05967	224,05827	6,25	195(5), 181(55), 180 (100)	150 (100), 136(20), 135(40), 123(85)	n.d.	Neidentifikovano
10	11,27	C ₁₃ H ₈ N ₂ O ₂ ⁻	224,05967	224,05872	4,24	181(35), 180 (100)	123(70), 117(70), 109 (100)	n.d.	Neidentifikovano

a) **zadebljalim** (bold) fontom je obeležen osnovni jon, jon čiji relativan intenzitet u masenom spektru je 100%.

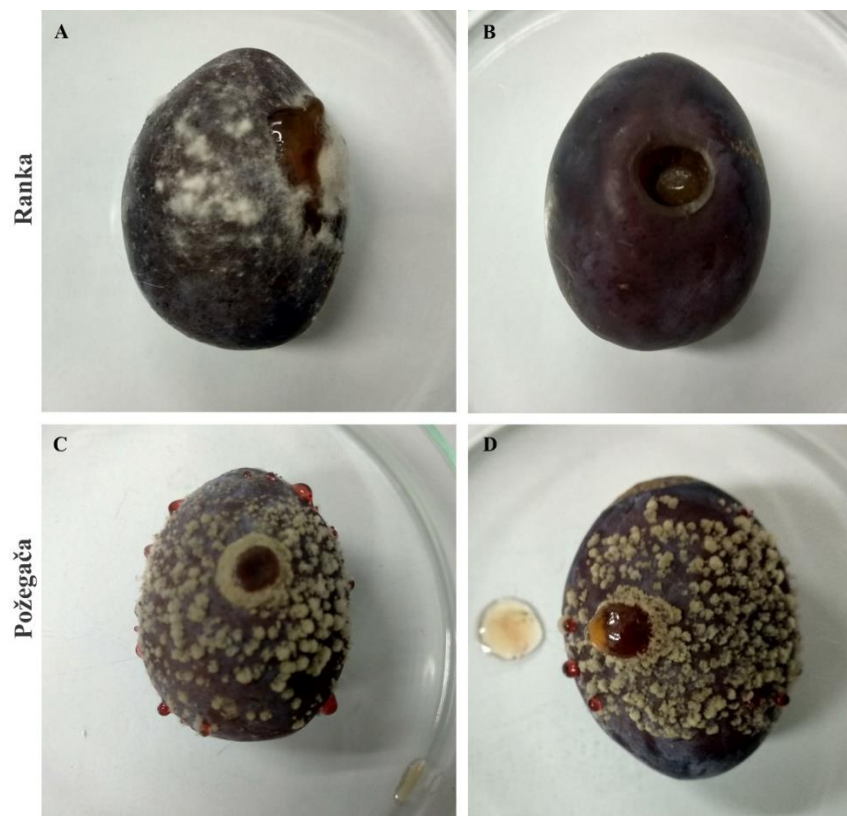
4.4.1.9. Biokontrolni potencijal *Bacillus thuringiensis* R3/3 i *Pseudomonas synxantha* P4/16_1 na plodu šljive *ex situ*

Za biokontrolni test odabrane su dve autohtone sorte šljive, Požegača i Ranka, i autohtoni antagonistički izolati: *B. thuringiensis* R3/3 i *P. synxantha* P4/16_1; kao i sirovi benzenov ekstrakt *P. synxantha* P4/16_1. Kao patogen korišćen je autohtoni izolat *M. laxa* M1. Nakon 5 dana inkubacije određen je procenat zahvaćenosti ploda micelijom izolata M1. U kontroli je za obe sorte uočena pojava tipičnih simptoma mrke truleži uz pucanje plodova i većih količina eksudata na plodovima tretiranim izolatom *M. laxa* M1. Postojala je razlika u procentu inficiranosti plodova dve sorte. Manji procenat ploda kod sorte Ranka je bio zahvaćen bolešću, dok su simptomi mrke truleži na Požegači bili intenzivniji i sa većim procentom inficiranosti ploda (Slika 45).



Slika 45. Procenat inficiranosti ploda šljiva sorti Ranka i Požegača izolatom *Monilinia laxa* M1. Vrednosti označene istim slovom nisu statistički značajne ($P < 0,05$), prema Tukey's HSD testu.

Kontrole sa inokulisanim fragmentom PDA podloge nisu imale prisutne simptome mrke truleži niti vidljiv porast micelije. Takođe, kontrole sa bakterijskim kulturama, kao i kontrola rastvarača, nisu dovele do promena na samom plodu. PUNE kulture izolata *B. thuringiensis* R3/3 i *P. synxantha* P4/16_1 nisu ispoljile antifungalni efekat kada su testirane na M1 izolat na plodovima obe sorte šljive. Aktivnost benzenovog ekstrakta *P. synxantha* P4/16_1 zavisila je od sorte šljive na kojoj je testiran. Visoku antifungalnu aktivnost je imao na *M. laxa* na sorti Ranka sa 100% inhibicije rasta micelije (Slika 46B). Takva aktivnost nije uočena na plodovima Požegača (Slika 46D), gde nije postojala statistički značajna razlika u procentu inficiranih plodova sa *M. laxa* između različitih tretmana.



Slika 46. Biokontrolni test na plodovima šljiva sorti Ranka i Požegača: Kontrolni plodovi sa simptomima mrke truleži (A, C); Plodovi tretirani benzenovim ekstraktom *Pseudomonas synxantha* P4/16_1 (B, D) (foto T. Janakiev).

5. DISKUSIJA

5. DISKUSIJA

Srbija je značajan proizvođač šljiva u Evropi sa velikom površinom pod šljivicama i sa godišnjim prinosom koji pozicionira Srbiju na treće mesto liste deset najvećih svetskih proizvođača prema FAOSTAT (2017). Pored upotrebe ploda šljive kao hrane, najveći deo godišnjeg roda se prerađuje u tradicionalnu rakiju šljivovicu. Za proizvodnju visokokvalitetnih rakija se, zbog svojih odgovarajućih karakteristika, koriste autohtone sorte Požegača i Ranka, ali i hibridne sorte Čačanska lepotica i Čačanska rodna (Matković, 2015). U Srbiji su prema Hrustić et al. (2015) stabla šljive značajno pogođena patogenom gljivom *Monilinia laxa* koja izaziva ogromne gubitke godišnjeg prinosa koštuničavog voća, kada se razviju odgovarajući klimatski uslovi. Takođe, izazivač bakterioznog raka šljive, *Pseudomonas syringae*, izolovan je u šljivicama zapadne Srbije sa značajnim nekrozama stabla (Gavrilović, 2009). Iako su patogeni šljive relativno dobro istraženi kao i njihov efekat na redukciju prinosa autohtonih i hibridnih sorti šljive u Srbiji, mikrobiota ovih sorti je skoro u potpunosti neistražena. Poznavanje diverziteta mikrobijalnih zajednica filofsere šljive, kao i izolacija antagonističkih mikroorganizama iz nje, mogli bi doprineti zaštiti ove voćarske kulture od bakterijskih i fungálnih patogena.

U prvoj fazi rada analizirani su diverziteti zajednica bakterija i gljiva filofsere četiri sorte šljive i praćene su promene u diverzitetu tokom dve fenološke faze. Odabrane su dve autohtone sorte, Ranka i Požegača i dve hibridne sorte, Čačanska lepotica i Čačanska rodna, koje su hibridi sorte Požegača. Uzorkovanje je izvršeno u voćnjaku netretiranom pesticidima duži vremenski period, kako bi se imao uvid u prirodnu zajednicu mikroorganizama. Analiza mikrobijalnog diverziteta je obuhvatala ranu fenološku fazu u maju, i fazu u julu, kada plod ulazi u proces sazrevanja. Istraživanje ukupnog diverziteta mikroorganizama je sprovedeno metagenomskim pristupom, a rezultati primene tradicionalnih kultivabilnih metoda dali su uvid u kultivabilnu zajednicu istih uzoraka.

Karakterizacija zajednica u metagenomskim studijama sa fokusom na diverzitet bakterija je utvrdila da u filosferi dominiraju predstavnici razdela Proteobacteria odnosno klase α -Proteobacteria (Vacher et al., 2016), što je potvrđeno i za filosferu šljive u ovom

radu. Na četiri analizirane sorte šljive među klasom α -Proteobacteria dominirali su predstavnici rodova *Sphingomonas* i *Methylobacterium*. Vrste pomenutih rodova su u studiji Jo et al. (2015) takođe bile dominantne na listovima *P. domestica* i drugih vrsta roda *Prunus*. *Sphingomonas* i *Methylobacterium* su okarakterisani kao rodovi sa opšteprisutnim vrstama u filiosferi različitih biljaka (Ottesen et al., 2009; Knief et al., 2012; McGarvey et al., 2015) sa funkcijama koje su usko povezane sa domaćinom. *Methylobacterium* spp. ima značajnu ulogu u metabolizmu metanola koji se oslobađa iz biljnog tkiva kao isparljiva komponenta (Knief et al., 2012). Za vrste roda *Sphingomonas* je utvrđeno da mogu redukovati simptome bolesti biljaka i uticati na smanjenje populacija patogena pokazujući protektivni efekat za biljku domaćina. Ta osobina je prepoznata kod vrsta *Sphingomonas* spp. koje su izolovane sa biljaka, ali ne i iz drugih staništa (Rastogi et al., 2013). Unutar klase γ -Proteobacteria je detektovano najviše sekvenci koje pripadaju vrstama rodova *Buchnera* i *Pseudomonas*. Visoka relativna učestalost vrsta roda *Buchnera* je zabeležena u uzorku biljnog materijala sa sorte Požegača u ranoj fenološkoj fazi. *Buchnera* spp. obuhvata endosimbionte biljnih vaši (Aydogan et al., 2018) pa veća učestalost vrsta ovog roda ukazuje na povećano prisustvo biljnih vaši. Tokom uzorkovanja filiosfere Požegače zaista je i uočeno povećano prisustvo biljnih vaši. Rod *Pseudomonas* je kosmopolitski i nekoliko studija je potvrdilo da vrste ovog roda mogu dostići znatnu brojnost u filiosferi različitih biljaka, pa i različitih vrsta roda *Prunus* (Jo et al., 2015; Vacher et al., 2016).

Pored vrsta rodova *Sphingomonas* i *Methylobacterium*, koji su u velikom procentu detektovane i u studiji Jo et al. (2015), naše dve studije su se podudarale i u detekciji pripadnika rodova: *Pseudomonas*, *Acidovorax*, *Curtobacterium*, *Kineococcus*, *Oxalobacter* itd. Razlike diveziteta u našoj studiji i onog detektovanog u istraživanju Jo et al. (2015) su uočene u vrstama retkih rodova. U našem radu detektovane su vrste rodova *Janthinobacterium*, *Terriglobus*, *Delftia*, *Pedobacter*, *Buchnera*, *Agrobacterium*, *Deinococcus*, *Lactobacillus*, *Friedmanniella* i mnoge druge navedene u Prilogu 2. Uočene razlike u vrstama retkih rodova ukazuju na to da genotip biljke i geografsko poreklo utiču na sastav mikrobioma.

Dominacija vrsta iz rodova u sastavu razdela Firmicutes je zabeležena samo u ranoj fenološkoj fazi, i to jedino na sorti Ranka. U drugim istraživanjima, prisustvo pripadnika razdela Firmicutes je u visokom procentu registrovano na različitim poljoprivrednim kulturama i autohtonim vrstama biljaka (Williams & Marco, 2014), pa i na listovima *P. domestica* (Jo et al., 2015). Unutar razdela Bacteroidetes *Hymenobacter* je jedini rod sa značajnim procentom učestalosti vrsta u bakterijskom mikrobiomu šljive. Mali broj istraživanja se bavio vrstama roda *Hymenobacter*, ali su zapaženi kao tipični pripadnici bakterijskih zajednica filofere (Ottesen et al., 2009; Leveau & Tech, 2010) i da su čak dominantni kao endofiti na različitim biljnim vrstama (Ding & Melcher, 2016). Ipak, i dalje nije potpuno jasna njihova uloga u filosferi. U manjem procentu, ali iznad 2% relativne učestalosti su detektovani predstavnici rodova *Enterobacter*, *Curtobacterium* i *Kineococcus* što potvrđuju i ranije studije sa metagenomskim pristupom na šljivi i ljuskama badema (Jo et al., 2015; McGarvey et al., 2015). Takođe, u manjem procentu su zabeleženi pripadnici rodova *Erwinia*, koji se karakteriše značajnim patogenima šljive (Végh et al., 2012), i *Weissella* čiji su predstavnici izolovani iz različitih izvora pa i iz biljaka (Fusco et al., 2015). Ranije metagenomske studije su potvrdile da je sastav zajednice mikroorganizama filofere donekle predvidljivog sastava i da postoje određeni broj dominantnih grupa uz prisustvo drugih manje zastupljenih članova (Vorholt et al., 2012).

Bogatstvo rodova i indeksi alfa diverziteta su pokazali da je na svim analiziranim sortama šljive bakterijska zajednica bila mnogo raznovrsnija u kasnoj fazi sazrevanja ploda. RDA i PCoA analize beta diverziteta su bile u pozitivnoj korelaciji ukazujući na to da je sastav autohtone bakterijske zajednice zavisio od fenološke faze u kojoj su bile ispitivane sorte šljive. U ranijim studijama je pokazan uticaj sezone na bogatstvo i diverzitet bakterijskih zajednica filofere (Rastogi et al., 2012; Penuelas et al., 2012; Haas et al., 2018). U kasnoj fenološkoj fazi su uzorci sa sve četiri sorte jasno grupisani sa rodnom *Methylobacterium*, koji je prema RDA analizi predstavljao glavnu diskriminatnu u njihovom klasterisanju. Vrste roda *Methylobacterium* su bakterije koje koriste metanol kao izvor ugljenika (Knief et al. 2012). Tokom sazrevanja ploda unutar tkiva se razgrađuje pektin u procesu dimetil esterifikacije i kao nusproizvod dobija se veća količina metanola (Dorokhov et al., 2018). Tokom jula plodovi šljive ulaze u proces sazrevanja i time čine

pogodnu sredinu za povećanu učestalost vrsta roda *Methylobacterium*. Predstavnici svih ostalih detektovanih rodova su imali malu zastupljenost u ukupnoj bakterijskoj zajednici ali je njihovo prisustvo ili odsustvo činilo finu razliku u strukturi zajednica različitih sorti i fenoloških faza. Rezultati ove studije ukazuju na to da sastav bakterijskih zajednica filofsfera šljive zavisi od genotipa sorte i sezone sazrevanja ploda. Snažan efekat ovih faktora na sastav bakterijskih zajednica tokom razvića ploda i lista kod različitih biljaka domaćina prepoznat je i ranije (Vorholt et al., 2012).

Uporedo sa metagenomskom analizom bakterijskog mikrobioma filofsfera šljive, primenom tradicionalnih metoda određen je i diverzitet kultivabilnih bakterija, iz istih uzoraka. Svi identifikovani izolati u radu su pripadali rodovima čiji se pripadnici tipično mogu detektovati u filosferi biljaka (Yashiro et al., 2011; Janisiewicz et al., 2013; Ottesen et al., 2016). Na svim analiziranim sortama šljive je detektovano dominantno prisustvo predstavnika roda *Pseudomonas*, od kojih su vrste *P. graminis* i *P. syringae* bile konstantni članovi kultivabilne bakterijske zajednice i verovatno predstavljaju tipične bakterije filofsfera šljive. Značajan patogen roda *Prunus*, *P. syringae* je detektovan na svim sortama šljive ukazujući na njegovu znatnu zastupljenost u voćnjaku. Najučestalija vrsta je bila *P. graminis* koja je inicijalno izolovana sa različitih vrsta trava, ali je detektovana i u filosferi jabuke (Behrendt et al., 1999; Mikicinski et al., 2016). S obzirom da je istraživanje sprovedeno u organskom voćnjaku na lokaciji koja je okružena prirodnim zajednicama različitih trava one mogu predstavljati potencijalni rezervoar *P. graminis* odakle se proširila po čitavom šljiviku. U studiji Janisiewicz et al. (2013) sprovedenoj u istraživačkoj stanici na Apalačkim planinama (Zapadna Virdžinija, SAD) na sortama Stenlej i Prezident, vrste rodova *Pseudomonas* i *Curtobacterium* su takođe identifikovane kao dominantne komponente mikrobioma plodova šljive. U toj studiji je vrsta *Curtobacterium flaccumfaciens* sa najvećim procentom zabeležena u ranoj fazi, dok je u našem radu njeno značajno prisustvo bilo detektovano samo u kasnoj fenološkoj fazi. Za *C. flaccumfaciens* je pokazano da ima potencijala za biokontrolu mrke truleži nektarina, ali ne i šljiva (Janisiewicz et al., 2013). *Pantoea agglomerans* je bila zastupljena u značajnijem procentu na svim sortama, u ranoj fazi uzorkovanja. Ova vrsta je poznata kao patogen različitih biljaka (Walterson et al., 2015), ali se neki sojevi koristi i kao efikasan biokontrolni agens

(Soto-Muñoz et al., 2015). Uzimajući u obzir i vrste drugih rodova, koje su izolovane sa Stenlej i Prezident sorti, postojale su razlike u bakterijskom diverzitetu u odnosu na lokalne sorte šljive analizirane u našem radu. Na sortama koje su analizirane u ovom radu su detektovani predstavnici rodova *Frigoribacterium*, *Fron dih abitans*, *Staphylococcus*, *Oerskovia*, *Rahnella*, *Terribacillus*, *Erwinia*, *Pseudarthrobacter*, *Bacillus* i *Micrococcus*, koji nisu izolovani sa Stenlej i Prezident sorti. Dve studije su sprovedene na različitim sortama šljive kao i na drugačijim geografskim područjima tako da su razlike u sastavu zajednica uprkos istoj vrsti biljke mogu upavo objasniti genotipom sorte šljive i geografskom pozicijom voćnjaka.

Pored diverziteta bakterijske zajednice ispitivan je i diverzitet gljiva u različitim fenološkim fazama zrenja ploda četiri sorte šljive. Metagenomskim pristupom je pokazano da je filozfera šljive naseljena bogatim zajednicama gljiva, sa velikim brojem različitih taksona. Sastav i diverzitet zajednica je, prema analizi alfa i beta diverziteta, varirao između sorti i vremena uzorkovanja. PCoA i RDA analize beta diverziteta su bile u pozitivnoj korelaciji sugerišući da autohtone zajednice gljiva zavise od sezone uzorkovanja na ispitivane četiri sorte šljive. Ovi rezultati su u skladu sa studijom Penuelas et al. (2012) u kojoj je pokazan veliki uticaj sezone na bogatstvo i diverzitet fungalnih zajednica na lišću drugih biljaka.

Kako bi se bolje razumeo sastav zajednica gljiva upoređene su relativne učestalosti predstavnika na nivou razdela, familije, roda i vrste. Zajednice gljiva svih uzoraka su bile dominatno naseljenje predstavnicima razdela Ascomycota bez obzira na vreme uzorkovanja, sem sorte Požegača gde su pripadnici razdela Ascomycota i Basidiomycota bili zastupljeni u gotovo istom procentu. Gljive razdela Ascomycota tipično dominiraju većinom zajednica gljiva (Vacher et al., 2016). Unutar razdela Ascomycota su bile najzastupljeniji pripadnici familije Mycosphaerellaceae i Dothioraceae, a zatim Sclerotiniaceae i Taphrinaceae. U sastavu pomenutih familija se nalaze i značajni patogeni koštuničavog voća (Cannon & Kirk, 2007).

Zajednice gljiva filozfere šljive su imale visoku zastupljenost kvasaca iz rodova *Aureobasidium* i *Cryptococcus*, naročito tokom rane fenološke faze. Njihovo visoka

zastupljenost je bila konstantna u obe faze zrenja na sorti Požegača i njihova visoka učestalost je najviše doprinela u razlikovanju od drugih analiziranih zajednica gljiva. Ranije studije sa kultivabilnim pristupom su registrovale prisustvo *Aureobasidium* spp. i *Cryptococcus* spp. tokom procesa sazrevanja nektarina i šljiva (Janisiewicz et al., 2010; Janisiewicz et al., 2014). Analiza filofsferi organski gajenih jagoda je pokazala da su vrste roda *Cryptococcus* bile najzastupljenije (Sylla et al., 2013) dok su na grožđu i listovima i cvetovima maslina *Aureobasidium* spp. bili jedan od najdominantnijih članova (Pinto et al., 2014; Abdelfattah et al., 2015). Vrste ovih rodova su poznate kao uspešni biokontrolni agensi protiv različitih bolesti voća koje nastupaju posle ubiranja plodova i neki od komercijalno zastupljenih biokontrolnih formulacija su zasnovani na njima (Janisiewicz et al., 2014). Najveću učestalost su imale *A. pullulans*, *C. victoriae* i *C. wieringae*, koje su ranije detektovane u analizi kultivabilne zajednice kvasaca na plodovima nektarina (Janisiewicz et al., 2010).

Za rod *Metschnikowia* je zabeležena visoka relativna učestalost vrsta u julu na sorti Ranka dok je na ostalim sortama ovaj rod bio zastupljen sa jako malim procentima predstavnika. To je u skladu sa ranijom studijom (Janisiewicz et al., 2014) u kojoj vrste *Metschnikowia* roda nisu izolovane sa šljive a samo povremeno su nalažene na nektarinama. Visoka zastupljenost vrsta roda *Metschnikowia* na sorti Ranka se može dovesti u vezu sa zrelijim plodovima od ostalih sorti u istoj fenološkoj fazi uzimajući u obzir da Ranka ima najranije vreme sazrevanja među analiziranim sortama. Tokom sazrevanja se sa mikrooštećenjima kutikule i omekšavanjem ploda povećava dostupnost nutrijenata što može objasniti dominaciju fermentativnih kvasaca roda *Metschnikowia* (Barata et al., 2012). *Metschnikowia pulcherrima*, *M. fructicola* i *M. andauensis* su dokazane kao biokontrolni agensi protiv patogena *P. digitatum*, *P. expansum* i *B. cinerea*, izazivača zelene, plave i sive truleži (Janisiewicz et al., 2001; Manso & Nunes, 2011).

Hanseniaspora uvarum je zabeležena samo u vreme sazrevanja ploda na sorti Lepotica. Ovaj kvasac je često izolovan sa zrelog voća, a naročito sa grožđa gde je okarakterisan kao sastavni deo fermentativnog mikrobioma (Albertin et al., 2016). U studiji Janisiewicz et al. (2014) ova vrsta je sa šljive izolovana u fazama sazrevanja ploda. Ovaj

.....

kvasac ima sposobnost da proizvodi isparljive tione, naročito 4-merkaptio-4-metil-2-pentanon, 3-merkaptioheksan-1-ol i 3-merkaptioheksil acetat, koji predstavljaju neke od najjačih aroma u sastavu alkoholnih pića (Dionísio et al., 2012). Pored vrsta roda *Hanseniaspora*, prepoznata je značajna uloga kvasaca rodova *Aureobasidium*, *Cryptococcus* i *Metschnikowia* u spontanoj alkoholnoj fermentaciji i u poboljšavanju sastava i ukusa alkoholnih pića (Gschaedler, 2017). Članovi mikrobijalne zajednice na plodu šljive su bitni za procese fermentacije tokom proizvodnje rakije i identifikacija kvasaca sa velikim procentom zastupljenosti u našim uzorcima su potvrdile da su analizirane sorte odlična osnova za proizvodnju visokokvalitetne šljivovice.

Mycosphaerella tumulosa je bila konstatno prisutna na svim sortama u obe faze uzorkovanja. Ovaj rod se karakteriše velikim brojem vrsta koje imaju različite ekološke i metaboličke strategije. Tu su endofiti, saprobi i simbionti, a takođe i fitopatogene vrste koje dovode do gubitaka biljne mase značajnih kultura širom sveta (Crous et al., 2001). *Mycosphaerella tumulosa* je u visokom procentu detektovana na analiziranim sortama, a ranije je zabeležena i na vrstama roda *Eucalyptus* u autohtonim šumama, bez patogenog efekta na domaćina (Carnegie et al., 2007). Kosmopolitski rodovi *Fusarium* i *Aspergillus*, sa vrstama *F. fujikuroi* i *A. flavus*, su detektovani u visokom procentu na Rodnoj u julu. Ove vrste su poznate kao proizvođači mikotoksina, pa je njihova detekcija na sorti Rodna značajna uzimajući u obzir da je ona najunosnija među sortama koje se gaje u Srbiji.

Ramichloridium ducassei je u visokom procentu zabeležena na sorti Lepotica. Prvi put je ovaj patogen okarakterisan na listu banane (Shivas et al., 2011). Takođe, *Botrytis caroliniana* detektovana na svim sortama, je novoizolovana vrsta sa kupine gde izaziva trulež ploda (Li et al., 2012). U našem radu su *R. ducassei* i *B. caroliniana* prvi put detektovane u filosferi šljive. Tokom rane fenološke faze, na sorti Ranka je zabeleženo povećano prisustvo značajnih patogena koštuničavog voća kao što su *Taphrina pruni*, *Sclerotinia sclerotiorum* i *Alternaria alternata*. Njihov procenat je značajno opao u julu kada je detektovano povećano prisustvo kvasaca roda *Metschnikowia* koji su dokazani kao biokontrolni agensi (Janisiewicz et al., 2001; Manso & Nunes, 2011). Ovaj podatak upućuje na to da mikrobiom filosofere šljive ima kapacitet da drži patogene pod kontrolom u

situaciji kada vremenski uslovi ne pogoduju značajnijem razvoju patogena, što je i bio slučaj date godine kada je uzorkovanje izvršeno.

Rod *Monilinia* sa predstavnikom *M. laxa* koji je detektovan u veoma malom procentu u ovoj metagenomskoj studiji, je i inače rod sa velikim brojem patogena šljive. Mali broj izolata (11) *Monilinia* spp. je uspešno kultivisan u dva perioda uzorkovanja, na sve četiri sorte. Mala učestalost ovog patogena se, kao što je već naglašeno, može objasniti meteorološkim uslovima koji nisu bili povoljni za razvoj vrsta roda *Monilinia*, s obzirom da je proleće i leto 2016. godine, kada je uzorkovanje sprovedeno, bila obeleženo visokim temperaturama i malim količinama padavina (RHMZ, 2017). U uslovima kada klimatski uslovi pogoduju razvoju *M. laxa* ona se razvija na koštuničavom voću i prouzrokuje velike gubitke u njihovom prinosu (Rungjindamai et al., 2014).

Sastav zajednica gljiva, kao i bakterija, se menjao tokom sezone sazrevanja plodova, što se može objasniti promenama u dostupnosti nutrijenata i razlikama u zastupljenosti izvora ugljenika i azota, kao i pH vrednosti tkiva. Mikrobiota biljaka se može znatno razlikovati u svom sastavu. Te razlike verovatno potiču od varijacija u metabolitima, fizičkih karakteristika i simbiotskih interakcija sa biljkom domaćinom i drugim mikroorganizmima koji naseljavaju površinu biljke (Vepštaitė-Monstavičė et al., 2018). Pored temporalnih promena sastava zajednica u ovom radu uočene su i razlike u zajednici gljiva zavisno od analizirane sorte šljive, što je ranije takođe uočeno u filozferi masline (Materatski et al., 2019).

Kultivabilni pristup u analizi sastava zajednica gljiva je pokazao veliku raznovrsnost filamentoznih gljiva i prisustvo velikog broja vrsta koji su patogeni koštuničavog voća. Kako je uzorkovanje sprovedeno u organskom voćnjaku, netretiranom pesticidima, značajan diverzitet patogena je bio očekivan. Detekcija vrste roda *Monilinia* kao najznačajnijeg patogena šljive, ukazuje na njenu prisutnost unutar voćnjaka i zove na oprez i spremnost za suzbijanje ovog patogena u godinama koje budu klimatski pogodovale značajnijem izbijanju infekcije. Pored *M. laxa*, zabeleženo je i prisustvo vrsta rodova *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Podosphaera*, *Rhizopus*, *Sclerotinia* i *Trichothecium*, izazivača buđi na velikom broju biljaka (Børve et al., 2007; Oh et al., 2014;

Castillo et al., 2017; Yin et al., 2017) kao i *A. alternata* sa širokim opsegom domaćina i prouzrokovačem pegavosti listova (Chung et al., 2012). Rod sa najvećom raznovrсноšću u kultivabilnoj zajednici gljiva je bio *Fusarium* sa velikim brojem identifikovanih vrsta. To je kosmopolitski rod koji obuhvata saprobe, endofite i brojne patogene. Domaćini su im uglavnom pšenica i druge vrste žitarica, iako *F. avenaceum* može izazvati i trulež ploda jabuke (Lysøe et al., 2014) za sada ne postoje literaturni podaci o fuzariozama šljive. Zabeleženo je i prisustva vrste roda *Nigrospora*, tj. roda sa kosmopolitskim rasprostranjenjem čije su vrste izolovane sa veoma različitih biljnih supstrata (Wang et al., 2017). Na nivou vrste su determinisane i dva značajna patogena šljive sa nešto manjom rasprostranjenošću među analiziranim sortama: *Stigmia carpophila*, patogen koštuničavog voća koji izaziva šupljikavost listova (Bubici et al., 2010) i *Polystigma rubrum* koja izaziva crvenu pegavost lista šljive, bolest poznatu u narodu i kao plamenjača (Glišić et al., 2016). U studiji Molnár et al. (2018) je utvrđena visoka osetljivost sorte Lepotica na *P. rubrum* i upravo je ona i detektovana na sorti Lepotica u ovom radu. Pored filamentoznih gljiva detektovano je i prisustvo kvasaca *A. pullulans*, *Sporobolomyces roseum* i *M. pulcherrima*. Kao što je ranije navedeno, *M. pulcherrima* je dokazana kao biokontrolni agens na različitim patogenima (Janisiewicz et al., 2001), dok je *A. pullulans* efikasan biokontrolni agens za suzbijanje *M. laxa*, *B. cinerea* i *P. expansum* (Zhang et al., 2010). Za *S. roseus* je pokazano da je borba za nutrijente mehanizam kojim sprečava germinaciju konidija *B. cinerea* (Filonow, 1998). Detektovane vrste kvasaca, već potvrđene kao uspešni biokontrolni agensi, sugerišu da je filofsfera šljive dobra osnova u potrazi za antagonistima aktivnim protiv patogenih gljiva.

Formiranjem kolekcije izolata gljiva sa 4 sorte šljive napravljena je baza različitih patogena među kojima su za dalje istraživanje odabrani izolati sa morfološkim karakteristikama roda *Monilinia*, izazivača mrke truleži, poznate kao najrazornije bolesti koštuničavog voća. U Srbiji je *M. laxa* zastupljena sa čak 89% u voćnjacima zahvaćenim mrkom truleži (Hrustić et al., 2015). Ukupno 11 izolata sa odgovarajućim morfološkim karakteristikama *M. laxa* je izolovano sa 4 sorte šljive u dva perioda uzorkovanja. Pored morfološke identifikacije, *M. laxa* je identifikovana i umnožavanjem i sekvenciranjem ITS regiona. Nakon utvrđivanja filogenetskih odnosa, svi izolati su identifikovani kao *M. laxa*.

Za vrste roda *Monilinia*, ITS region je veoma konzervisan i postoji svega nekoliko nukleotida razlike između vrsta, ali je to dovoljno diskriminatorsno da se razlikuju vrste *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* (Hrustić et al., 2015).

Nakon uvida u raznovrsnost mikrobijalnih zajednica, formiranja i identifikacije kultivabilne kolekcije bakterija i gljiva filofsfera četiri sorte šljive, izdvojeni su izolati koji su potencijalni patogeni i antagonisti. Sledeća faza istraživanja je obuhvatila testiranje potencijalnih patogena na sposobnost da izazovu nekroze. Odabrani su izolati *Erwinia persicina*, *Clavibacter michiganensis* i *Rhizobium nepotum* kao poznati fitopatogeni. Na osnovu testa hipersenzitivnosti na listu duvana su među izolatima *Pseudomonas* spp. odabrana tri najagresivnija izolata za dalje testiranje patogenosti. Najintenzivnije simptome su izazvali izolati *P. syringae* ČL2/2 i P7/16_2. *Pseudomonas syringae* je jedan od najvažnijih patogena koštuničavog voća koji izaziva bakterijski rak dovodeći do značajnih gubitaka u njihovoj proizvodnji (Hulin et al., 2018). Može izazvati značajne probleme kada bolest uznapreduje i dovesti do uklanjanja čitavog voćnjaka zbog stepena zaraženosti stabala (Wenneker et al., 2012). U Srbiji je zabeleženo da *P. syringae* dovodi do sušenja grana na sortama Lepotica i Rodna uz izumiranje stabla zbog pojava nekroza koje sprečavaju protok hranljivih materija (Gavrilović, 2009). *Pseudomonas congelans* je takođe imao značajni intenzitet virulencije koji je, iako slab nakon 48 časova, dostigao podjednak efekat izolata *P. syringae* nakon 96 časova inkubacije. Ne postoje podaci o patogenosti ove vrste, ali *P. congelans* se svrstava u filogenetsku grupu sa patogenom *P. syringae* i genetički su veoma slični (Dillon et al., 2019). Potencijal da izazove nekroze na listovima šljive ukazuje da je *P. congelans* verovatno deo patobioma šljive i nameće se kao nova vrsta na listi patogena roda *Pseudomonas*. Ostali testirani izolati su imali značajno manji intenzitet virulencije ili je on odsustvovao, kao u slučaju izolata *C. michiganensis* R3/1. Domaćin vrste *E. persicina* su različite mahunarke (Zhang & Nan, 2014), ali je u ovom radu pokazano da izolat ČL3/16_1 može da izazove nekroze na listovima Lepotice i Ranke. *Rhizobium nepotum* je izazivač gala na listovima i detektovan je na šljivi i drugim vrstama roda *Prunus* (Pulawska et al., 2016). Uočen je različit odgovor sorti na prisustvo *R. nepotum* gde je samo Lepotica bila rezistentna dok su ostale tri sorte bile osetljive. Različita osetljivost sorti verovatno potiče od razlika u njihovom genotipu.

Pored utvrđivanja stepena patogenosti bakterijskih izolata, testirana je i sposobnost autohtonih izolata *M. laxa* da izazovu tipične simptome mrke truleži ploda na sortama Čačanska rodna i Požegača. Uočene razlike u stepenu patogenosti izolata na dve sorte šljive se mogu objasniti različitim genotipom sorte šljive što je dalje uticalo na veću rezistenciju sorte Čačanska rodna. Utvrđeno je da genotip biljke domaćina može uticati na stepen patogenosti gljiva (Sacristan & Garcia-Arenal, 2008). Sva tri izolata *M. laxa* izolovana sa šljive su pokazala značajan procenat patogenosti uprkos razlikama na testiranim sortama šljive što sugeriše da se prirodni izolati mogu proširiti po voćnjaku i napraviti značajnu štetu.

Formiranjem kolekcije izolata bakterija i kvasaca postavljena je osnova za testiranje antibakterijskog potencijala na odabranim autohtonim fitopatogenim izolatima na kojima su sprovedeni skrining testovi. Skriningom 50 bakterijskih izolata i 5 kvasaca je izdvojen izolat R3/3 sa snažnom antibakterijskom aktivnošću protiv autohtonih bakterijskih patogena, tri referentna soja i četiri izolata *E. amylovora* poreklom sa dunje. Za karakterizaciju ovog izolata sekvence gena za 16S rRNK i *tuf* nisu bile dovoljno diskriminatorne da ga razdvoje unutar *B. cereus* grupe. Karakterizacija izolata koji pripadaju *B. cereus* grupi je diskutabilna, pa su za izolat R3/3 upotrebljena dva dodatna „housekeeping” gena, *pycA* i *ccpA* koja su prema Liu et al. (2015) predložena za brzu identifikaciju izolata unutar *B. cereus* grupe. Na osnovu konkatemera sastavljenog od sekvenci gena za 16S rRNK, *tuf*, *pycA* i *ccpA* gena, urađena je analiza koja je na filogenetskom stablu pozicionirala izolat R3/3 zajedno sa vrstom *B. thuringiensis*.

S obzirom da je detektovana značajna aktivnost na širok spektar fitopatogenih bakterija, sledeći korak je uključivao ispitivanje mehanizama antagonističkog potencijala soja *B. thuringiensis* R3/3. Unutar mikrobijalne zajednice interakcije se često odvijaju u veoma konkurentnom okruženju sa konstantnom borbom za resurse. Za izolate se smatra da su kompetitivni ako, između ostalog, produkuju antibiotike, siderofore, inhibiraju QS ili luče egzoenzime pomoću kojih se smanjuje preživljavanje kompetitorskog soja (Bauer et al., 2018). Testiranjem genetičkog potencijala utvrđeno je da *B. thuringiensis* R3/3 ne poseduje gene odgovorne za biosintezu antibiotika cvitermicina A i lipopeptidnih

antibiotika (osim kurstakina), a poseduje gen uključen u biosintezu N-acil homoserin laktonaze (*aiiA* gen). Pretpostavlja se da fitopatogene pseudomonade i drugi predstavnici klase γ -Proteobacteria koje proizvode AHL enzime, koriste QS kao mehanizam preživljavanja u filozferi, sredini sa malom dostupnošću nutrijenata (Müller & Ruppel, 2014). Upravo bakterije koje imaju sposobnost utišavanja QS bi mogle da se koriste za suzbijanje patogena u filozferi raznih biljnih kultura. Značajan patogen i izazivač bakterioznog raka šljive, *P. syringae* koristi mehanizam QS za ekspresiju egzopolisaharida i drugih faktora virulencije (Quiñones et al., 2005). Pored utvrđivanja genetičkog potencijala za proizvodnju AHL enzima, potvrđena je i *in vitro* sposobnost supernatanta *B. thuringiensis* R3/3 da inhibira QS, u testu degradacije signalnih AHL molekula. Jose et al. (2019) su potvrdili da supernatanti nekoliko izolata *Bacillus* spp. imaju sposobnost da inhibiraju mehanizme odgovorne za patogenost *P. syringae* pv. *passiflorae* koji su regulisani QS, kao što su pokretljivost, produkcija piocijanina i formiranje biofilma. Takođe, izolati roda *Bacillus* koji produkuju AHL su, u istoj studiji, sprečili hipersenzitivnu reakciju duvana na *P. syringae* sugerišući da se *in planta* može efikasno delovati na virulentnost ovog značajnog patogena kroz utišavanje QS.

Pored inhibicije QS, *B. thuringiensis* R3/3 je demonstrirao sposobnost produkcije egzoenzima (amilaza, proteinaza, mananaza, ksilanaza i endohitinaza), što je jedan od mehanizama kompeticije i antagonizma. Površina biljaka je siromašna nutrijentima i smatra se oligotrofnom sredinom pa su patogeni i antagonisti u žestokoj kompeticiji kako bi obezbedili uslove za efikasnu kolonizaciju biljke domaćina (Shafi et al., 2017). Pored produkcije enzima, *B. thuringiensis* R3/3 je pokazao da ima sposobnost da toleriše uslove suše. Filozfera je sredina koja je, pored ograničenja u količini nutrijenata, izložena i raznim ekstremnim uslovima kao što su visoka UV radijacija, visoke temperature i niska dostupnost vode (Müller & Ruppel, 2014). Mikrobijalne zajednice adaptirane na sušu mogu imati pozitivno dejstvo na preživljavanje biljke u stresnim uslovima koji nastaju sa nedostupnošću vode (Lau & Lennon, 2012). Pored sposobnosti produkcije egzoenzima na odgovarajućim podlogama, potvrđen je i genetički potencijal izolata *B. thuringiensis* R3/3 da produkuje endohitinaze. Hitinaze su enzimi koji hidrolizuju hitin, glavnu komponentu egzoskeleta insekata i ćelijskog zida gljiva. One se koriste kao biokontrolni agensi za veliki

broj patogenih gljiva i kao sinergistički agens u povećavanju entomotoksičnosti biopesticida (Djenane et al., 2017).

Nakon karakterizacije *B. thuringiensis* R3/3, uz poznavanje činjenice da je antimikrobna aktivnost izolata *in vitro* detektovana samo kada je primenjena puna kultura, ali ne i supernatant, testiran je u uslovima ko-kultivacije sa patogenima. U ovim eksperimentima je pokazana njegova sposobnost da suzbije populaciju fitopatogena, istovremeno održavajući svoju populaciju stabilnom. Tokom ko-kultivacije dva ili više mikroorganizama mogu se aktivirati neki od biohemijskih puteva čime se povećava produkcija konstitutivno eksprimiranih jedinjenja ili se akumuliraju kriptična jedinjenja koja nisu bila prisutna u čistoj kulturi (Wakefield et al., 2017). Rezultati ko-kultivacije sugerišu da je i za *B. thuringiensis* R3/3 neophodno da raste zajedno sa patogenom kako bi ispoljio svoju antagonističku aktivnost. Za aktivaciju biohemijskih puteva je nekada neophodno prisustvo drugog mikroorganizma, kada se kroz međucelijsku interakciju aktiviraju metabolički putevi koji u drugim slučajevima ostaju utišani (Bertrand et al. 2014). U studiji Trischman et al. (2004) je kod *B. thuringiensis* izolata pokazano da je znatno povećana proizvodnja indola i diketopiperazina kada je bio u kompeticiji sa izolatom *B. megatherium*. U uslovima aksenične kulture ovi antibiotici su bili na minimumu detekcije.

Pored ispitivanja antibakterijskog potencijala zajednice filosfere šljive, ispitan je i *in vitro* antifungalni efekat na najznačajnijem fungalnom patogenu koštuničavog voća, *M. laxa*. Cilj daljeg toka istraživanja je podrazumevao da se među bakterijskom zajednicom i izolatima kvasaca nađe potencijalni autohtoni biokontrolni agens koji bi efikasno kontrolisao mrku trulež na plodovima šljive. Inicijalni skrining je ukazao na sposobnost određenog broja izolata bakterija i kvasaca da kontaktno inhibiraju rast micelije *M. laxa*. Bakterijski izolat P4/16_1, koji je sa preko 80% inhibirao rast *M. laxa* izabran je za dalje istraživanje. Skrining potencijalnih mehanizama odgovornih za antagonizam izolata P4/16_1 započet je ispitivanjem sposobnosti produkcije isparljivih organskih jedinjenja. Zabeležena je umerena antifungalna aktivnost na *M. laxa*. Ranije studije su utvrdile da isparljiva jedinjenja fluorescentnih pseudomonada imaju antifungalnu aktivnost na *S.*

sclerotiorum i *B. cinerea* (Hernández-León et al., 2015; Giorgio et al., 2015). Pored antifungalne aktivnosti, izolat P4/16_1 je pokazao potencijal za preživljavanje u uslovima suše kao i sposobnost produkcija siderofora. Kao što je ranije pomenuto, filofsfera je životna sredina sa dosta stresnih faktora među kojima je i nedostatak vode pa je sposobnost preživljavanja u uslovima suše osobina koja je poželjna u mikrobiomu filofsferi. Iako su mikroorganizmi rizosfere najveći izvor gvožđa za biljku, sve je više podataka da i mikroorganizmi filofsferi mogu pomoću siderofora da doprinesu usvajanju ovog elementa (Carvalho & Castillo, 2018). Mikroorganizmi koji produkuju siderofore se mogu koristiti za kontrolu fitopatogena kako sugerise istraživanje u kome je pokazano da soj *P. syringae* pv. *syringae* može da suzbije *P. syringae* pv. *glycinea* upravo kroz upotrebu siderofora i kompeticiju za gvožđe (Wensing et al., 2010).

Za identifikaciju izolata P4/16_1 je pored sekvence gena za 16S rRNK uključena i sekvenca *gyrB* gena. Filogenetska analiza konkatemernih sekvenci je identifikovala ovaj izolat kao *Pseudomonas synxantha*. Nakon karakterizacije, naredni korak je bio identifikacija aktivnih jedinjenja koje ovaj soj produkuje. Vrste roda *Pseudomonas* su poznate kao producent širokog spektra antimikrobnih jedinjenja kao što su pioluteorin, fenazini, ciklični lipopeptidi i 2,4-diacetilfloroglukinol (DAPG) (Müller et al., 2016). *Pseudomonas synxantha* P4/16_1 je u *in vitro* uslovima na PDA podlozi formirao tamnozeleno kristala na površini kolonija što se prema Parejko et al. (2012) smatra pozitivnim rezultatom na produkciju fenazin-1-karboksilne kiseline, pa je u daljem toku istraživanja fokus bio na fenazinima. *Pseudomonas synxantha* spada u grupu fluorescentnih pseudomonada koje su poznate kao proizvođači fenazina sa izrazitom antifungalnom aktivnošću širokog spektra, kao što su PCA, 2-hidroksifenazin, piocijanin i fenazin karboksamid (Chin-A-Woeng et al., 2003; Mavrodi, 2006). PCR skrining na produkciju antibiotika je potvrdio da *P. synxantha* ima genetički potencijal da sintetiše fenazin-1-karboksilnu kiselinu. Uzimajući u obzir da su uočeni tamnozeleni kristali u PCA testu i rezultate PCR skrininga, urađena je benzenova ekstrakcija fenazinskih jedinjenja iz kulture *P. synxantha* P4/16_1 gajene u siromašnom medijumu sa mineralnim solima. Benzenov ekstrakt je pokazao značajan procenat inhibicije *M. laxa in vitro*, ali je taj efekat bio manji nego što je zabeleženo kada je testirana puna kultura. To sugerise da je antifungalna

aktivnost *P. synxantha* P4/16_1 verovatno posledica sinergizma benzenove frakcije i isparljivih organskih jedinjenja. Slični rezultati su potvrđeni u studiji Aiello et al. (2019) gde su supernatant i isparljiva jedinjenja imali manju aktivnost pojedinačno u odnosu na punu kulturu *P. synxantha*.

Razlike u efektu pune kulture u odnosu na benzenov ekstrakt *P. synxantha* P4/16_1 su potvrđene i korišćenjem svetlosnog i elektronskog skenirajućeg mikroskopa. Uočene su izraženije promene u morfologiji hifa *M. laxa* u prisustvu pune kulture *P. synxantha* P4/16_1 u odnosu na promene nastale pod uticajem benzenovog ekstrakta. U dualnoj kulturi je bila uočljiva pojava melanizacije ćelijskog zida hifa koja je izostala u tretmanu sa benzenovim ekstraktom. Pošto nije postojao direktni kontakt između bakterije i kolonije *M. laxa* tokom ko-kultivacije na Petrijevoj šolji, uočena melanizacija je verovatno posledica rastvorljivih jedinjenja koja su difundovala kroz podlogu do kulture, pre nego da je to bio slučaj sa jedinjenjima iz benzenove frakcije. Pojava difuzije melanina u hranjivu podlogu ili melanizacija hifa su zabeleženi u istraživanjima Machado et al. (2010a, b) u dualnoj kulturi *B. subtilis* sa *A. niger*, *A. alternata* i *Fonsecaea pedrosoi* i Frases et al. (2007) nakon dualne kultivacije *C. neoformans* i *Klebsiella aerogenes*. Pojava melanizacije hifa *M. laxa* je tipičan odgovor na stresne uslove sredine koji su uglavnom izazvani različitim faktorima: antagonizmom, mehanizmima odbrane domaćina, hidrolitičkim enzimima i oksidativnim radikalima (Fogarty & Tobin, 1996; Henson et al., 1999; Nosanchuck & Casadevall, 2003). Melanizaciju kod gljiva može indukovati homogentisna kiselina koja predstavlja jedan od intermedijera u bakterijskom katabolizmu fenilalanina (Frases et al., 2007).

Sirov benzenov ekstrakt soja *P. synxantha* P4/16_1 je, takođe, ispoljio i znatnu antibakterijsku aktivnost na referentnim sojevima *X. campestris*, *P. syringae*, a naročito na *E. amylovora*. Antibakterijska aktivnost ekstrakta na *E. amylovora* je izuzetno značajna jer je ovaj patogen često detektovan na koštuničavom voću izazivajući bakterioznu plamenjaču. Mézaache Aichour et al. (2013) su takođe utvrdili da sirov benzenov ekstrakt *P. chlororaphis* ima, pored antifungalne aktivnosti, i široki spektar antibakterijske aktivnosti na gram-pozitivne i gram-negativne bakterije. Poznata je antibakterijska aktivnost različitih fenazina kao što su fenazin karboksamid (Shanmugaiah et al., 2010),

piocijanin (Guttenberger et al., 2017) i drugi. Za potpuniju karakterizaciju antibakterijskih komponenti benzenovog ekstrakta *P. synxantha* P4/16_1 je neophodno prečišćavanje ekstrakta i izolacija pojedinačnih jedinjenja koja bi dalje bila karakterisana primenom više analitičkih metoda, kao što su HPTLC metode kuplovane masenom spektrometrijom i napredne metode strukturne analize, pre svega NMR spektroskopija.

Na osnovu hemijske analize utvrđeno je prisustvo izomera hidroksibenzoeve kiseline (2- i 4-hidroksibenzoeva kiseline). Salicilna kiselina (2-hidroksibenzoeva kiselina) je antimikrobni agens aktivan protiv širokog spektra gljiva (Panahirad et al., 2013; El-Mohamedy et al., 2013; Da Rocha Neto et al., 2015). U studiji Amborabe et al. (2002) je pokazana antifungalna aktivnost različitih derivata benzoeve kiseline na patogena *Eutypa lata*. Sa hromatograma se mogu očitati i signali koji odgovaraju neidentifikovanim jedinjenjima u sirovom benzenovom ekstraktu i ova jedinjenja su potencijalno doprinela antifugalnoj aktivnosti ekstrakta. Njihova identifikacija nije bila moguća jer su dobijeni neuobičajeni HRMS podaci koji ukazuju na povećani broj azotovih atoma, a i nedostatak literaturnih podataka je razlog da ova jedinjenja za sada ostanu neidentifikovana. Prema podacima navedenim u Tabeli 6, može se pretpostaviti da su jedinjenja **9** i **10** strukturni izomeri jer oba jedinjenja daju signale sa istom identifikovanom HRMS masom, a iz toga i istu bruto formulu $[M-H]^-$ jona. Takođe, daju isti MS^2 osnovni pik na 180 m/z i fragmentacioni jon na 181 m/z . Na osnovu ovih podataka može se pretpostaviti da jedinjenja **8-10** u svom sastavu imaju fenazinski heterociklični sistem (molekulska masa fenazina iznosi 180 Da). Za identifikaciju jedinjenja **8-10** neophodna je preparativna izolacija i karakterizacija korišćenjem dodatnih tehnika karakterizacije, pre svega naprednim NMR metodama. HPLC-MS analiza je sprovedena pod baznim uslovima gde je verovatno izvršena dekarboksilacija fenazin-1-karboksilne kiseline. Iako prisustvo fenazin-1-karboksilne kiseline nije detektovano u navedenoj hemijskoj analizi, u ovoj studiji je potvrđen genetički potencijal za biosintezu PCA tako što je u PCR reakciji umnožen kodirajući gen.

Nakon *in vitro* karakterizacije antagonista *B. thuringiensis* R3/3 i *P. synxantha* P4/16_1 testiran je njihov potencijal da na plodovima šljive suzbiju rast *M. laxa*. Iako *B.*

thuringiensis R3/3 nije ispoljio antifungalnu aktivnost *in vitro* u uslovima dualne kulture, u PCR skriningu je potvrđeno da je izolat imao potencijal da produkuje endohitinaze pa je izabran za biokontrolni esej. Na plodu šljive je izostala antifungalna aktivnost pune kulture *B. thuringiensis* R3/3 na *M. laxa*. Utvrđeno je da kod izolata *Bacillus* spp. hitinaze imaju značajan antifungalni efekat, ali često za pun potencijal izolata je neophodno da oni proizvode i endo- i egzohitinaze ili dodatna aktivna jedinjenja (Djenane et al., 2017). Nanošenjem *P. synxantha* P4/16_1 kao bakterijske suspenzije nije ostvarena antifungalna aktivnost na *M. laxa* na plodu Požegače i Ranke, iako je prethodno utvrđena *in vitro* aktivnost. Odsustvo aktivnosti se može objasniti razlikama u *in vitro* i *ex situ* testovima. U *in vitro* uslovima se bakteriji dozvoljava da u dovoljnom vremenskom periodu u podlogu sekretuje aktivne molekule i da u zatvorenoj atmosferi Petrijeve šolje u koncentrisanom obliku produkuje isparljive organske supstance što je nemoguće postići u *ex situ* uslovima. Međutim, benzenov ekstrakt dobijen iz *P. synxantha* P4/16_1 je na sorti Ranka sa 100% efikasnosti inhibirao rast micelije *M. laxa*, dok je na sorti Požegača takav efekat u potpunosti izostao. Efikasnost benzenovog ekstrakta u prvom slučaju se možda može pojasniti interakcijom ekstrakta i samog fitohemijskog sastava ploda Ranke, kao i većoj otpornosti same sorte koja je bila vidljiva u kontroli sa patogenom gde su lezije izazvane *M. laxa* zahvatale manji procenat ploda u odnosu na Požegaču. Postoje brojni mehanizmi rezistencije koji se aktiviraju kod plodova u uslovima nakon ubiranja (Sandoval-Chávez et al., 2014) sa kojima je ekstrakt mogao potencijalno stupiti u interakciju. Za pojašnjenje razlika u efektu ekstrakta na sortama Ranka i Požegača bi se morali sprovesti dodatni testovi kako bi se utvrdila njihova osnova.

Ovo je prvo istraživanje autohtonih zajednica gljiva filofere *P. domestica* na osnovu metagenomskog pristupa i prva studija o bakterijskim zajednicama na Illumina platformi. Istovremeno ovaj rad je dao i prve rezultate o zajednicama mikroorganizama na lokalnim sortama šljive. Uočen je veliki diverzitet kvasaca rodova *Aureobasidium* i *Cryptococcus* na svim sortama. Kultivabilni pristup je ukazao na veliki diverzitet značajnih patogena šljive na svim ispitivanim sortama. Analiza ukupnog diverziteta bakterijskih zajednica filofere je ukazala da su one dominantno naseljene vrstama rodova *Methylobacterium*, *Sphingomonas* i *Hymenobacter*. Kultivabilni pristup je istaknuo *P.*

syringae i *P. graminis* kao verovatno rezidentne vrste u zajednici filofsere šljive. Na osnovu podataka o rodovima zabeleženih vrsta, primećeno je da postoje razlike u njihovoj pojavi na sortama i u fenološkim fazama, što sugerise da sorta biljke i sezona rasta doprinose strukturi zajednice mikroorganizama filofsere šljive.

Podaci dobijeni metagenomskom analizom diverziteta filofsere šljive su obezbedili veoma značajne informacije o prisustvu patogena u mikrobiomu i mogu pomoći u razvoju odgovarajućih mera zaštite. U ovom radu je pokušano da se ide u korak sa potrebom za zamenom hemijskih pesticida ili smanjenjem njihove upotrebe tako što su u odgovarajućim testovima skrininga iz kultivabilne zajednice izdvojeni kandidati za upotrebu u biokontroli kao alternativnom pristupu u zaštiti poljoprivrednih kultura. Polazna osnova ovog istraživanja, da je filofsfera biljke najbolji izvor antagonista za fitopatogene, je potvrđena izolovanjem dva efikasna bakterijska izolata. U godinama kada klimatski uslovi pogoduju značajnijem razvoju patogena i kada mikrobiom filofsere izgubi svoju inherentnu sposobnost kontrole brojnosti patogena, tretiranje filofsere efikasnim biokontrolnim sojevima može predstavljati uspešnu strategiju za suzbijanje simptoma bolesti. Ovakav *in vivo* eksperiment predstavlja jedan od ciljeva budućih istraživanja na ovu temu.

Izolat *B. thuringiensis* R3/3, poreklom sa sorte Ranka, je pokazao antibakterijsku aktivnost na *P. syringae*, *E. amylovora* i *X. campestris*, značajne bakterijske patogene šljive. Sposobnost produkcije egzoenzima, preživljavanje uslova suše, redukcija populacije patogenih bakterija u ko-kulturi, održavanje rasta konstantnim u prisustvu fitopatogena i utišavanje QS preporučuju izolat *B. thuringiensis* R3/3 za ispitivanje na sposobnost biokontrole izazivača različitih bakterioza šljive *in vivo*, naročito bakterioznog raka izazvanog *P. syringae*. Buduća istraživanja na izolatu *B. thuringiensis* R3/3 bi podrazumevala i detekciju kriptičnih jedinjenja koja se potencijalno produkuju tokom ko-kultivacije sa fitopatogenima. Uzimajući u obzir da je zabeležena izuzetna zahvaćenost sorte Požegača biljnim vašima koje mogu naneti veliku štetu na listovima šljive, izolat *B. thuringiensis* R3/3 sa potencijalnom za proizvodnju egzohitinaza se takođe može ispitati i na insekticidnu aktivnost protiv ovih značajnih štetočina. Različiti mehanizmi delovanja

čine ovaj izolat dobrim kandidatom za testiranje u budućim ogledima u voćnjaku za biokontrolu fitopatogenih bakterija i parazitskih insekata na šljivama.

Drugi značajni izolat, poreklom iz filofsere sorte Požegača, *P. synxantha* P4/16_1 je pokazao antagonističku aktivnost kroz produkciju rastvorljivih antifungalnih jedinjenja i isparljivih organskih jedinjenja sa antifungalnom aktivnošću na izazivača mrke truleži. Sirovi benzenov ekstrakt je pokazao izuzetan potencijal u biokontroli *M. laxa* na autohtonij sorti Ranka što ga čini dobrim kandidatom za dalju karakterizaciju aktivnih komponenti. Pored antifungalne aktivnosti, *P. synxantha* P4/16_1 je pokazao i produkciju siderofora, otpornost na uslove suše i sposobnost produkcije antibakterijskih jedinjenja. Produkcija siderofora ga preporučuje za dalje ispitivanje i na sposobnost bioremedijacije, jer ovi molekuli pored gvožđa, mogu da vezuju i druge metale. Sve navedeno ga čini dobrim kandidatom da bude testiran kao biokontrolni agens. U poljoprivredi se biokontrolni agensi koriste za suzbijanje bolesti izazvanih gljivama i bakterijama, ali je dostupno malo informacija o njihovom uticaju na mikrobiotu biljaka koje su njima tretirane. Buduće istraživanje bi podrazumevalo da se tretira filofsfera šljive u ranoj i u kasnoj fenološkoj fazi razvoja ploda sa *P. synxantha* P4/16_1 i da se uporedi mikrobiota tretirane i netretirane filofsere kako bi se odredilo da li je došlo do promena u sastavu zajednica, naročito *M. laxa*.

6. ZAKLJUČCI

6. ZAKLJUČCI

1. Sekvenciranjem regiona V1-V3 gena za 16S rRNK iz 8 analiziranih uzoraka, utvrđeno je da je ukupan broj bakterijskih OTU-a bio 7 951 u maju i 10 848 u julu. Analiza alfa diverziteta je pokazala da su bogatstvo rodova i diverzitet bakterijskih zajednica bili veći u fazi sazrevanja ploda (juli) na svim analiziranim sortama šljive, sem Rodne koja je imala konstantan diverzitet u obe analizirane fenološke faze. Poređenjem diverziteta između uzoraka utvrđeno je da je sastav autohtone bakterijske zajednice zavisio od fenološke faze u kojoj su bile ispitivane sorte šljive.

2. Analizom relativne učestalosti pripadnika 16 identifikovanih razdela utvrđeno je da su predstavnici razdela Proteobacteria bili najzastupljeniji na svim sortama i u svim fenološkim fazama (RA 69-92%). Predstavnici razdela Bacteroidetes i Actinobacteria su bili zastupljeni sa preko 2% dok su preostali razdeli imali predstavnike sa znatno manjim udelom u ukupnoj zajednici.

3. Analizom relativne učestalosti predstavnika 142 detektovana roda u maju je uočena dominacija vrsta roda *Pseudomonas* na Lepotici (76%), *Buchnera* na Požegači (43%) i *Hymenobacter* na Rodnoj (30%) i Ranki (26%). *Methylobacterium* vrste su dominirale na svim sortama u julu, sem na Požegači gde su predstavnici roda *Sphingomonas* bili najzastupljeniji.

4. Tradicionalnim kultivabilnim pristupom u kombinaciji sa molekularnom identifikacijom utvrđeno je prisustvo 32 vrste bakterija iz 17 rodova. Kao rodovi sa najvećim brojem vrsta na svim sortama su se izdvojili *Pseudomonas* (42%), *Sphingomonas* (13%) i *Pantoea* (8%). Detektovano je konstantno prisustvo *Pseudomonas graminis* i *Pseudomonas syringae* na svim sortama i u obe fenološke faze razvića ploda.

5. Ispitivanjem ukupne zajednice gljiva je, na osnovu sekvenci ITS2 regiona DNK i analizom reprezentativnih OTU jedinica, utvrđeno da je ukupan broj OTU-a iznosio 2 310 u maju i 3 363 u julu. Broj jedinstvenih OTU-a se razlikovao između sorti tako da je kod Rodne, Lepotice i Ranke njihov broj porastao, dok je kod sorte Rodna opao u fazi zrenja ploda (juli).

6. Analizom alfa diverziteta je detektovano veće bogatstvo rodova i diverzitet zajednice u fazi zrenja ploda (juli) u odnosu na ranu fazu razvića ploda (maj) za sve analizirane sorte. Analize beta diverziteta su pokazale da autohtone zajednice gljiva na ispitivane četiri sorte šljive zavise od sezone uzorkovanja. Na osnovu prisustva vrsta iz rodova *Cryptococcus* i *Aureobasidium* Požegača je u obe fenološke faze razdvojena od ostale tri analizirane sorte.

7. Gljive iz razdela Ascomycota su bile najzastupljenije u svim analiziranim uzorcima (46% do 89%). Gljive iz razdela Basidiomycota su imale manju učestalost (10% do 23%) na analiziranim sortama, sem na Požegači gde su u obe fenološke faze detektovane u visokom procentu (53% u maju i 43% u julu).

8. Od 217 rodova gljiva samo su 24 roda imala predstavnike sa RA preko 2%. U maju je utvrđena dominantnost vrsta iz rodova *Aureobasidium* i *Cryptococcus* na svim sortama, dok je u julu postojala razlika u dominantnim predstavnicima rodova. Vrste iz rodova *Monilinia*, *Cladosporium* i *Penicillium* kao najznačajniji patogeni šljive bile su zastupljene sa manje od 0,1%.

9. Na svim sortama su najzastupljenije vrste gljiva bile: *Aureobasidium pullulans*, *Mycosphaerella tumulosa* i *Didymella phacae* unutar razdela Ascomycota. Rod *Cryptococcus* je sa 14 vrsta bio najraznovrsniji u okviru razdela Basidiomycota, naročito na sorti Požegača.

10. Tradicionalnim kultivabilnim pristupom identifikovano je 38 vrsta gljiva iz 29 rodova od kojih je 12 vrsta pripadalo rodu *Fusarium*. U svim analiziranim fenološkim fazama i sa svih sorti su izolovani predstavnici rodova *Aspergillus*, *Alternaria*, *Monilinia*, *Penicillium*, *Rhizopus* i *Trichothecium*. Za izolovane kvasce je utvrđeno da pripadaju vrstama *Aureobasidium pullulans*, *Sporobolomyces roseus* i *Metschnikowia pulcherrima*.

11. Na osnovu morfoloških karakteristika kultivirano je 11 izolata roda *Monilinia* koji su na osnovu sekvence za ITS1 i ITS2 regione identifikovani kao *M. laxa*. U *ex situ* testu patogenosti tri izolata *M. laxa* na plodovima sorti Čačanska rodna i Požegača su uočeni tipični simptomi mrke truleži.

12. *Ex situ* ispitivanje patogenosti bakterijskih izolata na listu šljive je pokazalo da su autohtoni izolati *P. syringae* ČL2/2 i P7/16_2 bili najagresivniji i izazivali nekroze na listovima svih ispitivanih sorti. *E. persicina* ČL3/16_1 je pokazao sposobnost formiranja nekroze na sortama Lepotica i Ranka, dok je izolat poreklom sa kruške *R. nepotum* (V7/16_2) izazvao nekroze na listovima svih sorti, sem Lepotice.

13. Izolat iz filofere šljive *Bacillus thuringiensis* R3/3 pokazao je snažnu antibakterijsku aktivnost protiv autohtonih i referentnih sojeva fitopatogena. PCR skriningom detektovano je prisustvo kurstakinskog operona i gena za N-acil homoserin laktonazu i endohitinazu. U *in vitro* uslovima produkuje hidrolitičke egzoenzime i N-acil homoserin laktonazu koja je odgovorna za sposobnost QS. Preživljava uslove suše pri koncentracijama PEG-a od 32,6 do 55%. U testu ko-kultivacije je utvrđena sposobnost *B. thuringiensis* R3/3 da redukuje rast populacije fitopatogena uz održavanje sopstvene populacije na stabilnom nivou.

14. Od testiranih 53 bakterijska izolata i 5 kvasaca značajna inhibitorna aktivnost na izolate *M. laxa* je detektovana za izolat P4/16_1 koji je redukovao rast tri najosetljivija soja *M. laxa* (M1, M8 i M13) između 80 i 88% u testu dualne kulture i između 16 i 30% dejstvom isparljivih organskih jedinjenja.

15. Izolat *Pseudomonas synxantha* P4/16_1 pokazao je sposobnost preživljavanja suše (koncentracijama PEG-a od 32,6 i 40%), slabu solubilizaciju fosfata, slabu produkciju biofilma i intenzivnu produkciju siderofora. Soj ima genetički kapacitet za proizvodnju fenazin-1-karboksilne kiseline što je potvrđeno i u *in vitro* testu. Benzenov ekstrakt *P. synxantha* P4/16_1 redukovao je rast *M. laxa* *in vitro* u opsegu od 57 do 63%, a značajan efekat na morfologiju hifa je uočen pomoću svetlosne i skenirajuće elektronske mikroskopije. Utvrđena je i snažna *in vitro* antibakterijska aktivnost benzenovog ekstrakta *P. synxantha* P4/16_1 na referentnim i autohtonim fitopatogenim sojevima.

16. Hemijskom analizom benzenovog ekstrakta *P. synxantha* P4/16_1 na osnovu HPLC-MS analize, identifikovana je molekulska masa 10 jedinjenja, od kojih je za 7 izvršena i identifikacija strukture. Prema strukturi to su derivati hidroksibenzena i hidroksibenzoeve kiseline i jedan derivat dihidrofuran-2,5-diona. Detektovana su dva strukturna izomera hidroksibenzoeve kiseline, 4-hidroksibenzoeva kiselina i verovatno 2-hidroksibenzoeva kiselina za koje je poznato da pokazuju antimikrobnu aktivnost. Utvrđeno je i prisustvo tri derivata fenazina, za koje u ovom trenutku nije moguća potpuna identifikacija strukture.

17. U *ex situ* ispitivanju biokontrolne aktivnosti na izazivača mrke truleži *M. laxa* na plodovima šljive, utvrđena je sposobnost benzenovog ekstrakta *P. synxantha* P4/16_1 da redukuje miceliju *M. laxa* na plodu sorte Ranka, dok je inhibicija potpuno izostala na plodovima sorte Požegača.

7. LITERATURA

7. LITERATURA

- Abdelfattah, A., Malacrino, A., Wisniewski, M., Cacciola, S.O., Schena, L. (2018). Metabarcoding: A powerful tool to investigate microbial communities and shape future plant protection strategies. *Biolog. Control.* 120, 1-10.
- Abdelfattah, A., Nicosia, M.G.L.D., Cacciola, S.O., Droby, S., Schena, L. (2015). Metabarcoding analysis of fungal diversity in the phyllosphere and carposphere of olive (*Olea europaea*). *PLoS One.* 10, e0131069.
- Abdelfattah, A., Wisniewski, M., Nicosia, M.G.L.D., Cacciola, S.O., Schena, L. (2016). Metagenomic analysis of fungal diversity on strawberry plants and the effect of management practices on the fungal community structure of aerial organs. *PLoS One.* 11, e0160470.
- Abderrahmani, A., Tapi, A., Nateche, F., Chollet, M., Leclère, V., Wathelet, B. et al. (2011) Bioinformatics and molecular approaches to detect NRPS genes involved in the biosynthesis of kurstakin from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 92, 571-581.
- Abriouel, H., Franz, C.M., Omar, N.B., Gálvez, A. (2011). Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiol. Rev.* 35(1), 201-232.
- Ahmed, E., Holmström, S.J. (2014). Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microb. Biotechnol.* 7(3), 196-208.
- Aiello, D., Restuccia, C., Stefani, E., Vitale, A., Cirvilleri, G. (2019). Postharvest biocontrol ability of *Pseudomonas synxantha* against *Monilinia fructicola* and *Monilinia fructigena* on stone fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 149, 83-89.
- Ainsworth, C., Sparrow, K., Sussman, A. (1973). *The Fungi. An advanced treatise. A taxonomic review with keys: Ascomycetes and fungi imperfecti.* Academic Press, London and New York.

- Albertin, W., Setati, M.E., Miot-Sertier, C., Mostert, T.T., Colonna-Ceccaldi, B., Coulon, J. et al. (2016). *Hanseniaspora uvarum* from winemaking environments show spatial and temporal genetic clustering. *Front. Microbiol.* 6, 1569.
- Amborabé, B.E., Fleurat-Lessard, P., Chollet, J.F., Roblin, G. (2002). Antifungal effects of salicylic acid and other benzoic acid derivatives towards *Eutypa lata*: structure–activity relationship. *Plant Physiol. Biochem.* 40, 1051-1060.
- Arora, J., Goyal, S., Ramawat, K.G. (2012). “Co-evolution of pathogens, mechanism involved in pathogenesis and biocontrol of plant diseases: an overview”, in *Plant Defence: Biological Control*, eds J. Mérillon, R. Michel, Gopal K. (Dordrecht: Springer), 3-22.
- Athukorala, S.N., Fernando, W.D., Rashid, K.Y. (2009). Identification of antifungal antibiotics of *Bacillus* species isolated from different microhabitats using polymerase chain reaction and MALDI-TOF mass spectrometry. *Can. J. Microbiol.* 55, 1021-1032.
- Aydogan, E.L., Moser, G., Müller, C., Kämpfer, P. Glaeser, S.P. (2018). Long-term warming shifts the composition of bacterial communities in the phyllosphere of *Galium album* in a permanent grassland field-experiment. *Front. Microbiol.* 9, 144.
- Bais, H.P., Fall, R., Vivanco, J. M. (2004). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Pathol.* 134(1), 307-319.
- Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V. (2012). The microbial ecology of wine grape berries. *Int. J. Food Microbiol.* 153, 243-259.
- Bauer, M.A., Kainz, K., Carmona-Gutierrez, D., Madeo, F. (2018). Microbial wars: Competition in ecological niches and within the microbiome. *Microb. Cell.* 5, 215.
- Béchet, M., Caradec, T., Hussein, W., Abderrahmani, A., Chollet, M., Leclère, V. et al. (2012). Structure, biosynthesis, and properties of kurstakins, nonribosomal lipopeptides from *Bacillus* spp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95(3), 593-600.

- Behrendt, U., Ulrich, A., Schumann, P., Erler, W., Burghardt, J., Seyfarth, W. (1999). A taxonomic study of bacteria isolated from grasses: a proposed new species *Pseudomonas graminis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 49(1), 297-308.
- Berić. T., Urdaci, M.C., Stanković, S., Knežević-Vukčević, J. (2009). RAPD analysis of genetic diversity and qualitative assessment of hydrolytic activities in a collection of *Bacillus* sp. isolate. *Arch. Biol. Sci.* 61 (4), 645-652.
- Bertrand, S., Bohni, N., Schnee, S., Schumpp, O., Gindro, K., Wolfender, J.L. (2014). Metabolite induction via microorganism co-culture: a potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. *Biotechnol. Adv.* 32(6), 1180-1204.
- Booth, C. (1971a). *The genus Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England.
- Booth, C. (1971b). Fungal culture media. In: Norris, J.R., Ribbons, D.W., eds. *Methods in Microbiology* (pp. 49-94). Academic Press, London and New York.
- Børve, J., Vangdal, E. (2007). Fungal pathogens causing fruit decay on plum (*Prunus domestica* L.) in Norway. *Acta Hortic.* (734), 367–369.
- Boyer, F., Mercier, C., Bonin, A., Le Bras, Y., Taberlet, P., Coissac, E. (2016). OBITOOLS: A unix-inspired software package for DNA metabarcoding. *Mol. Ecol. Resour.* 16(1), 176-182.
- Bragonzi, A., Farulla, I., Paroni, M., Twomey, K.B., Pirone, L., Lorè, N.I. et al. (2012). Modelling co-infection of the cystic fibrosis lung by *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia* reveals influences on biofilm formation and host response. *PLoS One.* 7, e52330.
- Brown, U. (1987). A monograph of the *Erysiphales* (powdery mildews). Nova Hedwigia Beihefte. 89, 1-700.
- Bubici G., D'amico M., Cirulli M. (2010). Field reactions of plum cultivars to the shot-hole disease in southern Italy. *Crop Prot.* 29(12):1396-1400

- Burgess, W., Summerell, A., Bullock, S., Gott, K., Backhouse, D. (1994). *Laboratory manual for Fusarium research*. Fusarium Research Laboratory, Department of Crop Sciences, University of Sydney and Royal Botanic Gardens, Sydney.
- Caamaño-Antelo, S., Fernández-No, I.C., Böhme, K., Ezzat-Alnakip, M., Quintela-Baluja, M., Barros-Velázquez et al. (2015). Genetic discrimination of foodborne pathogenic and spoilage *Bacillus* spp. based on three housekeeping genes. *Food Microbiol.* 46, 288-298.
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., Holmes, S.P. (2016). DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods.* 13, 581.
- Cannon, P.F., Kirk, P.M. (2007). *Fungal families of the world*. Cabi.
- Carnegie, A.J., Burgess, T.I., Beilharz, V., Wingfield, M.J. (2007). New species of *Mycosphaerella* from Myrtaceae in plantations and native forests in eastern Australia. *Mycologia.* 99, 461-474.
- Carvalho, S.D., Castillo, J.A. (2018). Influence of Light on Plant–Phyllosphere Interaction. *Front. Plant. Sci.* 9.
- Castillo, L., Plaza, V., Larrondo, L.F., Canessa, P. (2017). Recent advances in the study of the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea* and its interaction with the environment. *Curr. Protein Pept. Sci.* 18(10), 976-989.
- Cawoy, H., Bettioli, W., Fickers, P., Ongena, M. (2011). *Bacillus*-based biological control of plant diseases. Embrapa Meio Ambiente-Capítulo em livro científico (ALICE).
- Chin-A-Woeng, T.F., Bloemberg, G.V., Lugtenberg, B.J. (2003). Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. *New phytol.* 157(3), 503-523.
- Chin-A-Woeng, T.F., Bloemberg, G.V., van der Bij, A.J., van der Drift, K.M., Schripsema, J., Kroon, B. et al. (1998). Biocontrol by phenazine-1-carboxamide-producing *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 of tomato root rot caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 11(11), 1069-1077.

- Choi, K.Y., Lee, T.K., Sul, W.J. (2015). Metagenomic analysis of chicken gut microbiota for improving metabolism and health of chickens—a review. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 28(9), 1217.
- Chung, K.R. (2012). Stress Response and Pathogenicity of the Necrotrophic Fungal Pathogen *Alternaria alternata*. *Scientifica.* 1–17.
- Crous, P.W., Kang, J.C., Braun, U. (2001). A phylogenetic redefinition of anamorph genera in *Mycosphaerella* based on ITS rDNA sequence and morphology. *Mycologia.* 93, 1081-1101.
- da Rocha Neto, A.C., Maraschin, M., Di Piero, R.M. (2015). Antifungal activity of salicylic acid against *Penicillium expansum* and its possible mechanisms of action. *Int. J. Food Microbiol.* 215, 64-70.
- de Souza, J.T., Raaijmakers, J.M. (2003). Polymorphisms within the *prnD* and *pltC* genes from pyrrolnitrin pyoluteorin-producing *Pseudomonas* and *Burkholderia* spp. *FEMS Microbiol. Ecol.* 43, 21-34.
- Dillon, M. M., Thakur, S., Almeida, R.N., Wang, P.W., Weir, B.S., Guttman, D.S. (2019). Recombination of ecologically and evolutionarily significant loci maintains genetic cohesion in the *Pseudomonas syringae* species complex. *Genome Biol.* 20(1), 3.
- Dimkić, I., Živković, S., Berić, T., Ivanović, Ž., Gavrilović, V., Stanković, S. et al. (2013). Characterization and evaluation of two *Bacillus* strains, SS-12.6 and SS-13.1, as potential agents for the control of phytopathogenic bacteria and fungi. *Biolog. Control.* 65, 312-321.
- Ding, T., Melcher, U. (2016). Influences of plant species, season and location on leaf endophytic bacterial communities of non-cultivated plants. *PloS One.* 11, e0150895.
- Dionísio, A.P., Molina, G., de Carvalho, D.S., Dos Santos, R., Bicas, J.L., Pastore, G.M. (2012). „Natural flavourings from biotechnology for foods and beverages,” in: *Natural food additives, ingredients and flavourings*, eds D. Baines, R. Seal, (Cambridge: Woodhead Publishing), 231-259.

- Djenane, Z., Nateche, F., Amziane, M., Gomis-Cebolla, J., El-Aichar, F., Khorf, H. et al. (2017). Assessment of the antimicrobial activity and the entomocidal potential of *Bacillus thuringiensis* isolates from Algeria. *Toxins*. 9, 139.
- Dong, Y.H., Gusti, A.R., Zhang, Q., Xu, J.L., Zhang, L.H. (2002). Identification of quorum-quenching N-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1754-1759.
- Dong, Y.H., Wang, L.H., Zhang, L.H. (2007). Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 362(1483), 1201-1211.
- Dorokhov, Y.L., Sheshukova, E.V., Komarova, T.V. (2018). Methanol in plant life. *Front Plant Sci.* 9: 1623.
- Ellis, M.B., Ellis, J.P. (1997). *Microfungi on land plants. An identification handbook. New enlarged edition.* The Richmond Publishing Co. Ltd, Slough, England.
- El-Mohamedy, R.S., Abdel-Kader, M.M., Abd-El-Kareem, F., El-Mougy, N.S. (2013). Inhibitory effect of antagonistic bio-agents and chitosan on the growth of tomato root rot pathogens *in vitro*. *Int. J. Agric. Technol.* 9, 1521-1533.
- Fan, B., Wang, C., Song, X., Ding, X., Wu, L., Wu, H., Gao, X., Borriss, R. (2018). *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: The gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol. *Front. Microbiol.* 9, 2491.
- FAOSTAT. 2017. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Ferreira, C.M.H., Vilas-Boas, Â., Sousa, C.A., Soares, H.M.V.M., Soares, E.V. (2019). Comparison of five bacterial strains producing siderophores with ability to chelate iron under alkaline conditions. *AMB Express.* 9, 78.
- Filonow, A.B. (1998). Role of competition for sugars by yeasts in the biocontrol of gray mold of apple. *Biocontrol Sci. Techn.* 8(2), 243-256.

- Fira, Dj, Beric, T., Stankovic, S. (2014). Biological control of plant pathogens by the strains of *Bacillus* sp. in *Biotechnology Volume 2: Plant Biotechnology*, ed. Kumar Ananda, P., Studium Press LLC, New Delhi, India, 429-448. ISBN: 1-62699-017-4. SERIES ISBN: 1-62699-015-8.
- Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J., Stanković, S. (2018). Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *J. Biotechnol.* 285, 44-55.
- Fogarty, R.V., Tobin, J.M. (1996). Fungal melanins and their interactions with metals. *Enzyme Microb. Technol.* 19, 311-317.
- Frases, S., Salazar, A., Dadachova, E., Casadevall, A. (2007). *Cryptococcus neoformans* can utilize the bacterial melanin precursor homogentistic acid for fungal melanogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 615-621.
- Fusco, V., Quero, G.M., Cho, G.S., Kabisch, J., Meske, D., Neve, H. et al. (2015). The genus *Weissella*: taxonomy, ecology and biotechnological potential. *Front. Microbiol.* 6, 155.
- Ganeshan, G., Manoj Kumar, A. (2005). *Pseudomonas fluorescens*, a potential bacterial antagonist to control plant diseases. *J. Plant Interact.* 1(3), 123-134.
- Garrido-Sanz., D., Arrebola., E., Martínez-Granero F., García-Méndez S., Muriel C., Blanco-Romero E. et al. (2017). Classification of isolates from the *Pseudomonas fluorescens* complex into phylogenomic groups based in group-specific markers. *Front. Microbiol.* 8, 413.
- Gavrilović, V. *Pseudomonas syringae* – patogen voćaka u Srbiji. (2009). *Pestic. Phytomed.* 24(3), 153-163.
- Gerlach, W., Nirenberg, H. (1982). *The genus Fusarium - a pictorial atlas*. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem.
- Giorgio, A., De Stradis, A., Lo Cantore, P., Iacobellis, N.S. (2015). Biocide effects of volatile organic compounds produced by potential biocontrol rhizobacteria on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Front. Microbiol.* 6, 1056.

- Glick, B.R., Jacobson, C.B., Schwarze, M.M., Pasternak, J.J. (1994). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase mutants of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 do not stimulate canola root elongation. *Can. J. Microbiol.* 40(11), 911-915.
- Glišić, I., Karaklajić-Stajić, Ž., Paunović, S.A., Lukić, M. (2016). Plum cultivars Zlatka and Pozna Plava (*Prunus domestica* L.) bred at the Fruit Research Institute in Čačak. *Hortic. Sci.* 43(1), 10-16.
- González-Rocha, G., Muñoz-Cartes, G., Canales-Aguirre, C.B., Lima, C.A., Domínguez-Yévenes, M., Bello-Toledo, H., Hernández, C.E. (2017). Diversity structure of culturable bacteria isolated from the Fildes Peninsula (King George Island, Antarctica): A phylogenetic analysis perspective. *PLoS One.* 12(6), e0179390.
- Grandclément, C., Tannières, M., Moréra, S., Dessaux, Y., Faure, D. (2015). Quorum quenching: role in nature and applied developments. *FEMS Microbiol. Rev.* 40, 86-116.
- Gschaedler, A. (2017). Contribution of non-conventional yeasts in alcoholic beverages. *Curr. Opin. Food Sci.* 13, 73-77.
- Guttenberger, N., Blankenfeldt, W., Breinbauer, R. (2017). Recent developments in the isolation, biological function, biosynthesis, and synthesis of phenazine natural products. *Bioorg. Med. Chem.* 25(22), 6149-6166.
- Gyaneshwar, P., Kumar, G.N., Parekh, L.J., Poole, P.S. (2002). Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant Soil.* 245(1), 83-93.
- Haas J.C., Street N.R., Sjödin A., Lee N.M., Högberg M.N., Näsholm T. et al. (2018). Microbial community response to growing season and plant nutrient optimisation in a boreal Norway spruce forest. *Soil Biol. Biochem.* 125, 197–209.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT systems. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41, 95–98.

- Harris, L.J., Daeschel, M.A., Stiles, M.E., Klaenhammer, T.R. (1989). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 52(6), 384-387.
- Helgason, E., Tourasse, N.J., Meisal, R., Caugant, D.A., Kolstø, A.B. (2004). Multilocus sequence typing scheme for bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 191-201.
- Henson, J.M., Butler, M.J., Day, A.W. (1999). The dark side of the mycelium: Melanins of phytopathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37, 447-471.
- Hernández-León, R., Rojas-Solís, D., Contreras-Pérez, M., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., Macías-Rodríguez, L. I., Reyes-de la Cruz et al. (2015). Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. *Biolog. Control.* 81, 83-92.
- Hrustić, J., Delibašić, G., Stanković I., Grahovac, M., Krstić, B., Bulajić, A. et al. (2015). *Monilinia* causing brown rot of stone fruit in Serbia. *Plant Dis.* 99, 709-717.
- Hsieh, T.F., Huang, H.C., Conner, R.L. (2004). Bacterial wilt of bean: current status and prospects. *Recent Res. Devel. Plant Sci.* 2, 181-206.
- Hu, X., Fang, Q., Li, S., Wu, J., Chen, J. (2009). Isolation and characterization of endophytic and rhizosphere bacterial antagonists of soft rot pathogen from *Pinellia ternata*. *FEMS Microbiol. Lett.* 295, 10-16.
- Hulin, M.T., Mansfield, J.W., Brain, P., Xu, X., Jackson, R.W., Harrison, R.J. (2018). Characterization of the pathogenicity of strains of *Pseudomonas syringae* towards cherry and plum. *Plant Pathol.* 67(5), 1177-1193.
- Huse, S.M., Welch, D.M., Morrison, H.G., Sogin, M.L. (2010). Ironing out the wrinkles in the rare biosphere through improved OTU clustering. *Environ. Microbiol.* 12(7), 1889-1898.

- Jain, R., Pandey, A. (2016). A phenazine-1-carboxylic acid producing polyextremophilic *Pseudomonas chlororaphis* (MCC2693) strain, isolated from mountain ecosystem, possesses biocontrol and plant growth promotion abilities. *Microbiol. Res.* 190, 63-71.
- Janisiewicz, W.J., Jurick II, W.M., Vico, I., Peter, K.A., Buyer, J.S. (2013). Culturable bacteria from plum fruit surfaces and their potential for controlling brown rot after harvest. *Postharvest Biol. Technol.* 76, 145-151.
- Janisiewicz, W.J., Jurick, W.M., Peter, K.A., Kurtzman, C.P., Buyer, J.S. (2014). Yeasts associated with plums and their potential for controlling brown rot after harvest. *Yeast.* 31(6), 207-218.
- Janisiewicz, W.J., Kurtzman, C.P., Buyer, J.S. (2010). Yeasts associated with nectarines and their potential for biological control of brown rot. *Yeast.* 27, 389-398.
- Janisiewicz, W.J., Tworkoski, T.J., Kurtzman, C.P. (2001). Biocontrol potential of *Metchnikowia pulcherrima* strains against blue mold of apple. *Phytopathology.* 91(11), 1098-1108.
- Janisiewicz, W.J., Tworkoski, T.J., Sharer, C. (2000). Characterizing the mechanism of biological control of postharvest diseases on fruits with a simple method to study competition for nutrients. *Phytopathology.* 90, 1196-1200.
- Jo, Y., Cho, J.K., Choi, H., Chu, H., Lian, S., Cho, W.K. (2015). Bacterial communities in the phylloplane of *Prunus* species. *J. Basic Microbiol.* 55, 504-508.
- Jolley, K.A., Chan, M.S., Maiden, M.C. (2004). *Bacillus cereus* MLST Databases. University of Oxford, viewed 21 April 2019, < <https://pubmlst.org/bcereus/>>.
- Jose, P.A., Krishnamoorthy, R., Kwon, S.W., Janahiraman, V., Senthilkumar, M., Gopal, N.O. et al. (2019). Interference in quorum sensing and virulence of the phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *passiflorae* by *Bacillus* and *Variovorax* species. *BioControl.* 64(4), 423-433.

- Kim, B.R., Shin, J., Guevarra, R., Lee, J.H., Kim, D.W., Seol, K.H. et al. (2017). Deciphering diversity indices for a better understanding of microbial communities. *J. Microbiol. Biotechnol.* 27(12), 2089-2093.
- Kim, P.I., Bai, H., Bai, D., Chae, H., Chung, S., Kim, Y. et al. (2004). Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26. *J. Appl. Microbiol.* 97(5), 942-949.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter, D.W., Stalpers, J.A. (2008). *Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi. 10th International Mycological Institute.* CAB International, Wallingford, UK.
- Knief, C., Delmotte, N., Chaffron, S., Stark, M., Innerebner, G., Wassmann, R. et al. (2012). Metaproteogenomic analysis of microbial communities in the phyllosphere and rhizosphere of rice. *ISME J.* 6, 1378.
- Köhl, J., Kolnaar, R., Ravensberg, W.J. (2019). Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. *Front. Plant Sci.* 10, 845.
- Kõljalg, U., Nilsson, R.H., Abarenkov, K., Tedersoo, L., Taylor, A.F., Bahram, M. et al. (2013). Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Mol. Ecol.* 22(21), 5271-5277.
- Lane, C.R. (2002). A synoptic key for differentiation of *Monilinia fructicola*, *M. fructigena* and *M. laxa*, based on examination of cultural characters. *OEPP/EPPO Bulletin.* 32: 489-493.
- LaSarre, B., Federle, M.J. (2013). Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 77(1), 73-111.
- Lau, J.A., Lennon, J.T. (2012). Rapid responses of soil microorganisms improve plant fitness in novel environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109(35), 14058-14062.
- Leveau, J.H.J., Tech, J.J. (2010). Grapevine microbiomics: bacterial diversity on grape leaves and berries revealed by high-throughput sequence analysis of 16S rRNA amplicons. *ISHS Acta Hort.* 905, 31-42.

- Li, J.G., Jiang, Z.Q., Xu, P., Sun, F.F., Guo, J.H. (2008). Characterization of chitinase secreted by *Bacillus cereus* strain CH2 and evaluation of its efficacy against *Verticillium* wilt of eggplant. *Biocontrol*. 53, 931-944.
- Li, X., Kerrigan, J., Chai, W., Schnabel, G. (2012). *Botrytis caroliniana*, a new species isolated from blackberry in South Carolina. *Mycologia*. 104(3), 650-658.
- Lino, O.L., Pacheco, I., Mercier, V., Faoro, F., Bassi, D., Bornard, I. et al. (2016). Brown rot strikes *Prunus* fruit: an ancient fight almost always lost. *J. Agric. Food Chem.* 64, 4029-4047.
- Liu, H., Chen, D., Zhang, R., Hang, X., Li, R., Shen, Q. (2016). Amino acids hydrolyzed from animal carcasses are a good additive for the production of bio-organic fertilizer. *Front. Microbiol.* 7, 1290.
- Liu, K., McInroy, J.A., Hu, C., Kloepper, J.W. (2017). Mixtures of plant-growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple plant diseases and plant-growth promotion in the presence of pathogens. *Plant Dis.* 102(1), 67-72.
- Liu, Y., Lai, Q., Göker, M., Meier-Kolthoff, J.P., Wang, M., Sun, Y. et al. (2015). Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. *Sci. reports*. 5, 14082.
- Lysøe, E., Harris, L.J., Walkowiak, S., Subramaniam, R., Divon, H.H., Riiser, E. S. et al. (2014). The genome of the generalist plant pathogen *Fusarium avenaceum* is enriched with genes involved in redox, signaling and secondary metabolism. *PLoS One*. 9(11), e112703.
- Machado, A.P., Anzai, M., Fischman, O. (2010b). *Bacillus subtilis* induces morphological changes in *Fonsecaea pedrosoi* *in vitro* resulting in more resistant fungal forms *in vivo*. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 16, 592-598.
- Machado, A.P., Vivi, V.K., Tavares, J.S., Gueiros Filho, F.J., Fischman, O. (2010a). Antibiosis and dark-pigments secretion by the phytopathogenic and environmental fungal species after interaction *in vitro* with a *Bacillus subtilis* isolate. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 53, 997-1004.

- Magan, N. (2006). „Ecophysiology of biocontrol agents for improved competence in the phyllosphere,” in *Microbial ecology of aerial plant surfaces*, eds M.J. Bailey, A.K. Lilley, T.M. Timms-Wilson, P.T.N. Spencer Phillips (Wallingford: CAB International), 149–164.
- Manso, T., Nunes, C. (2011). *Metschnikowia andauensis* as a new biocontrol agent of fruit postharvest diseases. *Postharvest Biol. Technol.* 61, 64-71.
- Manjula, K., Podile, A.R. (2005). Production of fungal cell wall degrading enzymes by a biocontrol strain of *Bacillus subtilis* AF 1. *Indian J. Exp. Biol.* 43(10), 892-896.
- Marusina, A.I., Boulygina, E.S., Kuznetsov, B.B., Tourova, T.P., Kravchenko, I.K., Gal'chenko, V.F. (2001). A system of oligonucleotide primers for the amplification of *nifH* genes of different taxonomic groups of prokaryotes. *Microbiology.* 70(1), 73-78.
- Materatski, P., Varanda, C., Carvalho, T., Dias, A.B., Campos, M.D., Rei, F. et al. (2019). Spatial and temporal variation of fungal endophytic richness and diversity associated to the phyllosphere of olive cultivars. *Fungal Biol.* 123, 66-76.
- Matković M. (2015). Possibilities of plum cultivation in the Republic of Serbia. *Econ. Agric.* 62, 1045-60.
- Mavrodi, D.V., Blankenfeldt, W., Thomashow, L.S. (2006). Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* spp. biosynthesis and regulation. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44, 417-445.
- McDonald, D., Price, M.N., Goodrich, J., Nawrocki, E.P., DeSantis, T.Z., Probst, A. et al. (2012). An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME J.* 6(3), 610.
- McGarvey, J.A., Han, R., Connell, J.H., Stanker, L.H., Hnasko, R. (2015). Bacterial populations on the surfaces of organic and conventionally grown almond drupes. *J. Appl. Microbiol.* 119, 529-538.
- Meena, B. (2014). “Biological control of pest and diseases using fluorescent pseudomonads”, in *Basic and applied aspects of biopesticides*, ed K. Sahayaraj, (New Delhi: Springer), 17-29.

- Mezaache-Aichour, S., Guechi, A., Zerroug, M.M., Nicklin, J., Strange, R.N. (2013). Antimicrobial activity of *Pseudomonas* secondary metabolites. *Pharmacogn. Commun.* 3(3).
- Mikiciński, A., Sobiczewski, P., Puławska, J., Maciorowski, R. (2016). Control of fire blight (*Erwinia amylovora*) by a novel strain 49M of *Pseudomonas graminis* from the phyllosphere of apple (*Malus* spp.). *Eur. J. Plant Pathol.* 145, 265-276.
- Milatović, D., Đurović, D., Zec, G., Radović, M. (2015). Phenological traits, yield and fruit quality of plum cultivars bred at the Fruit Research Institute in Čačak, Serbia.
- Milošević, T., Milošević, N. (2012). Main physical and chemical traits of fresh fruits of promising plum hybrids (*Prunus domestica* L.) from Cacak (Western Serbia). *Rom. Biotechnol. Lett.* 17(3), 7358-7365.
- Mishra, J., Arora, N.K. (2018). Secondary metabolites of fluorescent pseudomonads in biocontrol of phytopathogens for sustainable agriculture. *Appl. Soil Ecol.* 125, 35-45.
- Molnár, B., Varga, M., Vámos, A., Holb, I.J. (2018). Incidence of two leaf fungal diseases in two plum training systems. *Int J. Hort. Sci.* 24(3-4), 15-17.
- Montarry, J., Cartolaro, P., Delmotte, F., Jolivet, J., Willocquet, L. (2008). Genetic structure and aggressiveness of *Erysiphe necator* populations during grapevine powdery mildew epidemics. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(20), 6327-6332.
- Moragrega, C., Llorente, I., Manceau, C., Montesinos, E. (2003). Susceptibility of European pear cultivars to *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* using immature fruit and detached leaf assays. *Eur. J. Plant Pathol.* 109(4), 319-326.
- Mukherjee, K., Mandal, S., Mukhopadhyay, B., Mandal, N.C., Sil, A.K. (2014). Bioactive compound from *Pseudomonas synxantha* inhibits the growth of *Mycobacteria*. *Microbiol. Res.* 169, 794-802.
- Müller, T., Behrendt, U., Ruppel, S., von der Waydbrink, G., Müller, M.E. (2016). Fluorescent pseudomonads in the phyllosphere of wheat: Potential antagonists against fungal phytopathogens. *Curr. Microbiol.* 72, 383-389.

- Müller, T., Ruppel, S. (2014). Progress in cultivation-independent phyllosphere microbiology. *FEMS Microbiol. Ecol.* 87, 2-17.
- Nelson, E., Toussoun, A., Marasas, O. (1983). *Fusarium species. An illustrated manual for identification*. The Pennsylvania State University Press, University Park and London.
- Nesemann, K., Braus-Stromeier, S.A., Thuermer, A., Daniel, R., Mavrodi, D.V., Thomashow, L.S. et al. (2015). Draft genome sequence of the phenazine-producing *Pseudomonas fluorescens* strain 2-79. *Genome Announc.* 3(2), e00130-15.
- Newton, A.C., Gravouil, C., Fountaine, J.M. (2010). Managing the ecology of foliar pathogens: ecological tolerance in crops. *Ann. Appl. Biol.* 157, 343-359.
- Nosanchuk, J.D., Casadevall, A. (2003). The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell. Microbiol.* 5(4), 203-223.
- Oerke, E.C. (2006). Crop losses to pests. *J. Agric. Sci.* 144(1), 31-43.
- Oh, S.Y., Nam, K.W., Yoon, D.H. (2014). Identification of *Acremonium acutatum* and *Trichothecium roseum* isolated from Grape with White Stain Symptom in Korea. *Mycobiology.* 42(3), 269-273.
- Ongena, M., Jacques, P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* 16(3), 115-125.
- Ottesen, A.R., Gorham, S., Reed, E., Newell, M.J., Ramachandran, P., Canida, T. et al. (2016). Using a control to better understand phyllosphere microbiota. *PloS One.* 11, e0163482.
- Ottesen, A.R., Peña, A.G., White, J.R., Pettengill, J.B., Li, C., Allard, S. et al. (2013). Baseline survey of the anatomical microbial ecology of an important food plant: *Solanum lycopersicum* (tomato). *BMC Microbiol.* 13, 114.
- Ottesen, A.R., White, J.R., Skaltsas, D.N., Newell, M.J., Walsh, C.S. (2009). Impact of organic and conventional management on the phyllosphere microbial ecology of an apple crop. *J. Food Protect.* 72, 2321-2325.

- Palacio-Bielsa, A., Cubero, J., Cambra, M.A., Collados, R., Berruete, I.M., López, M.M. (2011). Development of an efficient real-time quantitative PCR protocol for detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* in *Prunus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 89-97.
- Pan, J., Huang, T., Yao, F., Huang, Z., Powell, C.A., Qiu, S. et al. (2008). Expression and characterization of *aiiA* gene from *Bacillus subtilis* BS-1. *Microbiol. Res.* 163, 711-716.
- Panahirad, S., Zaare-Nahandi, F., Safaralizadeh, R., Alizadeh-Salteh, S. (2013). Postharvest Control of *Rhizopus stolonifer* in Peach (*Prunus persica* L. B atsch) Fruits Using Salicylic Acid. *J. Food Saf.* 32, 502-507.
- Pandin, C., Le Coq, D., Deschamps, J., Védie, R., Rousseau, T., Aymerich, S., Briandet, R. (2018). Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* QST713: a biocontrol agent that protects *Agaricus bisporus* crops against the green mould disease. *J. Biotechnol.* 278, 10-19.
- Panpatte, D.G., Jhala, Y.K., Shelat, H.N., Vyas, R.V. (2016). “*Pseudomonas fluorescens*: a promising biocontrol agent and PGPR for sustainable agriculture”, in *Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity*, eds D.P., Singh, H.B., Singh, R. Prabha, (New Delhi: Springer), 257-270.
- Parejko, J.A., Mavrodi, D.V., Mavrodi, O.V., Weller, D.M., Thomashow, L.S. (2012). Population structure and diversity of phenazine-1-carboxylic acid producing fluorescent *Pseudomonas* spp. from dryland cereal fields of central Washington State (USA). *Microb. Ecol.* 64, 226-241.
- Paulsen, I.T., Press, C.M., Ravel, J., Kobayashi, D.Y., Myers, G.S., Mavrodi, D.V. et al. (2005). Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nat. Biotechnol.* 23(7), 873.
- Penuelas, J., Rico, L., Ogaya, R., Jump, A.S., Terradas, J. (2012). Summer season and longterm drought increase the richness of bacteria and fungi in the foliar phyllosphere of *Quercus ilex* in a mixed Mediterranean forest. *Plant Biol.* 14, 565-575.

- Penuelas, J., Terradas, J. (2014). The foliar microbiome. *Trends Plant Sci.* 19(5), 278-280.
- Pieterse, C.M., Zamioudis, C., Berendsen, R.L., Weller, D.M., Van Wees, S.C., Bakker, P. A. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 52, 347-375.
- Pinto, C., Pinho, D., Sousa, S., Pinheiro, M., Egas, C., Gomes, A.C. (2014). Unravelling the diversity of grapevine microbiome. *PLoS One.* 9, e85622.
- Pitt, I. (1979). The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. *J. Basic Microbiol.* 21, 629-629.
- Poniatowska, A., Michalecka, M., Bielenin, A. (2013). Characteristic of *Monilinia* spp. fungi causing brown rot of pome and stone fruits in Poland. *Eur. J. Plant. Pathol.* 135, 855-865.
- Price, N.P., Rooney, A.P., Swezey, J.L., Perry, E., Cohan, F.M. (2007). Mass spectrometric analysis of lipopeptides from *Bacillus* strains isolated from diverse geographical locations. *FEMS Microbiol. Lett.* 271(1), 83-89.
- Puławska, J., Warabieda, W., Ismail, E. (2016). Identification and characterization of bacteria isolated from crown galls on stone fruits in Poland. *Plant Pathol.* 65(6), 1034-1043.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P. et al. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, D590-D596.
- Quince, C., Walker, A.W., Simpson, J.T., Loman, N.J., Segata, N. (2017). Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nat. Biotechnol.* 35(9), 833.
- Quiñones, B., Dulla, G., Lindow, S.E. (2005). Quorum sensing regulates exopolysaccharide production, motility, and virulence in *Pseudomonas syringae*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 18(7), 682-693.
- R Development Core Team (2012). R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna: R foundation for Statistical Computing, viewed 15 January 2019, <<http://www.R-project.org>>.

- Raaijmakers, J.M., Weller, D.M., Thomashow, L.S. (1997). Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 881-887.
- Raio, A., Reveglia, P., Puopolo, G., Cimmino, A., Danti, R., Evidente, A. (2017). Involvement of phenazine-1-carboxylic acid in the interaction between *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* strain M71 and *Seiridium cardinale* *in vivo*. *Microbiol. Res.* 199, 49-56.
- Ramarathnam, R., Bo, S., Chen, Y., Fernando, W.D., Xuewen, G., De Kievit, T. (2007). Molecular and biochemical detection of fengycin-and bacillomycin D producing *Bacillus* spp., antagonistic to fungal pathogens of canola and wheat. *Can. J. Microbiol.* 53, 901-911.
- Ramette, A., Frapolli, M., Défago, G., Moëgne-Loccoz, Y. (2003). Phylogeny of HCN synthase-encoding *hcnBC* genes in biocontrol fluorescent pseudomonads and its relationship with host plant species and HCN synthesis ability. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16, 525-535.
- Rastogi, G., Sbodio, A., Tech, J.J., Suslow, T.V., Coaker, G. L., Leveau, J.H. (2012). Leaf microbiota in an agroecosystem: spatiotemporal variation in bacterial community composition on field-grown lettuce. *ISME J.* 6, 1812.
- Raza, W., Ling, N., Liu, D., Wei, Z., Huang, Q., Shen, Q. (2016). Volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* WR-1 restrict the growth and virulence traits of *Ralstonia solanacearum*. *Microbiol. Res.* 192, 103-113.
- RHMZ. *Metereološki godišnjak 1.* (2017). Klimatološki podaci. Beograd.
- Riesenfeld, C.S., Schloss, P.D., Handelsman, J. (2004). Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annu. Rev. Genet.*, 38, 525-552.
- Romero, M., Martin-Cuadrado, A.B., Roca-Rivada, A., Cabello, A.M., Otero, A. (2011). Quorum quenching in cultivable bacteria from dense marine coastal microbial communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* 75, 205-217.

- Rungjindamai, N., Jeffries, P., Xu, X.M. (2014). Epidemiology and management of brown rot on stone fruit caused by *Monilinia laxa*. *Eur. J. Plant Pathol.* 140, 1-17.
- Rungjindamai, N., Xu, X.M., Jeffries, P. (2013). Identification and characterization of new microbial antagonists for biocontrol of *Monilinia laxa*, the causal agent of brown rot on stone fruit. *Agronomy.* 3, 685-703.
- Sacristan, S., García-Arenal, F. (2008). The evolution of virulence and pathogenicity in plant pathogen populations. *Mol. Plant Pathol.* 9(3), 369-384.
- Saha, R., Saha, N., Donofrio, R.S., Bestervelt, L.L. (2013). Microbial siderophores: a mini review. *J. Basic Microb.* 53(4), 303-317.
- Salazar-Marroquín, E.L., Galán-Wong, L.J., Moreno-Medina, V.R., Reyes-López, M.Á., Pereyra-Alfárez, B. (2016). Bacteriocins synthesized by *Bacillus thuringiensis*: generalities and potential applications. *Rev. Med. Microbiol.* 27, 95.
- Sánchez-Bayo, F., Tennekes, H.A. (2015). “Environmental risk assessment of agrochemicals- A critical appraisal of current approaches”, in *Toxicity and Hazard of Agrochemicals*, eds M. Larramendy, S. Soloneski, (Rijeka: IntechOpen) 1.
- Santoyo, G., Orozco-Mosqueda, M.D.C., Govindappa, M. (2012). Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. *Biocontrol Sci. Techn.* 22, 855-872.
- Sarkar, S.F., Guttman, D.S. (2004). Evolution of the core genome of *Pseudomonas syringae*, a highly clonal, endemic plant pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1999-2012.
- Schallmeyer, M., Singh, A., Ward, O.P. (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can. J. Microbiol.* 50(1), 1-17.
- Schlechter, R.O., Miebach, M., Remus-Emsermann, M.N. (2019). Driving factors of epiphytic bacterial communities: A review. doi: 10.1016/j.jare.2019.03.003
- Schmieder, R., Edwards, R. (2011). Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics.* 27, 863-864.

- Scortichini, M. (2010). Epidemiology and predisposing factors of some major bacterial diseases of stone and nut fruit trees species. *J. Plant Pathol.* S73-S78.
- Shafi, J., Tian, H., Ji, M. (2017). *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. *Biotechnol. Biotec. Eq.* 31, 446-459.
- Shanmugaiah, V., Mathivanan, N., Varghese, B. (2010). Purification, crystal structure and antimicrobial activity of phenazine-1-carboxamide produced by a growth-promoting biocontrol bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* MML2212. *J. Appl. Microbiol.* 108(2), 703-711.
- Sharma, R.R., Singh, D., Singh, R. (2009). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biol. Control.* 50(3), 205-221.
- Sheehy, R.E., Honma, M., Yamada, M., Sasaki, T., Martineau, B., Hiatt, W. R. (1991). Isolation, sequence, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas* sp. strain *acp* gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *J. Bacteriol.* 173(17), 5260-5265.
- Shivas, R.G., Grice, K.R.E., Young, A.J. (2011). *Ramichloridium* spp. on Musa in northern Queensland: introducing *Ramichloridium ducassei* sp. nov. on leaf streaks of Ducasse banana. *Australas. Plant Path.* 40, 61-65.
- Soto-Muñoz, L., Teixidó, N., Usall, J., Viñas, I., Abadias, M., Torres, R. (2015). Molecular tools applied to identify and quantify the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2 in postharvest treatments on oranges. *Postharvest Biol. Technol.* 100, 151-159.
- Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol. Microbiol.* 56(4), 845-857.
- Stepanović, S., Ćirković, I., Mijač, V., Švabić-Vlahović M. (2003) Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. *Food Microbiol.* 20, 339–343.

- Strange, R.N., Scott, P.R. (2005). Plant disease: a threat to global food security. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, 83-116.
- Sylla, J., Alsanus, B.W., Krüger, E., Reineke, A., Strohmeier, S., Wohanka, W. (2013). Leaf microbiota of strawberries as affected by biological control agents. *Phytopathology.* 103, 1001-1011.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725-2729.
- Tedersoo, L., Anslan, S., Bahram, M., Põlme, S., Riit, T., Liiv, I. et al., (2015). Shotgun metagenomes and multiple primer pair-barcode combinations of amplicons reveal biases in metabarcoding analyses of fungi. *MycoKeys.* 10, 1-43.
- Thomashow, L.S., Weller, D.M. (1996). “Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: mechanisms and antifungal metabolites”, in *Plant-microbe interactions*, eds G. Stacey, N.T. Keen, (Boston, MA: Springer), 187-235.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25, 4876-4882.
- Tontou, R., Gaggia, F., Baffoni, L., Devescovi, G., Venturi, V., Giovanardi, D., Stefani, E. (2016). Molecular characterisation of an endophyte showing a strong antagonistic activity against *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Plant Soil.* 405(1-2), 97-106.
- Trischman, J. A., Oeffner, R.E., de Luna, M.G., Kazaoka, M. (2004). Competitive induction and enhancement of indole and a diketopiperazine in marine bacteria. *Mar. Biotechnol.* 6(3), 215-220.
- Tsuge, K., Inoue, S., Ano, T., Itaya, M., Shoda, M. (2005). Horizontal transfer of iturin A operon, *itu*, to *Bacillus subtilis* 168 and conversion into an iturin A producer. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 4641-4648.
- Vacher, C., Hampe, A., Porté, A.J., Sauer, U., Compant, S., Morris, C.E. (2016). The phyllosphere: microbial jungle at the plant–climate interface. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 47, 1-24.

- Vasić, V., Gašić, U., Stanković, D., Lušić, D., Vukić-Lušić, D., Milojković-Opsenica, et al. (2019). Towards better quality criteria of European honeydew honey: Phenolic profile and antioxidant capacity. *Food Chem.* 274, 629-641.
- Végh, A., Némethy, Z., Hajagos, L., Palkovics, L. (2012) First report of *Erwinia amylovora* causing fire blight on plum (*Prunus domestica*) in Hungary. *Plant Dis.* **96**, 759-759.
- Vepškaitė-Monstavičė, I., Lukša, J., Stanevičienė, R., Strazdaitė-Žielienė, Ž., Yurchenko, V., Serva, S. et al. (2018). Distribution of apple and blackcurrant microbiota in Lithuania and the Czech Republic. *Microbiol. Res.* 206, 1-8.
- Vorholt, J.A. (2012). Microbial life in the phyllosphere. *Nat. Rev. Microbiol.* 10(12), 828.
- Wakefield, J., Hassan, H.M., Jaspars, M., Ebel, R., Rateb, M.E. (2017). Dual induction of new microbial secondary metabolites by fungal bacterial co-cultivation. *Front. Microbiol.* 8, 1284.
- Walterson, A.M., Stavrinides, J. (2015). *Pantoea*: insights into a highly versatile and diverse genus within the Enterobacteriaceae. *EMS Microbiol. Rev.* 39(6), 968-984.
- Wang, M., Liu, F., Crous, P.W., Cai, L. (2017). Phylogenetic reassessment of *Nigrospora*: ubiquitous endophytes, plant and human pathogens. *Persoonia.* 39, 118.
- Wang, X., Xue, Y., Han, M., Bu, Y., Liu, C. (2014). The ecological roles of *Bacillus thuringiensis* within phyllosphere environments. *Chemosphere.* 108, 258-264.
- Wechter, W.P., Begum, D., Presting, G., Kim, J.J., Wing, R.A., Kluepfel, D.A. (2002). Physical mapping, BAC-end sequence analysis, and marker tagging of the soilborne nematicidal bacterium, *Pseudomonas synxantha* BG33R. *Omic.* 6, 11-21.
- Wenneker, M., Janse, J.D., De Bruine, A., Vink, P., Pham, K. (2012). Bacterial canker of plum caused by *Pseudomonas syringae* pathovars, as a serious threat for plum production in the Netherlands. *J. Plant Pathol.* 94, 1-11.
- Wensing, A., Braun, S.D., Büttner, P., Expert, D., Völksch, B., Ullrich, M.S., Weingart, H. (2010). Impact of siderophore production by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 22d/93 on epiphytic fitness and biocontrol activity against *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* 1a/96. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(9), 2704-2711.

- Whipps, J., Hand, P., Pink, D., Bending, G.D. (2008). Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. *J. Appl. Microbiol.* 105(6), 1744-1755.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S.J.W.T., Taylor, J.L. (1990). „Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics,” in: *PCR protocols - a guide to methods and applications*, eds M.A Innis, D.H Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White (London: Academic Press), 482.
- Williams, T.R., Marco, M.L. (2014). Phyllosphere microbiota composition and microbial community transplantation on lettuce plants grown indoors. *MBio.* 5, e01564-14.
- Yashiro, E., Spear, R.N., McManus, P.S. (2011). Culture-dependent and culture-independent assessment of bacteria in the apple phyllosphere. *J. Appl. Microbiol.* 110, 1284-1296.
- Yin, G., Zhang, Y., Pennerman, K., Wu, G., Hua, S., Yu, J. et al. (2017). Characterization of blue mold *Penicillium* species isolated from stored fruits using multiple highly conserved loci. *J. Fungi.* 3(1), 12.
- Zhang, D., Spadaro, D., Garibaldi, A., Gullino, M.L. (2010). Efficacy of the antagonist *Aureobasidium pullulans* PL5 against postharvest pathogens of peach, apple and plum and its modes of action. *Biol. Control.* 54(3), 172-180.
- Zhang, Z., Nan, Z. (2014). *Erwinia persicina*, a possible new necrosis and wilt threat to forage or grain legumes production. *Eur. J. Plant Pathol.* 139(2), 349-358.
- Zhou, Y., Choi, Y.L., Sun, M., Yu, Z. (2008). Novel roles of *Bacillus thuringiensis* to control plant diseases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80, 563-572.

8. PRILOZI

8. PRILOZI

Prilog 1. Ukupan broj očitanih baznih parova, sekvenci, GC (%), Q20 (%), i Q30 (%) podaci za V1-V3 16S rRNK biblioteku amplikona.

Uzorak	Očitani bazni parovi (bp)	Ukupna očitavanja	GC (%)	AT (%)	Q20 (%)	Q30 (%)
Maj						
1-Lepotica-1	78 126 882	261 820	54,966	45,03	84,702	75,176
2-Rodna-1	78 495 073	262 572	55,159	44,84	85,220	75,845
3-Požegača-1	82 551 758	276 042	53,269	46,73	85,398	76,219
4-Ranka-1	82 204 812	274 510	55,006	44,99	85,390	76,156
Juli						
5-Lepotica-2	84 081 786	281 246	55,501	44,50	84,583	75,197
6-Rodna-2	77 124 205	258 280	55,492	44,51	84,239	74,581
7-Požegača-2	79 446 856	265 704	55,319	44,68	85,002	75,634
8-Ranka-2	73 960 418	247 380	55,313	44,69	84,921	75,468

Prilog 2. Relativna učestalost (RA) predstavnika bakterija u svim uzorcima na nivou razdela (a), familije (b) i roda (c).

a) Razdeo

Razdeo	Čačanska lepotica		Čačanska rodna		Ranka		Požegača	
	Maj	Juli	Maj	Juli	Maj	Juli	Maj	Juli
[Thermi]	0,000	0,211	0,355	0,751	0,084	0,322	0,055	0,281
Acidobacteria	0,074	0,445	0,200	0,118	0,077	0,104	0,073	0,032
Actinobacteria	1,702	13,106	10,897	10,468	3,227	10,142	1,202	11,177
Armatimonadetes	0,000	0,088	0,000	0,007	0,000	0,002	0,000	0,004
Bacteroidetes	5,969	12,033	18,893	19,076	10,425	12,701	7,905	17,998
Chlamydiae	0,000	0,011	0,004	0,039	0,000	0,017	0,000	0,009
Chloroflexi	0,000	0,011	0,009	0,000	0,000	0,004	0,003	0,000
Cyanobacteria	0,000	0,000	0,024	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Deferribacteres	0,007	0,000	0,000	0,005	0,003	0,002	0,004	0,000
FBP	0,000	0,006	0,000	0,037	0,000	0,009	0,000	0,016
Firmicutes	0,166	0,128	0,596	0,104	6,940	0,613	0,291	0,193
Gemmatimonadetes	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000
Planctomycetes	0,017	0,008	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000
Proteobacteria	91,832	73,916	69,013	69,388	79,231	76,079	90,458	70,285
Tenericutes	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
TM7	0,000	0,018	0,004	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000
Verrucomicrobia	0,000	0,018	0,000	0,002	0,013	0,002	0,009	0,005

b) Familija

Familija	Čačanska lepotica		Čačanska rodna		Ranka		Požegača	
	Maj	Juli	Maj	Juli	Maj	Juli	Maj	Juli
Acetobacteraceae	0,000	2,316	2,303	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Comamonadaceae	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	2,213
Cytophagaceae	5,489	10,753	16,493	17,514	9,391	11,952	7,487	17,777
Enterobacteriaceae	16,010	13,146	13,311	0,000	47,634	0,000	32,271	0,000
Kineosporiaceae	0,000	0,000	4,717	4,586	0,000	4,603	0,000	3,279
Lactobacillaceae	0,000	0,000	0,000	0,000	4,637	0,000	0,000	0,000
Methylobacteriaceae	0,000	19,326	4,719	21,623	0,000	26,742	0,000	19,778
Methylocystaceae	0,000	3,505	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Microbacteriaceae	0,000	9,450	5,306	5,161	0,000	5,008	0,000	7,245
mitochondria	15,600	2,575	4,840	7,820	0,000	4,553	0,000	3,272
Oxalobacteraceae	2,457	2,702	14,327	4,906	11,621	3,277	17,341	4,986
Pseudomonadaceae	51,682	3,260	9,610	5,926	6,438	15,554	23,529	9,232
Sphingobacteriaceae	0,000	0,000	2,372	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Sphingomonadaceae	3,290	22,489	16,875	22,135	8,969	20,451	12,541	27,680

c) Rod

Rod	Čačanska lepotica		Čačanska rodna		Ranka		Požegača	
	Maj	Juli	Maj	Juli	Maj	Juli	Maj	Juli
<i>Acetobacter</i>	0,000	0,034	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Acidovorax</i>	0,040	0,032	0,020	0,188	0,069	0,533	0,089	0,538
<i>Acinetobacter</i>	0,000	0,005	0,016	0,007	0,000	0,000	0,000	0,005
<i>Adhaeribacter</i>	0,000	0,000	0,008	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Aeromicrobium</i>	0,000	0,002	0,008	0,007	0,000	0,007	0,000	0,042
<i>Agrobacterium</i>	0,000	1,327	0,000	0,057	0,012	0,106	0,000	0,324
<i>Agromyces</i>	0,000	0,005	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Akkermansia</i>	0,000	0,017	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000	0,007
<i>Allobaculum</i>	0,000	0,000	0,008	0,000	0,018	0,005	0,000	0,005
<i>Arthrobacter</i>	0,000	0,000	0,008	0,000	0,030	0,005	0,000	0,007
<i>Bacillus</i>	0,076	0,049	0,090	0,057	0,054	0,017	0,069	0,005
<i>Bacteroides</i>	0,000	0,007	0,000	0,000	0,006	0,000	0,000	0,000
<i>Balneimonas</i>	0,000	0,012	0,000	0,007	0,000	0,002	0,000	0,000
<i>Bdellovibrio</i>	0,020	0,242	0,053	0,421	0,015	0,106	0,002	0,072
<i>Bifidobacterium</i>	0,010	0,000	0,008	0,007	0,009	0,101	0,004	0,005
<i>Blastomonas</i>	0,000	0,000	0,000	0,013	0,000	0,035	0,000	0,005
<i>Bosea</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,005
<i>Brachybacterium</i>	0,000	0,000	0,012	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Brownia</i>	0,015	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Buchnera</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	42,908	0,000
<i>Bulleidia</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,005
<i>Burkholderia</i>	0,000	0,056	0,000	0,003	0,006	0,000	0,000	0,000
<i>Candidatus Cardinium</i>	0,000	0,056	0,000	0,010	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Carnobacterium</i>	0,010	0,000	0,000	0,000	0,012	0,000	0,007	0,000
<i>Cellulomonas</i>	0,015	0,007	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Chelatococcus</i>	0,000	0,017	0,004	0,013	0,000	0,010	0,000	0,009
<i>Chromohalobacter</i>	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,005	0,000	0,005
<i>Chroococcidiopsis</i>	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Chryseobacterium</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000
<i>Citrobacter</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,007	0,000
<i>Clavibacter</i>	0,000	0,010	0,012	0,061	0,003	0,022	0,000	0,002
<i>Clostridium</i>	0,000	0,000	0,041	0,003	0,042	0,000	0,011	0,000
<i>Comamonas</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000
<i>Corynebacterium</i>	0,040	0,005	0,033	0,000	0,012	0,002	0,020	0,012
<i>Cryocola</i>	0,000	0,005	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Curtobacterium</i>	0,282	5,175	2,363	3,089	1,073	1,100	0,080	2,255
<i>DA101</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,018	0,000	0,013	0,000
<i>Deinococcus</i>	0,347	0,318	0,664	1,093	0,238	0,429	0,072	0,372
<i>Delftia</i>	0,000	0,034	0,000	0,037	0,000	0,035	0,000	0,023
<i>Dermacoccus</i>	0,000	0,005	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Devosia</i>	0,010	0,032	0,000	0,037	0,000	0,017	0,000	0,012
<i>Diaphorobacter</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,005
<i>Didymeles</i>	0,005	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Dorea</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,005
<i>Dyadobacter</i>	0,000	0,002	0,004	0,007	0,000	0,000	0,000	0,035
<i>Enterobacter</i>	4,370	5,557	0,102	0,098	0,455	0,101	0,290	0,293
<i>Enterococcus</i>	0,035	0,002	0,024	0,000	0,084	0,005	0,058	0,019
<i>Epulopiscium</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,012	0,000	0,000	0,000
<i>Erwinia</i>	1,662	4,332	1,369	0,024	5,901	0,118	0,032	0,154
<i>Exiguobacterium</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,005
<i>Facklamia</i>	0,000	0,000	0,008	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

<i>Fimbriimonas</i>	0,000	0,022	0,000	0,010	0,000	0,002	0,000	0,000
<i>Flavisolibacter</i>	0,000	0,005	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Friedmanniella</i>	0,086	1,482	0,721	0,343	0,024	0,143	0,009	0,081
<i>Frondehabitans</i>	0,005	0,010	0,000	0,000	0,006	0,007	0,000	0,014
<i>Geobacillus</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,012	0,000	0,000	0,000
<i>Geodermatophilus</i>	0,000	0,000	0,012	0,003	0,000	0,000	0,004	0,000
<i>Gluconobacter</i>	0,000	0,105	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Granulicatella</i>	0,000	0,005	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Halanaerobium</i>	0,005	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Halomonas</i>	0,000	0,000	0,000	0,010	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Hydrogenophilus</i>	0,000	0,000	0,016	0,010	0,000	0,002	0,002	0,000
<i>Hymenobacter</i>	8,121	15,404	30,375	24,692	26,441	15,590	10,195	23,027
<i>Janthinobacterium</i>	0,010	0,105	0,200	0,071	0,283	0,044	0,141	0,063
<i>Jeotgalicoccus</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000
<i>Kaistobacter</i>	0,000	0,002	0,000	0,003	0,000	0,002	0,002	0,000
<i>Kineococcus</i>	1,143	2,456	8,029	5,612	3,368	5,604	0,817	3,996
<i>Kineosporia</i>	0,000	0,002	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Klebsiella</i>	0,584	0,000	0,004	0,000	0,054	0,000	0,032	0,026
<i>Kocuria</i>	0,000	0,000	0,008	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Labrys</i>	0,000	0,000	0,000	0,007	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Lactobacillus</i>	0,060	0,029	0,098	0,017	13,029	0,631	0,065	0,047
<i>Legionella</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,026
<i>Leucobacter</i>	0,000	0,056	0,024	0,044	0,000	0,025	0,000	0,040
<i>Luteibacter</i>	0,000	0,659	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Massilia</i>	0,005	0,007	0,081	0,010	0,081	0,010	0,007	0,007
<i>Megasphaera</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,005
<i>Methylibium</i>	0,000	0,015	0,000	0,047	0,000	0,000	0,000	0,009
<i>Methylobacterium</i>	2,034	28,518	8,570	30,429	3,657	34,211	1,664	25,140
<i>Microbacterium</i>	0,000	0,012	0,008	0,000	0,003	0,002	0,000	0,016
<i>Micrococcus</i>	0,020	0,002	0,004	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000
<i>Modestobacter</i>	0,000	0,000	0,012	0,000	0,000	0,000	0,017	0,000
<i>Mucispirillum</i>	0,010	0,000	0,000	0,007	0,009	0,002	0,006	0,000
<i>Mycetocola</i>	0,000	0,005	0,004	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000
<i>Mycoplana</i>	0,000	0,000	0,012	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Nocardioides</i>	0,000	0,007	0,020	0,003	0,000	0,007	0,000	0,009
<i>Nonomuraea</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,012	0,000	0,000	0,000
<i>Novosphingobium</i>	0,000	0,610	0,033	0,098	0,027	0,153	0,009	0,035
<i>Oerskovia</i>	0,005	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,021
<i>Paenibacillus</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,004	0,012
<i>Paludibacter</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000
<i>Parabacteroides</i>	0,000	0,015	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Parachlamydia</i>	0,000	0,012	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Paracoccus</i>	0,000	0,000	0,041	0,000	0,000	0,002	0,000	0,009
<i>Patulibacter</i>	0,000	0,010	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,002
<i>Paucibacter</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,002
<i>Pedobacter</i>	0,010	0,059	0,057	0,071	0,015	0,007	0,039	0,135
<i>Phaeoceros</i>	0,000	0,032	0,000	0,003	0,000	0,002	0,000	0,002
<i>Phenylobacterium</i>	0,000	0,000	0,012	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Polaromonas</i>	0,000	0,007	0,000	0,007	0,000	0,002	0,000	0,009
<i>Propionibacterium</i>	0,010	0,000	0,004	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000
<i>Proteiclasticum</i>	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000
<i>Proteus</i>	0,000	0,000	0,004	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000
<i>Pseudoclavibacter</i>	0,000	0,007	0,004	0,013	0,000	0,005	0,000	0,002
<i>Pseudomonas</i>	75,938	4,388	16,029	7,927	17,102	18,856	26,263	11,032
<i>R18-435</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000

<i>Rathayibacter</i>	0,000	0,000	0,004	0,003	0,000	0,005	0,002	0,030
<i>Rhizobium</i>	0,000	0,069	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Rhodobacter</i>	0,000	0,000	0,000	0,007	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Rhodococcus</i>	0,000	0,059	0,029	0,017	0,015	0,002	0,013	0,044
<i>Rhodoferax</i>	0,000	0,015	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Rhodoplanes</i>	0,000	0,002	0,000	0,007	0,000	0,000	0,002	0,002
<i>Rickettsia</i>	0,000	0,010	0,000	0,013	0,000	0,002	0,004	0,005
<i>Roseburia</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,007	0,000
<i>Roseomonas</i>	0,000	0,005	0,000	0,024	0,000	0,000	0,000	0,002
<i>Rubellimicrobium</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,009	0,000
<i>Rubrivivax</i>	0,000	0,000	0,008	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Rubroacter</i>	0,000	0,002	0,000	0,000	0,009	0,000	0,002	0,000
<i>Salinibacterium</i>	0,000	0,015	0,012	0,003	0,003	0,030	0,000	0,019
<i>Sanguibacter</i>	0,000	0,005	0,000	0,007	0,000	0,000	0,004	0,005
<i>Selenomonas</i>	0,000	0,007	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Serratia</i>	0,010	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,011	0,000
<i>Skermanella</i>	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>SMB53</i>	0,005	0,000	0,033	0,000	0,006	0,000	0,009	0,002
<i>Sphaerisorangium</i>	0,015	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Sphingomonas</i>	4,683	26,581	30,008	24,171	24,876	21,290	16,303	31,238
<i>Sphingopyxis</i>	0,000	0,017	0,008	0,013	0,033	0,025	0,455	0,005
<i>Spirosoma</i>	0,035	0,813	0,029	0,498	0,006	0,079	0,013	0,156
<i>Sporosarcina</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,015	0,000	0,000	0,005
<i>Staphylococcus</i>	0,000	0,000	0,008	0,000	0,003	0,000	0,000	0,002
<i>Stenotrophomonas</i>	0,141	0,032	0,049	0,124	0,063	0,190	0,052	0,130
<i>Streptococcus</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006	0,000
<i>Swaminathania</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,007	0,000	0,000
<i>Terriglobus</i>	0,111	0,573	0,342	0,172	0,193	0,136	0,082	0,042
<i>Tetragenococcus</i>	0,015	0,005	0,033	0,003	0,021	0,000	0,000	0,014
<i>Truepera</i>	0,000	0,005	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Turcibacter</i>	0,000	0,002	0,037	0,000	0,018	0,000	0,019	0,028
<i>Variovorax</i>	0,000	0,284	0,012	0,225	0,000	0,146	0,019	0,270
<i>Wautersiella</i>	0,000	0,061	0,102	0,000	0,157	0,000	0,000	0,002
<i>Weissella</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	2,370	0,000	0,024	0,005
<i>Williamsia</i>	0,000	0,012	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Wolbachia</i>	0,000	0,010	0,000	0,024	0,009	0,000	0,006	0,000

Prilog 3. Procentualna zastupljenost predstavnika bakterijskih rodova u odnosu na sve izolate poreklom iz dve fenološke faze sorti Čačanska leptica, Čačanska rodna, Požegača i Ranka.

Rod	Čačanska rodna		Čačanska leptica		Požegača		Ranka		Ukupan broj izolata	%
	Maj	Juli	Maj	Juli	Maj	Juli	Maj	Juli		
<i>Arthrobacter</i>			1				1		2	2,35
<i>Bacillus</i>			1				2		3	3,53
<i>Clavibacter</i>							1		1	1,18
<i>Curtobacterium</i>	2	3		3		1		2	11	12,94
<i>Erwinia</i>			1						1	1,18
<i>Frigoribacterium</i>						2		1	3	3,53
<i>Fron dih abitans</i>	1			1		1			3	3,53
<i>Micrococcus</i>	1								1	1,18
<i>Oerskovia</i>						2			2	2,35
<i>Pantoea</i>	2		2	1	1		1		7	8,24
<i>Pseudarthrobacter</i>			3						3	3,53
<i>Pseudomonas</i>	5	2	4	4	6	4	6	5	36	42,35
<i>Rahnella</i>			2		1				3	3,53
<i>Sanguibacter</i>		1							1	1,18
<i>Sphingomonas</i>	1			1		1			3	3,53
<i>Staphylococcus</i>	2				1		1		4	4,71
<i>Terribacillus</i>					1				1	1,18

Prilog 4. Procentualna zastupljenost vrsta bakterija u odnosu na sve izolate poreklom iz dve fenološke faze sorti Čačanska lepotica, Čačanska rodna, Požegača i Ranka.

Vrsta	Čačanska rodna		Čačanska lepotica		Požegača		Ranka		Ukupan broj izolata	%
	Maj	Juli	Maj	Juli	Maj	Juli	Maj	Juli		
<i>Arthrobacter luteolus</i>							1		1	1,18
<i>Arthrobacter oxydans</i>			1						1	1,18
<i>Bacillus thuringiensis</i>							1		1	1,18
<i>Bacillus megaterium</i>							1		1	1,18
<i>Bacillus niacini</i>			1						1	1,18
<i>Clavibacter michiganensis s</i>							1		1	1,18
<i>Curtobacterium albidum</i>		1							1	1,18
<i>Curtobacterium citreum</i>	2	1							3	3,53
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>				2		1		2	5	5,88
<i>Curtobacterium herbarum</i>		1		1					2	2,35
<i>Erwinia persicina</i>			1						1	1,18
<i>Frigoribacterium faeni</i>						2		1	3	3,53
<i>Frondihabitans peucedani</i>				1		1			2	2,35
<i>Frondihabitans sucicola</i>	1								1	1,18
<i>Micrococcus aloeverae</i>	1								1	1,18
<i>Oerskovia turbata</i>						2			2	2,35
<i>Pantoea agglomerans</i>	2		1	1	1		1		6	7,06
<i>Pantoea ananatis</i>			1						1	1,18
<i>Pseudarthrobacter sulfonivorans</i>			3						3	3,53
<i>Pseudomonas fluorescens</i>				1					1	1,18
<i>Pseudomonas orientalis</i>							1		1	1,18
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>			1						1	1,18

<i>Pseudomonas rhizosphaerae</i>	1						1	2	2,35	
<i>Pseudomonas synxantha/mucidolens</i>			1	2				3	3,53	
<i>Pseudomonas syringae grupa</i>	1	1	2		2	2	1	9	10,59	
<i>Pseudomonas graminis</i>	3	1		3	4	2	3	3	19	22,35
<i>Rahnella woolbedingensis</i>			2		1				3	3,53
<i>Sanguibacter keddieii</i>		1							1	1,18
<i>Sphingomonas dokdonensis</i>				1		1			2	2,35
<i>Sphingomonas glacialis</i>	1								1	1,18
<i>Staphylococcus warneri</i>	2				1		1		4	4,71
<i>Therribacillus goriensis</i>					1				1	1,18

Prilog 5. Ukupan broj očitanih baznih parova, sekvenci, GC (%), Q20 (%), i Q30 (%) podaci za 3F-4R ITS2 biblioteku amplikona.

Uzorak	Očitani bazni parovi (bp)	Ukupna očitavanja	GC (%)	AT (%)	Q20 (%)	Q30 (%)
Maj						
9-Lepotica-1	90 948 956	302 156	50,63	49,37	83,36	74,62
10-Rodna-1	80 082 254	266 054	50,34	49,66	82,41	73,81
11-Požegača-1	82 458 348	273 948	49,47	50,53	82,71	74,38
12-Ranka-1	90 960 394	302 194	48,92	51,08	84,02	75,49
Juli						
13-Lepotica-2	89 856 326	298 526	50,01	49,99	83,27	74,73
14-Rodna-2	75 508 860	250 860	54,95	45,05	79,34	70,45
15-Požegača-2	74 439 106	247 306	49,47	50,53	81,53	73,11
16-Ranka-2	81 299 498	270 098	50,15	49,85	82,20	73,84

Prilog 6. Relativna učestalost (RA) predstavnika gljiva u svim uzorcima na nivou razdela (a), familije (b), roda (c) i vrste (d).

a) Razdeo

Razdeo	Čačanska lepotica		Čačanska rodna		Požeगाča		Ranka	
	Maj	Juli	Maj	Juli	Maj	Juli	Maj	Juli
Ascomycota	77,00	89,00	79,00	87,00	46,00	56,00	77,00	85,00
Basidiomycota	23,00	10,00	20,00	11,00	53,00	44,00	21,00	14,00
Glomeromycota	0,00	0,00	0,00	2,00	0,00	0,00	0,00	0,00

b) Familija

Familija	Čačanska lepotica		Čačanska rodna		Požeगाča		Ranka	
	Maj	Juli	Maj	Juli	Maj	Juli	Maj	Juli
Dothioraceae	18,611	2,439	30,319	11,547	33,440	28,983	23,734	5,018
Incertae sedis	17,744	5,770	13,358	8,789	49,133	40,691	14,459	9,033
Cordycipitaceae	16,136	3,543	2,397	0,958	0,645	0,474	0,704	0,761
Mycosphaerellaceae	14,480	31,772	15,755	20,708	4,209	14,417	12,929	12,146
Sclerotiniaceae	8,493	11,300	5,249	0,561	4,717	0,199	14,059	7,826
Taphrinaceae	3,357	0,511	6,335	2,279	1,313	1,522	7,054	2,496
Dothideaceae	2,584	1,081	3,735	0,668	0,819	1,558	0,692	0,376
Cystofilobasidiaceae	2,398	0,071	1,462	0,126	1,930	0,754	1,651	0,180
Metschnikowiaceae	1,578	0,041	0,024	0,019	0,013	0,000	0,085	37,476
Botryosphaeriaceae	1,176	0,170	0,264	0,054	0,055	0,003	0,304	0,077
Pleosporaceae	0,835	1,786	1,622	2,495	0,384	1,311	2,780	0,941
Pseudeurotiaceae	0,634	0,229	3,803	0,522	0,082	0,233	0,364	0,511
Teratosphaeriaceae	0,588	1,410	0,292	0,475	0,008	0,124	0,388	1,324
Saccharomycetaceae	0,480	0,423	1,458	2,796	0,057	0,028	0,838	0,402
Elsinoaceae	0,464	0,335	1,710	3,704	0,233	0,988	1,093	1,886
Collemataceae	0,402	0,065	0,080	0,036	0,101	0,019	0,206	0,061
Phaeosphaeriaceae	0,309	0,188	0,475	0,779	0,172	0,327	0,801	0,729
Leptosphaeriaceae	0,248	0,012	0,144	0,173	0,053	0,070	0,146	0,190
Nectriaceae	0,232	0,123	0,000	21,541	0,004	0,057	0,024	0,084
Diversisporaceae	0,155	0,458	0,819	2,069	0,038	0,037	0,789	0,424
Glomeraceae	0,155	0,593	0,264	0,216	0,034	0,041	0,571	0,337
Trichocomaceae	0,139	0,094	0,032	5,811	0,017	0,018	0,073	0,379
Marasmiaceae	0,124	0,329	0,320	0,148	0,053	0,151	0,571	0,353
Herpotrichiellaceae	0,108	0,364	0,276	1,029	0,044	0,293	0,595	0,360
Diaporthaceae	0,093	0,000	0,064	0,021	0,004	0,008	0,000	0,010
Mycocaliciaceae	0,077	0,082	0,020	0,054	0,000	0,000	0,036	0,035
Tricholomataceae	0,077	0,035	0,020	0,047	0,038	0,056	0,134	0,170
Chaetothyriaceae	0,062	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Kondoaceae	0,062	0,035	0,032	0,084	0,004	0,026	0,012	0,132
Agaricostilbaceae	0,046	0,217	0,108	0,374	0,046	0,314	0,291	0,642
Teloschistaceae	0,046	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Amphisphaeriaceae	0,031	0,029	0,012	0,019	0,000	0,003	0,000	0,006

Davidiellaceae	0,031	0,071	0,040	0,176	0,029	0,067	0,000	0,109
Myxotrichaceae	0,031	0,000	0,000	0,004	0,000	0,001	0,000	0,000
Parmeliaceae	0,015	0,135	0,028	0,002	0,004	0,000	0,134	0,019
Agaricaceae	0,000	0,012	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Apiosporaceae	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,024	0,000
Archaeosporaceae	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,036	0,000
Bolbitiaceae	0,000	0,012	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Caliciaceae	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000
Calosphaeriaceae	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Ceratobasidiaceae	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,013
Chionosphaeraceae	0,000	0,000	0,000	0,006	0,000	0,000	0,000	0,010
Clavicipitaceae	0,000	0,000	0,000	0,019	0,000	0,000	0,000	0,055
Corticaceae	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,010
Cucurbitariaceae	0,000	0,000	0,040	0,024	0,000	0,003	0,000	0,006
Cystobasidiaceae	0,000	0,065	0,012	0,002	0,034	0,035	0,036	0,096
Dermateaceae	0,000	0,129	0,016	0,011	0,002	0,000	0,000	0,235
Erysiphaceae	0,000	0,000	0,024	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000
Exobasidiaceae	0,000	0,106	0,008	0,073	0,000	0,004	0,073	0,051
Gloeophyllaceae	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,003	0,073	0,000
Glomerellaceae	0,000	0,012	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Gloniaceae	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000
Gnomoniaceae	0,000	0,006	0,004	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000
Helotiaceae	0,000	0,000	0,012	0,000	0,004	0,008	0,036	0,010
Hyaloscyphaceae	0,000	0,000	0,000	0,013	0,000	0,001	0,000	0,010
Hymenochaetaceae	0,000	0,047	0,036	0,023	0,006	0,006	0,085	0,019
Hypocreaceae	0,000	6,070	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000
Inocybaceae	0,000	0,000	0,004	0,011	0,000	0,005	0,000	0,010
Leucosporidiaceae	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,014	0,000	0,000
Lobariaceae	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,061	0,000
Lophiostomataceae	0,000	0,018	0,048	0,008	0,000	0,001	0,036	0,006
Magnaporthaceae	0,000	0,000	0,000	0,008	0,000	0,000	0,000	0,000
Malasseziaceae	0,000	0,029	0,004	0,045	0,008	0,004	0,000	0,042
Massariaceae	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000
Microstromataceae	0,000	0,012	0,028	0,008	0,000	0,000	0,000	0,000
Montagnulaceae	0,000	0,000	0,024	0,017	0,006	0,012	0,049	0,006
Mycenaceae	0,000	0,000	0,000	0,000	0,011	0,001	0,000	0,000
Onygenaceae	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,073	0,000
Ophiostomataceae	0,000	0,000	0,012	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Physalacriaceae	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,010
Physciaceae	0,000	0,000	0,004	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000
Pichiaceae	0,000	0,229	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Protomycetaceae	0,000	0,000	0,008	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000
Psathyrellaceae	0,000	0,035	0,012	0,023	0,006	0,012	0,000	0,013
Pyronemataceae	0,000	0,000	0,008	0,000	0,000	0,000	0,036	0,000
Ramalinaceae	0,000	0,006	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Rhizopodaceae	0,000	0,000	0,044	0,002	0,000	0,000	0,000	0,003
Rhytismataceae	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006
Russulaceae	0,000	0,018	0,000	0,000	0,000	0,000	0,036	0,000
Rutstroemiaceae	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,005	0,000	0,000
Saccharomycetaceae	0,000	18,804	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006
Saccharomycopsidaceae	0,000	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Sarcosomataceae	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,013
Schizoporaceae	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006
Septobasidiaceae	0,000	0,029	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006
Sordariaceae	0,000	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000
Spizellomycetaceae	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000
Sporormiaceae	0,000	0,029	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Strophariaceae	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000
Trichosporonaceae	0,000	0,012	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000
Uropyxidaceae	0,000	0,012	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000
Ustilaginaceae	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006	0,000	0,024	0,000
Venturiaceae	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,061	0,636

c) Rod

Rod	Čačanska leptotica		Čačanska rodna		Požegača		Ranka	
	Maj	Juli	Maj	Juli	Maj	Juli	Maj	Juli
<i>Aureobasidium</i>	19,267	2,156	28,292	11,654	33,689	29,510	24,368	5,021
<i>Beauveria</i>	17,383	3,725	2,583	0,997	0,651	0,483	0,764	0,791
<i>Cryptococcus</i>	17,267	4,893	12,163	5,681	48,805	39,098	12,276	6,784
<i>Mycosphaerella</i>	15,417	14,950	16,770	19,026	4,188	13,726	13,725	9,885
<i>Didymella</i>	5,883	3,657	5,856	8,970	0,893	4,472	10,788	9,328
<i>Endoconidioma</i>	2,783	1,137	4,017	0,684	0,813	1,521	0,751	0,377
<i>Taphrina</i>	2,633	0,389	4,994	1,830	0,967	0,976	5,558	1,592
<i>Udeniomyces</i>	2,567	0,074	1,537	0,129	1,708	0,769	1,607	0,187
<i>Botrytis</i>	2,150	5,301	2,441	0,186	2,251	0,104	6,099	3,709
<i>Metschnikowia</i>	1,700	0,043	0,026	0,020	0,013	0,000	0,092	38,948
<i>Lasiodiplodia</i>	1,250	0,179	0,284	0,049	0,051	0,003	0,316	0,080
<i>Rhodotorula</i>	1,150	1,730	0,792	0,923	0,076	0,951	1,344	1,866
<i>Lalaria</i>	0,983	0,148	1,834	0,543	0,359	0,576	2,094	1,002
<i>Alternaria</i>	0,850	1,798	1,627	2,514	0,359	1,299	2,779	0,945
<i>Dumontinia</i>	0,817	3,367	1,404	0,180	1,434	0,038	2,937	2,577
<i>Sclerotinia</i>	0,750	1,526	0,827	0,104	0,840	0,021	2,015	1,339
<i>Sydowia</i>	0,717	0,395	4,219	0,354	0,078	0,037	1,212	0,174
<i>Dioszegia</i>	0,583	0,266	0,779	1,109	0,165	1,250	1,304	1,205
<i>Zygosaccharomyces</i>	0,467	0,414	1,511	2,909	0,057	0,029	0,764	0,394
<i>Leptogium</i>	0,433	0,068	0,086	0,037	0,102	0,020	0,224	0,063
<i>Devriesia</i>	0,333	0,791	0,168	0,350	0,004	0,108	0,184	1,072
<i>Elsinoe</i>	0,333	0,290	1,688	3,447	0,208	0,993	0,843	1,786
<i>Erythrobasidium</i>	0,333	0,710	0,779	0,985	0,172	0,540	0,738	1,733
<i>Gibberella</i>	0,250	0,074	0,000	0,092	0,004	0,005	0,000	0,017
<i>Tumularia</i>	0,250	3,280	0,026	0,065	0,036	0,017	0,013	0,080
<i>Sporobolomyces</i>	0,217	0,334	0,499	0,340	0,104	0,453	0,501	1,048
<i>Naevata</i>	0,200	0,192	0,521	0,319	0,059	0,142	0,356	0,190
<i>Phaeosphaeria</i>	0,183	0,117	0,232	0,444	0,102	0,200	0,487	0,397
<i>Diversispora</i>	0,167	0,482	0,883	2,154	0,038	0,038	0,856	0,441
<i>Hannaella</i>	0,167	0,210	0,099	0,059	0,028	0,012	0,053	0,090
<i>Ramularia</i>	0,167	0,642	0,039	0,516	0,049	0,406	0,079	0,901
<i>Bullera</i>	0,150	0,173	0,189	0,147	0,180	0,204	0,290	0,237
<i>Coniothyrium</i>	0,150	0,006	0,090	0,106	0,004	0,014	0,066	0,090

<i>Marasmiellus</i>	0,133	0,346	0,344	0,154	0,053	0,154	0,619	0,354
<i>Sphaceloma</i>	0,117	0,062	0,142	0,377	0,028	0,014	0,316	0,174
<i>Aspergillus</i>	0,100	0,031	0,026	5,967	0,015	0,011	0,013	0,227
<i>Chalara</i>	0,100	0,000	0,039	0,000	0,000	0,000	0,000	0,007
<i>Diaporthe</i>	0,100	0,000	0,039	0,014	0,000	0,003	0,000	0,000
<i>Leptosphaeria</i>	0,100	0,006	0,030	0,033	0,036	0,025	0,066	0,013
<i>Torula</i>	0,100	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Chaenothecopsis</i>	0,083	0,086	0,022	0,057	0,000	0,000	0,040	0,037
<i>Exophiala</i>	0,083	0,297	0,267	1,021	0,036	0,298	0,224	0,337
<i>Leucopaxillus</i>	0,083	0,037	0,022	0,041	0,038	0,057	0,145	0,177
<i>Cyphellophora</i>	0,067	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Kondoa</i>	0,067	0,037	0,034	0,088	0,004	0,026	0,013	0,137
<i>Pringsheimia</i>	0,067	0,012	0,168	0,014	0,011	0,008	0,171	0,020
<i>Rachicladosporium</i>	0,067	0,173	0,133	0,442	0,002	0,087	0,119	0,210
<i>Teratosphaeria</i>	0,067	0,031	0,004	0,059	0,000	0,008	0,000	0,057
<i>Austroplaca</i>	0,050	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Bensingtonia</i>	0,050	0,229	0,116	0,389	0,047	0,320	0,316	0,668
<i>Fibulobasidium</i>	0,050	0,025	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Penicillium</i>	0,050	0,019	0,009	0,084	0,002	0,008	0,066	0,167
<i>Saccharomyces</i>	0,050	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Stemphylium</i>	0,050	0,043	0,022	0,008	0,013	0,020	0,053	0,010
<i>Cladosporium</i>	0,033	0,074	0,043	0,184	0,030	0,069	0,000	0,114
<i>Leptospora</i>	0,033	0,006	0,026	0,068	0,011	0,033	0,000	0,073
<i>Monilinia</i>	0,033	0,049	0,000	0,000	0,000	0,008	0,066	0,017
<i>Peltaster</i>	0,033	0,235	0,017	0,029	0,000	0,003	0,013	0,057
<i>Phaeococcomyces</i>	0,033	0,086	0,026	0,008	0,008	0,001	0,013	0,000
<i>Pseudogymnoascus</i>	0,033	0,000	0,000	0,004	0,000	0,001	0,000	0,000
<i>Seiridium</i>	0,033	0,006	0,009	0,002	0,000	0,003	0,000	0,000
<i>Strelitziana</i>	0,033	0,019	0,000	0,053	0,000	0,018	0,000	0,037
<i>Dexomyces</i>	0,017	0,025	0,030	0,035	0,000	0,011	0,132	0,007
<i>Dothiorella</i>	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,013	0,000
<i>Itersonilia</i>	0,017	0,000	0,039	0,002	0,019	0,000	0,158	0,000
<i>Knufia</i>	0,017	0,025	0,000	0,031	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Mrakiella</i>	0,017	0,000	0,004	0,000	0,679	0,003	0,000	0,000
<i>Peyronellaea</i>	0,017	0,000	0,056	0,084	0,002	0,021	0,105	0,000
<i>Sclerostagonospora</i>	0,017	0,006	0,090	0,000	0,000	0,000	0,000	0,037
<i>Subplenodomus</i>	0,017	0,000	0,009	0,004	0,004	0,000	0,000	0,023
<i>Usnea</i>	0,017	0,117	0,030	0,000	0,000	0,000	0,079	0,020
<i>Abrothallus</i>	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Acicuseptoria</i>	0,000	0,000	0,009	0,006	0,000	0,000	0,000	0,003
<i>Agaricus</i>	0,000	0,012	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Amandinea</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000
<i>Archaeospora</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,040	0,000
<i>Arrhenia</i>	0,000	0,000	0,000	0,008	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Arthrocatena</i>	0,000	0,000	0,009	0,018	0,000	0,004	0,040	0,000
<i>Articulospora</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,008	0,000	0,000
<i>Ascochyta</i>	0,000	0,000	0,000	0,025	0,000	0,012	0,000	0,010
<i>Biatora</i>	0,000	0,006	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Blumeria</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000
<i>Botryozyma</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006	0,000	0,013	0,000
<i>Bulleromyces</i>	0,000	0,037	0,039	0,045	0,049	0,170	0,040	0,093

<i>Cadophora</i>	0,000	0,074	0,052	0,047	0,006	0,017	0,026	0,007
<i>Camarosporium</i>	0,000	0,000	0,000	0,004	0,004	0,000	0,026	0,003
<i>Candida</i>	0,000	0,006	0,000	0,000	0,000	0,063	0,000	0,000
<i>Catenulostroma</i>	0,000	0,019	0,000	0,012	0,000	0,000	0,000	0,027
<i>Cenococcum</i>	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Chaetosphaeronema</i>	0,000	0,000	0,000	0,002	0,004	0,000	0,092	0,023
<i>Chionosphaera</i>	0,000	0,000	0,000	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Ciboria</i>	0,000	0,012	0,000	0,000	0,000	0,000	0,105	0,000
<i>Ciborinia</i>	0,000	0,000	0,009	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000
<i>Cistella</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,010
<i>Claviceps</i>	0,000	0,000	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,057
<i>Clitocybula</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,013
<i>Colletotrichum</i>	0,000	0,012	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Collophora</i>	0,000	0,019	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Coniocessia</i>	0,000	0,111	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Conocybe</i>	0,000	0,012	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Coprinellus</i>	0,000	0,000	0,000	0,010	0,000	0,001	0,000	0,010
<i>Coprinopsis</i>	0,000	0,000	0,013	0,010	0,004	0,011	0,000	0,003
<i>Cryptotrichosporon</i>	0,000	0,012	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000
<i>Curreya</i>	0,000	0,000	0,000	0,008	0,000	0,003	0,000	0,000
<i>Curvibasidium</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,007	0,000	0,003
<i>Cyathicula</i>	0,000	0,000	0,013	0,000	0,000	0,000	0,013	0,000
<i>Cylindrocladiella</i>	0,000	0,000	0,000	0,010	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Cystobasidium</i>	0,000	0,068	0,013	0,002	0,034	0,036	0,040	0,097
<i>Cystofilobasidium</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,216	0,000	0,026	0,000
<i>Dendryphion</i>	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Diplodia</i>	0,000	0,000	0,000	0,008	0,004	0,000	0,000	0,000
<i>Dissoconium</i>	0,000	0,105	0,000	0,332	0,000	0,137	0,000	0,517
<i>Dothidea</i>	0,000	0,000	0,009	0,012	0,015	0,067	0,000	0,013
<i>Dothistroma</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,010
<i>Elmerina</i>	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,040	0,010
<i>Endosporium</i>	0,000	0,000	0,000	0,006	0,013	0,000	0,000	0,000
<i>Epicoccum</i>	0,000	0,025	0,004	0,039	0,000	0,001	0,079	0,017
<i>Exidia</i>	0,000	0,025	0,009	0,016	0,004	0,008	0,040	0,030
<i>Exobasidium</i>	0,000	0,111	0,009	0,076	0,000	0,004	0,079	0,053
<i>Fomitiporia</i>	0,000	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000	0,026	0,000
<i>Fulvoflamma</i>	0,000	0,000	0,026	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Funneliformis</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000
<i>Fusarium</i>	0,000	0,000	0,000	22,121	0,000	0,000	0,000	0,003
<i>Glarea</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,013	0,000
<i>Gloeophyllum</i>	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,003	0,079	0,000
<i>Gnomoniopsis</i>	0,000	0,006	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Hanseniaspora</i>	0,000	19,769	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,007
<i>Hyphodiscus</i>	0,000	0,006	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Inocybe</i>	0,000	0,000	0,004	0,012	0,000	0,005	0,000	0,010
<i>Inonotus</i>	0,000	0,043	0,039	0,023	0,006	0,007	0,066	0,020
<i>Kazachstania</i>	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,105	0,000
<i>Kockovaella</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003
<i>Kurtzmanomyces</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,010
<i>Lachnum</i>	0,000	0,000	0,000	0,014	0,000	0,001	0,000	0,000
<i>Lambertella</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,005	0,000	0,000

<i>Letendraea</i>	0,000	0,049	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Leucosporidium</i>	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,014	0,000	0,000
<i>Lophiostoma</i>	0,000	0,012	0,039	0,004	0,000	0,001	0,013	0,000
<i>Lophodermium</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,007
<i>Malassezia</i>	0,000	0,031	0,004	0,047	0,008	0,004	0,000	0,043
<i>Massaria</i>	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Melanelia</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000
<i>Melanothalea</i>	0,000	0,012	0,000	0,000	0,000	0,000	0,066	0,000
<i>Microstroma</i>	0,000	0,012	0,030	0,008	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Mollisia</i>	0,000	0,000	0,009	0,012	0,002	0,000	0,000	0,000
<i>Monochaetia</i>	0,000	0,000	0,004	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Monographella</i>	0,000	0,000	0,004	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Mycena</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,011	0,001	0,000	0,000
<i>Nannizziopsis</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,079	0,000
<i>Neoerysiphe</i>	0,000	0,000	0,026	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Neosetophoma</i>	0,000	0,000	0,000	0,006	0,000	0,005	0,000	0,000
<i>Occultifur</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003
<i>Ochroconis</i>	0,000	0,000	0,000	0,010	0,000	0,004	0,000	0,023
<i>Papiliotrema</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000
<i>Paraphaeosphaeria</i>	0,000	0,000	0,026	0,018	0,006	0,005	0,053	0,000
<i>Paraphoma</i>	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,013	0,000
<i>Periconia</i>	0,000	0,012	0,060	0,025	0,000	0,009	0,000	0,017
<i>Pezicula</i>	0,000	0,136	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,244
<i>Phacidiella</i>	0,000	0,000	0,013	0,022	0,000	0,029	0,000	0,000
<i>Phaeomycoentrospora</i>	0,000	0,000	0,009	0,000	0,002	0,003	0,013	0,017
<i>Phaeoramularia</i>	0,000	0,043	0,000	0,008	0,008	0,001	0,000	0,003
<i>Phoma</i>	0,000	0,000	0,004	0,012	0,000	0,007	0,000	0,013
<i>Physcia</i>	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Pichia</i>	0,000	0,241	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Plagiostoma</i>	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Plectania</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,013
<i>Plenodomus</i>	0,000	0,000	0,017	0,006	0,000	0,004	0,026	0,003
<i>Powellomyces</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000
<i>Protomyces</i>	0,000	0,000	0,009	0,010	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Psathyrella</i>	0,000	0,037	0,000	0,004	0,002	0,000	0,000	0,000
<i>Pseudocercospora</i>	0,000	0,056	0,004	0,074	0,000	0,018	0,000	0,130
<i>Pseudocyphellaria</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,066	0,000
<i>Psilocybe</i>	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Pyrenochaeta</i>	0,000	0,000	0,017	0,033	0,000	0,000	0,000	0,003
<i>Pyrenochaetopsis</i>	0,000	0,000	0,043	0,018	0,000	0,000	0,000	0,007
<i>Pyrenophora</i>	0,000	0,000	0,077	0,025	0,008	0,007	0,000	0,000
<i>Pyricularia</i>	0,000	0,000	0,000	0,008	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Raffaelea</i>	0,000	0,000	0,013	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Ramichloridium</i>	0,000	16,445	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Rhizophagus</i>	0,000	0,000	0,000	0,010	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Rhizopus</i>	0,000	0,000	0,047	0,002	0,000	0,000	0,000	0,003
<i>Rhodosporidium</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,005	0,000	0,017
<i>Rhynchosporium</i>	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,007
<i>Rinodina</i>	0,000	0,000	0,000	0,010	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Russula</i>	0,000	0,019	0,000	0,000	0,000	0,000	0,040	0,000
<i>Saccharomyces</i>	0,000	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

<i>Sarcinomyces</i>	0,000	0,062	0,004	0,039	0,000	0,004	0,026	0,017
<i>Sarocladium</i>	0,000	0,006	0,000	0,012	0,000	0,000	0,000	0,003
<i>Schizopora</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,007
<i>Septobasidium</i>	0,000	0,031	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,007
<i>Septoria</i>	0,000	0,037	0,039	0,104	0,004	0,033	0,079	0,114
<i>Setomelanomma</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000
<i>Setophaeosphaeria</i>	0,000	0,000	0,000	0,016	0,013	0,003	0,000	0,010
<i>Sigarispora</i>	0,000	0,006	0,013	0,004	0,000	0,000	0,026	0,007
<i>Sordaria</i>	0,000	0,000	0,000	0,018	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Sphaerographium</i>	0,000	0,000	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Sphaerulina</i>	0,000	0,080	0,017	0,229	0,000	0,001	0,026	0,070
<i>Spirosphaera</i>	0,000	0,000	0,000	0,006	0,000	0,003	0,000	0,000
<i>Stachybotrys</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006	0,000	0,000	0,000
<i>Stagonospora</i>	0,000	0,031	0,034	0,041	0,004	0,004	0,053	0,013
<i>Stenella</i>	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,004	0,000	0,017
<i>Strobilurus</i>	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,010
<i>Talaromyces</i>	0,000	0,049	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Tetracladium</i>	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Tetrapisispora</i>	0,000	0,031	0,060	0,000	0,000	0,000	0,040	0,023
<i>Tilletiopsis</i>	0,000	0,000	0,000	0,014	0,000	0,003	0,000	0,000
<i>Togniniella</i>	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Toxicocladosporium</i>	0,000	0,000	0,000	0,006	0,000	0,003	0,000	0,000
<i>Tranzschelia</i>	0,000	0,012	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Tremella</i>	0,000	0,031	0,009	0,010	0,000	0,000	0,000	0,017
<i>Trichoderma</i>	0,000	6,382	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Trimmatostroma</i>	0,000	0,000	0,000	0,002	0,004	0,000	0,000	0,007
<i>Truncatella</i>	0,000	0,000	0,000	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Ulocladium</i>	0,000	0,012	0,000	0,008	0,000	0,007	0,105	0,000
<i>Venturia</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,066	0,661
<i>Xanthophyllomyces</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006	0,000	0,000	0,000
<i>Zymoseptoria</i>	0,000	0,019	0,000	0,008	0,006	0,007	0,000	0,070

d) Vrsta

Vrsta	Čačanska leptotica		Čačanska rodna		Požeगाča		Ranka	
	Maj	Jul	Maj	Jul	Maj	Jul	Maj	Jul
<i>Beauveria felina</i>	16,911	3,223	2,336	0,738	0,853	0,547	0,635	0,386
<i>Aureobasidium pullulans</i>	15,754	1,862	20,958	7,869	19,508	3,221	29,271	21,655
<i>Mycosphaerella tumulosa</i>	14,248	11,785	13,028	13,092	10,869	6,492	3,650	10,366
<i>Cryptococcus wieringae</i>	5,521	0,583	2,458	1,026	5,026	0,971	8,937	24,866
<i>Sclerotiniaceae sp</i>	5,369	1,283	0,981	0,078	3,688	0,363	0,227	0,021
<i>Didymella phacae</i>	5,317	3,303	4,689	6,913	9,209	7,048	0,868	3,668
<i>Cryptococcus sp</i>	4,198	2,195	2,266	1,888	2,320	2,369	3,659	2,095
<i>Endoconidioma populi</i>	2,447	0,904	2,848	0,495	0,491	0,209	0,695	1,135
<i>Metschnikowia sp</i>	2,288	0,009	0,025	0,000	0,175	32,620	0,010	0,001
<i>Botrytis caroliniana</i>	2,171	4,550	1,958	0,189	5,446	2,840	2,188	0,070
<i>Taphrina pruni</i>	1,995	0,286	2,482	0,616	3,300	0,837	0,702	0,559
<i>Cryptococcus victoriae</i>	1,914	0,356	2,806	0,198	0,668	0,683	21,904	3,356
<i>Udeniomyces pannonicus</i>	1,889	0,044	1,284	0,113	1,483	0,156	1,611	0,488
<i>Ascomycota sp</i>	1,567	7,868	1,086	4,574	3,322	12,546	0,223	1,400
<i>Lasiodiplodia macrospora</i>	1,514	0,253	0,167	0,028	0,217	0,073	0,040	0,009
<i>Sporidiobolales sp</i>	1,316	0,570	2,676	0,959	3,182	1,164	2,988	1,626
<i>Cryptococcus carnescens</i>	1,141	0,285	0,738	0,378	1,344	0,327	10,245	1,606
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1,054	0,431	0,168	0,078	0,181	0,121	0,069	0,039
<i>Incertae sedis sp</i>	1,011	0,493	0,844	0,397	1,484	0,436	0,473	0,670
<i>Dumontinia tuberosa</i>	0,980	2,823	1,141	0,133	2,647	1,970	1,471	0,036
<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	0,913	1,140	0,576	0,562	1,207	0,905	0,060	0,525
<i>Sydowia polyspora</i>	0,851	0,385	3,649	0,270	1,138	0,143	0,051	0,030
<i>Lalaria sp</i>	0,729	0,104	1,259	0,327	1,588	0,609	0,320	0,367
<i>Cryptococcus magnus</i>	0,683	0,045	0,493	0,097	0,317	0,176	0,459	0,801
<i>Pseudeurotiaceae sp</i>	0,655	0,255	3,535	0,446	0,428	0,478	0,060	0,224
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	0,604	1,473	0,702	0,101	1,781	1,009	0,733	0,017
<i>Dioszegia hungarica</i>	0,454	0,133	0,369	0,364	0,634	0,494	0,125	0,740
<i>Leptogium sp</i>	0,409	0,073	0,072	0,041	0,114	0,054	0,066	0,021
<i>Tremellales sp</i>	0,381	0,313	0,103	0,209	0,148	0,071	0,004	0,058
<i>Erythrobasidium hasegawianum</i>	0,335	0,450	0,668	0,640	0,878	1,111	0,125	0,471
<i>Taphrina populina</i>	0,325	0,011	0,144	0,027	0,349	0,076	0,024	0,032
<i>Gibberella tricineta</i>	0,324	0,030	0,000	0,080	0,017	0,007	0,002	0,006
<i>Alternaria infectoria</i>	0,291	0,400	0,515	0,689	0,808	0,286	0,152	0,316
<i>Capnodiales sp</i>	0,281	0,269	0,715	1,687	0,197	0,302	0,073	0,525
<i>Udeniomyces pyricola</i>	0,280	0,004	0,032	0,014	0,049	0,000	0,035	0,011
<i>Zygosaccharomyces microellipsoides</i>	0,279	0,480	1,412	2,552	1,001	0,393	0,089	0,022
<i>Elsinoe sp</i>	0,237	0,230	1,286	2,980	0,798	1,540	0,248	0,901
<i>Cryptococcus chernovii</i>	0,237	0,077	0,243	0,569	0,419	0,192	0,649	2,079
<i>Devriesia pseudoamericana</i>	0,232	0,775	0,145	0,325	0,207	0,850	0,005	0,092

<i>Cryptococcus dimennae</i>	0,226	0,070	0,074	0,038	0,119	0,109	0,369	0,214
<i>Glomeraceae sp</i>	0,222	0,558	0,272	0,184	0,697	0,228	0,035	0,032
<i>Dothideomycetes sp</i>	0,221	0,372	0,366	0,455	0,411	0,169	0,048	0,132
<i>Rhodotorula sp</i>	0,216	0,430	0,165	0,105	0,232	0,546	0,040	0,231
<i>Alternaria alternata</i>	0,211	1,146	0,772	1,157	1,371	0,386	0,193	0,654
<i>Tumularia sp</i>	0,184	2,686	0,009	0,047	0,024	0,055	0,042	0,009
<i>Diversispora celata</i>	0,184	0,453	0,816	1,894	0,791	0,366	0,046	0,021
<i>Cryptococcus statzelliae</i>	0,179	0,012	0,017	0,046	0,049	0,067	0,003	0,049
<i>Teratosphaeriaceae sp</i>	0,175	0,722	0,175	0,080	0,176	0,140	0,009	0,017
<i>Taphrina communis</i>	0,175	0,075	0,584	0,422	0,471	0,203	0,010	0,025
<i>Sporobolomyces coprosmae</i>	0,152	0,135	0,102	0,116	0,204	0,256	0,019	0,233
<i>Exophiala sp</i>	0,147	0,247	0,271	0,713	0,164	0,281	0,049	0,267
<i>Diaporthe cotoneastri</i>	0,140	0,000	0,007	0,003	0,000	0,000	0,000	0,002
<i>Marasmiellus stenophyllus</i>	0,127	0,226	0,332	0,108	0,638	0,221	0,062	0,102
<i>Cryptococcus laurentii</i>	0,123	0,005	0,147	0,043	0,051	0,131	0,237	0,145
<i>Tremellomycetes sp</i>	0,120	0,067	0,083	0,034	0,052	0,071	0,212	0,159
<i>Cladosporium exasperatum</i>	0,112	0,060	0,046	0,073	0,008	0,036	0,019	0,042
<i>Chaetothyriales sp</i>	0,112	0,643	0,033	0,395	0,083	0,162	0,007	0,020
<i>Agaricomycetes sp</i>	0,112	0,144	0,058	0,047	0,101	0,057	0,012	0,012
<i>Dioszegia zsołtii var. yunnanensis</i>	0,112	0,115	0,133	0,426	0,399	0,248	0,015	0,121
<i>Bullera globospora</i>	0,110	0,133	0,139	0,074	0,221	0,129	0,119	0,118
<i>Naevula sp</i>	0,109	0,124	0,332	0,216	0,208	0,146	0,065	0,111
<i>Ramularia collo-cygni</i>	0,109	0,519	0,028	0,395	0,112	0,535	0,034	0,322
<i>Rachicladosporium sp</i>	0,101	0,196	0,079	0,380	0,102	0,142	0,006	0,091
<i>Pleosporales sp</i>	0,099	0,545	0,272	0,716	0,814	0,386	0,068	0,292
<i>Fibulobasidium inconspicuum</i>	0,099	0,017	0,000	0,000	0,009	0,000	0,000	0,000
<i>Coniothyrium glycines</i>	0,099	0,005	0,028	0,012	0,000	0,015	0,008	0,002
<i>Phaeosphaeriaceae sp</i>	0,099	0,111	0,136	0,268	0,196	0,226	0,040	0,126
<i>Phaeosphaeria juncophila</i>	0,098	0,045	0,082	0,137	0,159	0,110	0,029	0,052
<i>Incertae sedis sp</i>	0,090	0,298	0,719	0,599	0,586	0,241	0,138	0,306
<i>Bensingtonia yuccicola</i>	0,089	0,114	0,059	0,107	0,234	0,342	0,031	0,210
<i>Basidiomycota sp</i>	0,081	0,248	0,201	0,240	0,285	0,235	0,030	0,219
<i>Cryptococcus oeiensis</i>	0,074	0,021	0,146	0,016	0,148	0,011	0,212	0,223
<i>Chalara sp</i>	0,067	0,004	0,015	0,000	0,008	0,002	0,002	0,000
<i>Sporobolomyces gracilis</i>	0,063	0,109	0,164	0,068	0,102	0,329	0,030	0,076
<i>Hannaella kunmingensis</i>	0,059	0,107	0,057	0,024	0,039	0,056	0,002	0,008
<i>Pringsheimia smilacis</i>	0,058	0,008	0,137	0,022	0,069	0,006	0,013	0,007
<i>Chaenothecopsis pusiola</i>	0,055	0,064	0,020	0,042	0,016	0,018	0,000	0,001
<i>Phaeosphaeria sp</i>	0,055	0,041	0,098	0,179	0,141	0,109	0,060	0,075
<i>Aspergillus penicillioides</i>	0,051	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Helotiales sp</i>	0,049	0,022	0,052	0,039	0,035	0,020	0,005	0,025
<i>Derxomyces pseudoschimicola</i>	0,045	0,012	0,023	0,008	0,064	0,002	0,002	0,016
<i>Peltaster fructicola</i>	0,042	0,117	0,000	0,009	0,000	0,051	0,000	0,000
<i>Cystobasidium pinicola</i>	0,042	0,102	0,033	0,012	0,031	0,074	0,025	0,040

<i>Aspergillus nomius</i>	0,041	0,005	0,000	0,014	0,000	0,000	0,002	0,000
<i>Mycosphaerellaceae sp</i>	0,038	0,890	0,089	1,070	0,093	0,788	0,015	0,315
<i>Mycena epipterygia</i>	0,038	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,003
<i>Stemphylium herbarum</i>	0,038	0,039	0,026	0,023	0,073	0,009	0,011	0,017
<i>Aureobasidium subglaciale</i>	0,036	0,000	0,457	0,010	0,024	0,009	0,049	0,015
<i>Knufia cryptophialidica</i>	0,036	0,008	0,000	0,013	0,008	0,004	0,000	0,000
<i>Knufia cryptophialidica</i>	0,036	0,008	0,000	0,013	0,008	0,004	0,000	0,000
<i>Sphaeloma perseae</i>	0,034	0,031	0,105	0,269	0,238	0,101	0,028	0,011
<i>Phaeococcomyces catenatus</i>	0,034	0,031	0,012	0,007	0,008	0,000	0,000	0,000
<i>Elsinoaceae sp</i>	0,028	0,000	0,011	0,019	0,021	0,000	0,000	0,001
<i>Sporobolomyces symmetricus</i>	0,028	0,034	0,022	0,056	0,041	0,142	0,000	0,036
<i>Teratosphaeria blakelyi</i>	0,028	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Leucopaxillus giganteus</i>	0,028	0,034	0,028	0,029	0,072	0,141	0,026	0,046
<i>Exobasidium dubium</i>	0,026	0,068	0,000	0,014	0,028	0,013	0,000	0,000
<i>Dothiorella vidmadera</i>	0,025	0,004	0,000	0,000	0,009	0,000	0,000	0,000
<i>Lophodermium conigenum</i>	0,025	0,000	0,000	0,000	0,000	0,005	0,000	0,000
<i>Raffaelea quercivora</i>	0,025	0,000	0,013	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Lalaria inositophila</i>	0,025	0,000	0,010	0,005	0,019	0,027	0,000	0,008
<i>Leptosphaeria sp</i>	0,025	0,000	0,013	0,011	0,019	0,016	0,029	0,008
<i>Taphrinales sp</i>	0,025	0,008	0,038	0,014	0,052	0,067	0,009	0,007
<i>Monilinia sp</i>	0,024	0,035	0,010	0,000	0,009	0,003	0,000	0,005
<i>Itersonilia perplexans</i>	0,022	0,004	0,017	0,004	0,106	0,002	0,007	0,000
<i>Saccharomyces mikatae</i>	0,022	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Hannaella oryzae</i>	0,022	0,055	0,020	0,014	0,000	0,012	0,016	0,000
<i>Myriangiales sp</i>	0,022	0,042	0,028	0,031	0,000	0,004	0,000	0,004
<i>Cyphellophora vermispota</i>	0,022	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Periconia macrospinosa</i>	0,014	0,000	0,000	0,007	0,000	0,003	0,000	0,002
<i>Penicillium chrysogenum</i>	0,014	0,014	0,011	0,009	0,057	0,012	0,000	0,006
<i>Sordaria fimicola</i>	0,014	0,000	0,000	0,004	0,010	0,000	0,000	0,000
<i>Sporobolomyces salicinus</i>	0,014	0,019	0,000	0,004	0,021	0,005	0,000	0,002
<i>Sydowia japonica</i>	0,014	0,000	0,080	0,003	0,000	0,000	0,010	0,007
<i>Phaeosphaeria triglochinicola</i>	0,014	0,005	0,040	0,111	0,071	0,058	0,004	0,039
<i>Strelitziana albiziae</i>	0,014	0,015	0,004	0,038	0,000	0,036	0,000	0,022
<i>Malassezia slooffiae</i>	0,014	0,018	0,007	0,042	0,010	0,032	0,004	0,009
<i>Dothidea sp</i>	0,013	0,000	0,013	0,002	0,000	0,002	0,019	0,042
<i>Aspergillus amstelodami</i>	0,013	0,000	0,003	0,003	0,000	0,000	0,000	0,002
<i>Torula caligans</i>	0,013	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Austroplaca erecta</i>	0,013	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001
<i>Hypocreaceae sp</i>	0,013	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Kondoa malvinella</i>	0,013	0,030	0,031	0,063	0,079	0,104	0,003	0,032
<i>Biatora vernalis</i>	0,013	0,013	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Dioszegia takashimae</i>	0,013	0,017	0,030	0,022	0,019	0,059	0,000	0,011
<i>Leptospora rubella</i>	0,012	0,021	0,016	0,067	0,018	0,034	0,006	0,023
<i>Usnea fragiliscens</i>	0,012	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

<i>Seiridium podocarpī</i>	0,012	0,000	0,009	0,003	0,000	0,002	0,000	0,001
<i>Phaeomycoentrospora cantuariensis</i>	0,011	0,005	0,007	0,000	0,010	0,005	0,007	0,001
<i>Alternaria sp</i>	0,011	0,078	0,030	0,033	0,064	0,035	0,002	0,019
<i>Taphrina padi</i>	0,011	0,000	0,009	0,003	0,000	0,002	0,000	0,000
<i>Bensingtonia subrosea</i>	0,011	0,015	0,023	0,029	0,049	0,036	0,005	0,027
<i>Cryptococcus flavus</i>	0,011	0,017	0,009	0,004	0,033	0,013	0,005	0,004
<i>Mrakiella aquatica</i>	0,011	0,000	0,006	0,000	0,033	0,000	0,634	0,003
<i>Teratosphaeria sp</i>	0,011	0,011	0,000	0,014	0,000	0,014	0,000	0,004
<i>Peyronellaea sp</i>	0,011	0,011	0,027	0,055	0,056	0,002	0,002	0,023
<i>Subplenodomus apiicola</i>	0,011	0,000	0,003	0,000	0,000	0,008	0,000	0,001
<i>Sclerostagonospora phragmiticola</i>	0,011	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Herpotrichiellaceae sp</i>	0,011	0,004	0,017	0,027	0,224	0,028	0,000	0,001
<i>Pseudogymnoascus destructans</i>	0,011	0,000	0,000	0,001	0,008	0,000	0,000	0,001
<i>Rhodotorula glutinis</i>	0,011	0,000	0,003	0,003	0,000	0,008	0,000	0,003
<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	0,011	0,007	0,020	0,005	0,000	0,002	0,005	0,006
<i>Lecanora swartzii</i>	0,011	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Ciboria batschiana</i>	0,011	0,004	0,000	0,000	0,034	0,002	0,000	0,000
<i>Monilinia baccarum</i>	0,011	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000
<i>Bullera dendrophila</i>	0,011	0,004	0,003	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000
<i>Bulleromyces albus</i>	0,011	0,022	0,020	0,036	0,024	0,055	0,034	0,145
<i>Diplodia subglobosa</i>	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,002	0,000
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	0,000	19,739	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000
<i>Phyllosticta citricarpa</i>	0,000	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Camarosporium sp</i>	0,000	0,000	0,000	0,002	0,021	0,013	0,009	0,001
<i>Botryosphaeriales sp</i>	0,000	0,005	0,007	0,010	0,010	0,000	0,000	0,000
<i>Cladosporium fusiforme</i>	0,000	0,026	0,000	0,051	0,000	0,016	0,000	0,027
<i>Cladosporium sp</i>	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Arthrocatena tenebrio</i>	0,000	0,000	0,020	0,019	0,024	0,002	0,000	0,007
<i>Capnobotryella sp</i>	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Toxicocladosporium rubrigenum</i>	0,000	0,000	0,000	0,006	0,000	0,000	0,000	0,002
<i>Dissoconium eucalypti</i>	0,000	0,135	0,004	0,379	0,000	0,413	0,000	0,102
<i>Dothistroma pini</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,009	0,000	0,000
<i>Mycosphaerella sp</i>	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000	0,009	0,000	0,000
<i>Ramichloridium ducassei</i>	0,000	14,384	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Phaeoramularia weigelicola</i>	0,000	0,014	0,004	0,005	0,000	0,011	0,005	0,002
<i>Pseudocercospora chaenomelis</i>	0,000	0,011	0,006	0,026	0,000	0,018	0,000	0,005
<i>Pseudocercospora sp</i>	0,000	0,026	0,003	0,049	0,000	0,062	0,000	0,016
<i>Fusarium fujikuroi</i>	0,000	0,000	0,000	17,726	0,000	0,007	0,000	0,000
<i>Ramularia cynarae</i>	0,000	0,009	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000	0,002
<i>Septoria arundinacea</i>	0,000	0,000	0,011	0,000	0,031	0,000	0,002	0,000
<i>Septoria cretae</i>	0,000	0,041	0,017	0,082	0,048	0,119	0,005	0,031
<i>Sphaerulina amelanchier</i>	0,000	0,061	0,010	0,176	0,056	0,071	0,000	0,001
<i>Sphaerulina pseudovirgaureae</i>	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000

<i>Stenella araguata</i>	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,004	0,000	0,003
<i>Trichoderma alni</i>	0,000	5,416	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Xenomycosphaerella elongata</i>	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,002
<i>Catenulostroma hermanusense</i>	0,000	0,004	0,003	0,008	0,000	0,009	0,000	0,000
<i>Teratosphaeria capensis</i>	0,000	0,015	0,004	0,023	0,021	0,046	0,000	0,014
<i>Dothidea sambuci</i>	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Aureobasidium iranianum</i>	0,000	0,000	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Aureobasidium namibiae</i>	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Dothioraceae sp</i>	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000	0,002
<i>Cenococcum sp</i>	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Hysteriales sp</i>	0,000	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Peltaster cerophilus</i>	0,000	0,064	0,007	0,014	0,056	0,009	0,000	0,004
<i>Zymoseptoria halophila</i>	0,000	0,015	0,003	0,014	0,000	0,042	0,002	0,010
<i>Zymoseptoria verkleyi</i>	0,000	0,000	0,000	0,008	0,008	0,012	0,000	0,000
<i>Sphaceloma erythrinae</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002	0,000
<i>Endosporium aviarium</i>	0,000	0,007	0,000	0,001	0,000	0,000	0,002	0,000
<i>Curreya grandicipis</i>	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,003
<i>Pyrenochaetopsis sp</i>	0,000	0,000	0,015	0,026	0,000	0,008	0,000	0,002
<i>Ascochyta hordei</i>	0,000	0,004	0,000	0,009	0,000	0,002	0,000	0,010
<i>Ascochyta skagwayensis</i>	0,000	0,000	0,004	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Didymella fabae</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002
<i>Didymella sp</i>	0,000	0,000	0,007	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Didymella vitalbina</i>	0,000	0,000	0,003	0,001	0,008	0,000	0,000	0,001
<i>Letendraea sp</i>	0,000	0,049	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Paraphoma sp</i>	0,000	0,000	0,000	0,001	0,008	0,000	0,000	0,004
<i>Periconia byssoides</i>	0,000	0,009	0,020	0,009	0,009	0,000	0,000	0,006
<i>Periconia sp</i>	0,000	0,005	0,062	0,004	0,000	0,013	0,000	0,000
<i>Phoma huancayensis</i>	0,000	0,000	0,007	0,011	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Phoma sp</i>	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,004	0,000	0,002
<i>Pyrenochaeta sp</i>	0,000	0,000	0,014	0,039	0,000	0,003	0,000	0,000
<i>Setomelanomma holmii</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002
<i>Acicuseptoria rumicis</i>	0,000	0,000	0,010	0,003	0,018	0,008	0,000	0,000
<i>Coniothyrium sp</i>	0,000	0,013	0,030	0,053	0,037	0,066	0,000	0,014
<i>Leptosphaeria avenaria</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,032	0,000	0,000	0,000
<i>Leptosphaeria proteicola</i>	0,000	0,000	0,000	0,007	0,000	0,002	0,000	0,000
<i>Leptosphaeria rubefaciens</i>	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000
<i>Leptosphaeria slovacica</i>	0,000	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003
<i>Neosetophoma sp</i>	0,000	0,000	0,004	0,002	0,000	0,000	0,000	0,010
<i>Plenodomus agnitus</i>	0,000	0,000	0,000	0,002	0,009	0,000	0,000	0,000
<i>Plenodomus collinsoniae</i>	0,000	0,000	0,015	0,012	0,010	0,010	0,000	0,005
<i>Subplenodomus apicola</i>	0,000	0,000	0,004	0,003	0,010	0,018	0,002	0,000
<i>Leptosphaeriaceae sp</i>	0,000	0,000	0,000	0,010	0,000	0,026	0,005	0,019
<i>Lophiostoma macrostomum</i>	0,000	0,019	0,020	0,007	0,016	0,002	0,003	0,005
<i>Sigarispora arundinis</i>	0,000	0,010	0,007	0,003	0,010	0,003	0,000	0,000

<i>Paraphaeosphaeria michotii</i>	0,000	0,010	0,029	0,012	0,062	0,005	0,006	0,012
<i>Paraphaeosphaeria pilleata</i>	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Montagnulaceae sp</i>	0,000	0,000	0,000	0,001	0,008	0,002	0,000	0,002
<i>Ampelomyces quisqualis</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,016	0,000	0,000	0,000
<i>Phaeosphaeria oreochloae</i>	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,002
<i>Sclerostagonospora cycadis</i>	0,000	0,004	0,056	0,000	0,008	0,016	0,000	0,000
<i>Sclerostagonospora sp</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,005	0,000	0,000
<i>Setophaeosphaeria badalingensis</i>	0,000	0,000	0,000	0,005	0,000	0,006	0,003	0,001
<i>Stagonospora perfecta</i>	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,001
<i>Stagonospora pseudovitensis</i>	0,000	0,031	0,026	0,030	0,032	0,014	0,015	0,010
<i>Stagonospora sp</i>	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,002	0,000	0,000
<i>Aspergillus flavus</i>	0,000	0,020	0,015	4,400	0,008	0,186	0,003	0,005
<i>Alternaria cinerariae</i>	0,000	0,000	0,003	0,009	0,000	0,004	0,000	0,000
<i>Alternaria metachromatica</i>	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Alternaria planifunda</i>	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,005	0,000	0,000
<i>Bipolaris eleusines</i>	0,000	0,004	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Dendryphion europaeum</i>	0,000	0,000	0,011	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000
<i>Epicoccum nigrum</i>	0,000	0,007	0,006	0,016	0,030	0,014	0,000	0,005
<i>Pleospora bjoerlingii</i>	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000	0,002	0,001
<i>Pyrenophora graminea</i>	0,000	0,000	0,013	0,003	0,016	0,000	0,002	0,000
<i>Pyrenophora lolii</i>	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,002	0,002	0,000
<i>Ulocladium chartarum</i>	0,000	0,012	0,003	0,006	0,065	0,002	0,000	0,002
<i>Pleosporaceae sp</i>	0,000	0,009	0,000	0,003	0,000	0,002	0,002	0,003
<i>Sporormiaceae sp</i>	0,000	0,004	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Phaeococcomyces nigricans</i>	0,000	0,009	0,020	0,008	0,037	0,002	0,002	0,001
<i>Phaeomoniella zymoides</i>	0,000	0,005	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Aspergillus bombycis</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002
<i>Aspergillus niger</i>	0,000	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Penicillium bialowiezense</i>	0,000	0,000	0,000	0,007	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Penicillium capsulatum</i>	0,000	0,004	0,014	0,035	0,000	0,075	0,003	0,003
<i>Penicillium sp</i>	0,000	0,005	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000
<i>Talaromyces calidicanius</i>	0,000	0,031	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Sarcinomyces sp</i>	0,000	0,000	0,000	0,006	0,000	0,006	0,000	0,002
<i>Sarcinomyces sp</i>	0,000	0,026	0,009	0,011	0,032	0,008	0,000	0,000
<i>Sarcinomyces sp</i>	0,000	0,015	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Nannizziopsis vriesii</i>	0,000	0,000	0,000	0,002	0,031	0,000	0,002	0,000
<i>Massaria anomia</i>	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,001
<i>Abrothallus suecicus</i>	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Chaetosphaeronema sp</i>	0,000	0,000	0,000	0,003	0,020	0,014	0,002	0,001
<i>Ochroconis sp</i>	0,000	0,005	0,004	0,015	0,000	0,007	0,000	0,007
<i>Melanelia subaurifera</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000
<i>Melanohalea exasperata</i>	0,000	0,009	0,003	0,000	0,018	0,002	0,000	0,000
<i>Parmeliaceae sp</i>	0,000	0,011	0,006	0,004	0,000	0,002	0,000	0,000
<i>Usnea crocata</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,003	0,000	0,000

<i>Usnea mutabilis</i>	0,000	0,013	0,013	0,000	0,000	0,016	0,000	0,000
<i>Usnea sp</i>	0,000	0,060	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Carestiella socia</i>	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,002	0,000	0,000
<i>Pseudocyphellaria neglecta</i>	0,000	0,004	0,000	0,000	0,009	0,000	0,000	0,000
<i>Amandinea punctata</i>	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,001
<i>Physcia stellaris</i>	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000
<i>Rinodina pyrina</i>	0,000	0,000	0,003	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Blumeria graminis</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000
<i>Neoerysiphe galeopsidis</i>	0,000	0,000	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Neoerysiphe galii</i>	0,000	0,000	0,012	0,000	0,019	0,000	0,004	0,000
<i>Mollisia cinerea</i>	0,000	0,000	0,011	0,007	0,000	0,000	0,004	0,000
<i>Pezicula heterochroma</i>	0,000	0,112	0,000	0,002	0,000	0,219	0,000	0,000
<i>Dermateaceae sp</i>	0,000	0,000	0,007	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Articulospora proliferata</i>	0,000	0,000	0,000	0,006	0,000	0,000	0,000	0,002
<i>Cyathicula cyathoidea</i>	0,000	0,000	0,011	0,001	0,008	0,002	0,000	0,000
<i>Helotiaceae sp</i>	0,000	0,000	0,006	0,003	0,025	0,010	0,002	0,000
<i>Cistella sp</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,011	0,000	0,000
<i>Lachnum sp</i>	0,000	0,000	0,000	0,006	0,000	0,000	0,000	0,002
<i>Cadophora luteo-olivacea</i>	0,000	0,031	0,003	0,001	0,000	0,000	0,000	0,001
<i>Cadophora sp</i>	0,000	0,030	0,026	0,018	0,016	0,008	0,003	0,009
<i>Glarea lozoyensis</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,018	0,000	0,000	0,001
<i>Hyphodiscus hymeniophilus</i>	0,000	0,004	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Phacidia eucalypti</i>	0,000	0,000	0,009	0,014	0,000	0,002	0,003	0,018
<i>Rhynchosporium agropyri</i>	0,000	0,000	0,006	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000
<i>Sphaerographium nyssicola</i>	0,000	0,000	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Spirosphaera cupreorufescens</i>	0,000	0,004	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,001
<i>Tetracladium sp</i>	0,000	0,000	0,007	0,005	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Trimmatostroma salinum</i>	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,006	0,002	0,001
<i>Lambertella corni-maris</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,007
<i>Ciboria americana</i>	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000
<i>Ciborinia allii</i>	0,000	0,000	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Ciborinia candolleana</i>	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,007
<i>Collophora paarla</i>	0,000	0,011	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000
<i>Fulvoflamma eucalypti</i>	0,000	0,000	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Leotiomyces sp</i>	0,000	0,000	0,000	0,003	0,009	0,000	0,002	0,001
<i>Hydnocystis piligera</i>	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Pyronemataceae sp</i>	0,000	0,000	0,003	0,000	0,009	0,000	0,000	0,000
<i>Plectania melaena</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000
<i>Botryozyma nematodophila</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,051	0,000	0,002	0,000
<i>Candida fructus</i>	0,000	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Candida santamariae</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004
<i>Candida tallmaniae</i>	0,000	0,000	0,003	0,000	0,009	0,002	0,000	0,000
<i>Candida zeylanoides</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,041
<i>Incertae sedis sp</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,117	0,000	0,000	0,000

<i>Metschnikowia viticola</i>	0,000	0,000	0,000	0,008	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Pichia kluyveri</i>	0,000	0,148	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Kazachstania aerobia</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,056	0,000	0,000	0,000
<i>Kazachstania servazzii</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,092	0,000	0,000	0,000
<i>Kazachstania telluris</i>	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Tetrapisispora blattae</i>	0,000	0,041	0,061	0,005	0,087	0,013	0,002	0,000
<i>Saccharomycopsis crataegensis</i>	0,000	0,012	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Saccharomycetales sp</i>	0,000	0,030	0,017	0,010	1,239	0,030	0,037	0,011
<i>Togniniella microspora</i>	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000
<i>Diaporthe bicincta</i>	0,000	0,000	0,000	0,003	0,008	0,000	0,003	0,000
<i>Diaporthe gulyae</i>	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Diaporthaceae sp</i>	0,000	0,000	0,017	0,015	0,010	0,014	0,002	0,011
<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	0,000	0,004	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Plagiostoma aesculi</i>	0,000	0,000	0,004	0,002	0,010	0,000	0,000	0,000
<i>Plagiostoma inclinatum</i>	0,000	0,005	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Claviceps purpurea</i>	0,000	0,000	0,000	0,008	0,000	0,040	0,000	0,000
<i>Beauveria kipukae</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,010	0,003	0,000	0,000
<i>Sarocladium strictum</i>	0,000	0,013	0,000	0,004	0,000	0,004	0,000	0,000
<i>Stachybotrys sp</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000
<i>Cylindrocladiella elegans</i>	0,000	0,000	0,000	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Fusarium concentricum</i>	0,000	0,000	0,000	0,035	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Fusarium poae</i>	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Nectriaceae sp</i>	0,000	0,105	0,000	0,182	0,040	0,027	0,000	0,043
<i>Hypocreales sp</i>	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,002	0,000	0,000
<i>Apiosporaceae sp</i>	0,000	0,000	0,000	0,003	0,008	0,000	0,000	0,001
<i>Colletotrichum kinghornii</i>	0,000	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Gibellulopsis sp</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002
<i>Pyricularia sp</i>	0,000	0,000	0,000	0,005	0,000	0,002	0,000	0,000
<i>Sordariomycetes sp</i>	0,000	0,065	0,000	0,000	0,020	0,004	0,000	0,001
<i>Monochaetia sp</i>	0,000	0,000	0,003	0,005	0,000	0,005	0,000	0,000
<i>Seiridium phylicae</i>	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000
<i>Truncatella spadicea</i>	0,000	0,000	0,000	0,005	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Amphisphaeriaceae sp</i>	0,000	0,026	0,000	0,007	0,000	0,005	0,000	0,001
<i>Diatrypaeae sp</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002
<i>Coniocessia nodulisporioides</i>	0,000	0,074	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Monographella nivalis</i>	0,000	0,000	0,007	0,005	0,000	0,002	0,000	0,000
<i>Protomyces inouyei</i>	0,000	0,000	0,010	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Lalaria veronaerambellii</i>	0,000	0,000	0,037	0,004	0,000	0,004	0,011	0,002
<i>Taphrina deformans</i>	0,000	0,000	0,048	0,004	0,056	0,002	0,023	0,008
<i>Taphrina sp</i>	0,000	0,000	0,016	0,003	0,028	0,002	0,006	0,004
<i>Taphrina tormentillae</i>	0,000	0,004	0,100	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002
<i>Taphrina wiesneri</i>	0,000	0,004	0,333	0,147	0,045	0,027	0,075	0,183
<i>Agaricus bisporus</i>	0,000	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

<i>Conocybe fiorii</i>	0,000	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001
<i>Clitopilus crispus</i>	0,000	0,010	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Inocybe unicolor</i>	0,000	0,000	0,003	0,014	0,000	0,009	0,002	0,001
<i>Clitocybula lacerata</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,008	0,000	0,000
<i>Strobilurus esculentus</i>	0,000	0,000	0,000	0,003	0,019	0,005	0,000	0,001
<i>Coprinellus disseminatus</i>	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001
<i>Coprinellus xanthothrix</i>	0,000	0,000	0,000	0,003	0,019	0,002	0,000	0,000
<i>Coprinopsis brunneofibrillosa</i>	0,000	0,000	0,007	0,000	0,010	0,000	0,000	0,001
<i>Coprinopsis calospora</i>	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,005	0,002	0,002
<i>Coprinopsis scobicola</i>	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Psathyrella candolleana</i>	0,000	0,009	0,000	0,005	0,000	0,002	0,002	0,001
<i>Schizophyllum commune</i>	0,000	0,000	0,006	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000
<i>Psilocybe montana</i>	0,000	0,000	0,004	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Arrhenia lobata</i>	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Agaricales sp</i>	0,000	0,010	0,021	0,030	0,037	0,012	0,010	0,014
<i>Elmerina cladophora</i>	0,000	0,004	0,000	0,001	0,008	0,002	0,000	0,001
<i>Exidia saccharina</i>	0,000	0,019	0,004	0,006	0,031	0,022	0,002	0,005
<i>Auriculariales sp</i>	0,000	0,000	0,003	0,005	0,000	0,002	0,000	0,001
<i>Ceratobasidiaceae sp</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,011	0,000	0,000
<i>Corticiaceae sp</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,003	0,000
<i>Gloeophyllum sepiarium</i>	0,000	0,000	0,003	0,000	0,066	0,000	0,000	0,000
<i>Gloeophyllum trabeum</i>	0,000	0,000	0,003	0,003	0,009	0,002	0,000	0,004
<i>Fomitiporia aethiopica</i>	0,000	0,024	0,000	0,000	0,021	0,000	0,000	0,000
<i>Fomitiporia sp</i>	0,000	0,005	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Inonotus rickii</i>	0,000	0,022	0,014	0,005	0,056	0,018	0,006	0,004
<i>Schizopora flavipora</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,005	0,000	0,000
<i>Polyporales sp</i>	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,005	0,000	0,000
<i>Russula tricholomopsis</i>	0,000	0,004	0,000	0,000	0,009	0,000	0,000	0,002
<i>Russulales sp</i>	0,000	0,000	0,007	0,000	0,009	0,005	0,000	0,001
<i>Bensingtonia ingoldii</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002
<i>Bensingtonia miscanthi</i>	0,000	0,000	0,000	0,003	0,018	0,007	0,000	0,004
<i>Bensingtonia phyllada</i>	0,000	0,026	0,000	0,025	0,000	0,020	0,000	0,007
<i>Bensingtonia pseudonaganoensis</i>	0,000	0,044	0,010	0,036	0,000	0,050	0,002	0,010
<i>Bensingtonia sp</i>	0,000	0,004	0,000	0,006	0,000	0,032	0,002	0,010
<i>Chionosphaera cuniculicola</i>	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Kurtzmanomyces tardus</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000
<i>Agaricostilbomyces sp</i>	0,000	0,000	0,000	0,005	0,000	0,004	0,000	0,001
<i>Occultifur sp</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,005	0,000	0,000
<i>Erythrobasidium sp</i>	0,000	0,034	0,022	0,137	0,010	0,135	0,004	0,002
<i>Entylomatales sp</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,008
<i>Exobasidium formosanum</i>	0,000	0,030	0,013	0,039	0,009	0,032	0,000	0,006
<i>Exobasidium inconspicuum</i>	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Exobasidium miyabei</i>	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Exobasidium nobeyamense</i>	0,000	0,013	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

<i>Exobasidium</i> sp	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,010	0,000	0,000
<i>Exobasidiales</i> sp	0,000	0,008	0,006	0,003	0,056	0,065	0,000	0,000
<i>Tilletiopsis pallescens</i>	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,002	0,000	0,003
<i>Microstroma juglandis</i>	0,000	0,010	0,026	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Exobasidiomycetes</i> sp	0,000	0,075	0,006	0,099	0,026	0,137	0,008	0,085
<i>Curvibasidium cygneicollum</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	0,002	0,001
<i>Leucosporidium drummii</i>	0,000	0,000	0,006	0,000	0,033	0,000	0,000	0,000
<i>Leucosporidium golubevii</i>	0,000	0,005	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,011
<i>Rhodosporeidium babjevae</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,008	0,004	0,002	0,009
<i>Rhodotorula acheniorum</i>	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,002
<i>Rhodotorula bacarum</i>	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,001
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	0,000	0,000	0,007	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Venturia cerasi</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,031	0,582	0,000	0,000
<i>Sporobolomyces clavatus</i>	0,000	0,000	0,045	0,004	0,024	0,006	0,021	0,016
<i>Sporobolomyces elongatus</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003
<i>Sporobolomyces linderiae</i>	0,000	0,009	0,000	0,000	0,000	0,007	0,000	0,001
<i>Sporobolomyces marcellae</i>	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,002	0,002
<i>Sporobolomyces ruber</i>	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,014	0,000	0,000
<i>Sporobolomyces ruberrimus</i>	0,000	0,039	0,000	0,023	0,000	0,025	0,067	0,076
<i>Sporobolomyces subbrunneus</i>	0,000	0,012	0,000	0,019	0,008	0,008	0,000	0,001
<i>Incertae sedis</i> sp	0,000	0,000	0,007	0,000	0,000	0,000	0,002	0,001
<i>Tranzschelia anemones</i>	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Tranzschelia discolor</i>	0,000	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Septobasidium</i> sp	0,000	0,011	0,000	0,000	0,000	0,006	0,000	0,000
<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000	0,217	0,000
<i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,019	0,000	0,000	0,000
<i>Udeniomyces kansasensis</i>	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000	0,002	0,212
<i>Udeniomyces megalosporus</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,010	0,000	0,000	0,002
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,008	0,000
<i>Cystofilobasidiales</i> sp	0,000	0,000	0,003	0,008	0,000	0,000	0,000	0,007
<i>Bullera unica</i>	0,000	0,010	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,032
<i>Cryptococcus aureus</i>	0,000	0,000	0,004	0,000	0,299	0,003	0,004	0,000
<i>Cryptococcus bestiolae</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002
<i>Cryptococcus heimaeyensis</i>	0,000	0,009	0,000	0,009	0,000	0,016	0,007	0,019
<i>Dexomyces yunnanensis</i>	0,000	0,005	0,007	0,015	0,031	0,000	0,002	0,000
<i>Dioszegia buhagiarui</i>	0,000	0,017	0,023	0,000	0,054	0,034	0,009	0,002
<i>Dioszegia changbaiensis</i>	0,000	0,000	0,007	0,000	0,000	0,000	0,006	0,005
<i>Dioszegia rishiriensis</i>	0,000	0,000	0,000	0,005	0,000	0,014	0,000	0,008
<i>Dioszegia</i> sp	0,000	0,004	0,011	0,002	0,000	0,005	0,000	0,001
<i>Dioszegia zsolttii</i> var. <i>zsolttii</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000
<i>Hannaella coprosmae</i>	0,000	0,000	0,006	0,001	0,008	0,004	0,000	0,002
<i>Hannaella zaeae</i>	0,000	0,000	0,007	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Kockovaella machilophila</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000

<i>Papiliotrema bandonii</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002
<i>Tremella aurantialba</i>	0,000	0,000	0,000	0,002	0,009	0,000	0,000	0,000
<i>Tremella candelariellae</i>	0,000	0,000	0,006	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Tremella giraffa</i>	0,000	0,010	0,000	0,004	0,000	0,003	0,000	0,002
<i>Tremella indecorata</i>	0,000	0,007	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Tremella sp</i>	0,000	0,004	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Cryptotrichosporon anacardii</i>	0,000	0,029	0,011	0,000	0,000	0,005	0,002	0,000
<i>Ustilaginaceae sp</i>	0,000	0,000	0,003	0,000	0,019	0,000	0,004	0,000
<i>Powellomyces sp</i>	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000
<i>Spizellomyces pseudodichotomus</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002
<i>Chytridiomycota sp</i>	0,000	0,000	0,007	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Archaeospora sp</i>	0,000	0,000	0,003	0,003	0,008	0,006	0,000	0,000
<i>Funneliformis mosseae</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004
<i>Rhizophagus sp</i>	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,000	0,001

Prilog 7. Distribucija predstavnika rodova gljiva izolovanih tokom dve fenološke faze (maj i juli) sa četiri sorte šljive.

Rod	Detektovani predstavnici rodova	Čačanska lepotica		Čačanska rodna		Požegača		Ranka	
		Maj	Juli	Maj	Juli	Maj	Juli	Maj	Juli
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Acremonium</i> sp.		+	+	+		+	+	+
<i>Alternaria</i> sp.	<i>Alternaria alternata</i>	+	+		+	+	+	+	+
	<i>Alternaria</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Alternaria tenuissima</i>			+					
<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Aspergillus flavus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Aspergillus niger</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Aspergillus ochraceus</i>					+			
	<i>Aspergillus</i> sp.	+	+	+	+	+	+		+
<i>Botrytis</i> sp.	<i>Botrytis cinerea</i>		+		+	+	+		+
	<i>Botrytis</i> sp.			+	+	+	+		+
<i>Chaetomium</i> sp.	<i>Chaetomium</i> sp.	+	+		+	+	+		+
<i>Cladophialophora</i> sp.	<i>Cladophialophora</i> sp.		+						
<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	+				+	+		
	<i>Cladosporium</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Curvularia</i>	<i>Curvularia</i> sp.					+	+		
	<i>Curvularia lunata</i>				+			+	
<i>Drechslera</i> sp.	<i>Drechslera tetramera</i>					+			
<i>Epicoccum</i> sp.	<i>Epicoccum purpurascens</i>				+		+		
	<i>Epicoccum</i> sp.					+	+		
<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium avenaceum</i>		+			+	+		
	<i>Fusarium culmorum</i>				+				
	<i>Fusarium equiseti</i>		+		+	+			+
	<i>Fusarium graminearum</i>	+	+		+	+	+	+	+
	<i>Fusarium incarnatum</i>	+			+	+	+		+
	<i>Fusarium oxysporum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Fusarium poae</i>		+	+	+	+	+	+	+
	<i>Fusarium proliferatum</i>					+		+	
<i>Fusarium roseum</i>				+					

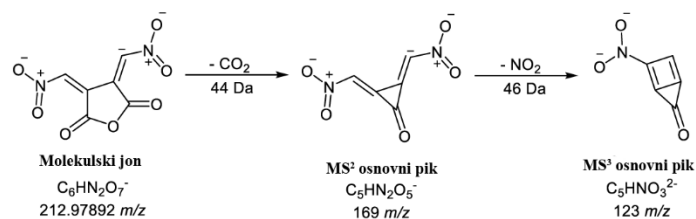
	<i>Fusarium solani</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Fusarium</i> sp.						+		
<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium sporotrichoides</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Fusarium subglutinans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Fusarium tricinctum</i>	+	+		+	+	+	+	+
	<i>Fusarium verticillioides</i>				+				
<i>Ganoderma</i> sp.	<i>Ganoderma lucidum</i>						+		
<i>Gliocladium</i> sp.	<i>Gliocladium roseum</i>	+							
<i>Macrophomina</i> sp.	<i>Macrophomina phaseolina</i>			+	+				
	<i>Macrophomina</i> sp.							+	
	<i>Monilinia fructicola</i>				+			+	
<i>Monilinia</i> sp.	<i>Monilinia fructigena</i>							+	
	<i>Monilinia laxa</i>		+	+	+	+	+	+	+
	<i>Monilinia</i> sp.	+	+	+	+				
<i>Nigrospora</i> sp.	<i>Nigrospora</i> sp.	+	+			+	+	+	+
<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium corylophilum</i>				+				
	<i>Penicillium</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pestalotia</i> sp.	<i>Pestalotia</i> sp.						+		
	<i>Phoma</i> sp.		+	+	+	+	+	+	
<i>Phoma</i> sp.	<i>Phoma betae</i>	+	+			+		+	
<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Phomopsis</i> sp.	+	+	+					
<i>Podosphaera</i> sp.	<i>Podosphaera</i> sp.					+			
<i>Polystigma</i> sp.	<i>Polystigma rubrum</i>	+						+	
<i>Rhizoctonia</i> sp.	<i>Rhizoctonia solani</i>				+				+
	<i>Rhizoctonia</i> sp.				+		+		
<i>Rhizopus</i> sp.	<i>Rhizopus</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sclerotinia</i> sp.	<i>Sclerotinia</i> sp.	+	+		+			+	+
	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	+		+	+				
<i>Stigmata</i> sp.	<i>Stigmata carpophila</i>	+						+	
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.			+	+		+	+	
	<i>Trichoderma viridae</i>		+			+	+	+	
<i>Trichothecium</i> sp.	<i>Trichothecium roseum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Trichothecium</i> sp.				+				
<i>Ulocladium</i> sp.	<i>Ulocladium</i> sp.	+	+	+	+	+	+		+

Prilog 8. Rezultati primarnog skrininga izolata bakterija i kvasaca testiranih na 3 izolata *M. laxa*. Aktivnost izolata je ocenjena sa: nema aktivnosti (-), bakterija ograničava dalji rast gljive (+) i izražena antifungalna aktivnost izolata (++)

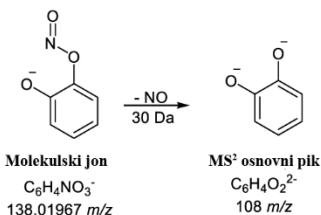
	Potencijalni antagonisti	M1	M8	M13
1.	ČL1 <i>Pseudomonas graminis</i>	-	-	-
2.	ČL1/1 <i>Bacillus niacini</i>	-	-	-
3.	ČL1/16_1 <i>Pantoea agglomerans</i>	+	+	+
4.	ČL1/2 <i>Pseudarthrobacter sulfonivorans</i>	+	+	+
5.	ČL1/4 <i>Pseudarthrobacter sulfonivorans</i>	+	+	+
6.	ČL2 <i>Pantoea agglomerans</i>	+	+	+
7.	ČL2/1 <i>Pantoea agglomerans</i>	+	+	-
8.	ČL2/16_2 <i>Pseudomonas mohnii</i>	-	-	-
9.	ČL2/3 <i>Pseudarthrobacter sulfonivorans</i>	+	+	+
10.	ČL3 <i>Curtobacterium herbarum</i>	+	+	-
11.	ČL3/1 <i>Arthrobacter oxydans</i>	-	-	-
12.	ČL3/16_2 <i>Sphingomonas dokdonensis</i>	-	-	-
13.	ČL3/2 <i>Pseudomonas mucidolens</i>	-	-	-
14.	ČL4 <i>Pseudomonas graminis</i>	+	+	-
15.	ČL4/16_2 <i>Frondehabitans peucedani</i>	-	-	-
16.	ČL5 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	-	-
17.	ČR1/16_1 <i>Pseudomonas rhizosphaerae</i>	-	-	-
18.	ČR10/16_1 <i>Sporobolomyces roseus</i>	+	+	+
19.	ČR2 <i>Curobacterium flaccumfaciens</i>	-	-	-
20.	ČR2/1 <i>Pseudomonas graminis</i>	+	-	+
21.	ČR2/16_1 <i>Sphingomonas glacialis</i>	-	-	-
22.	ČR2/2 <i>Pseudomonas graminis</i>	-	-	-
23.	ČR3/16_1 <i>Frondehabitans sucicola</i>	-	-	-
24.	ČR3/16_2 <i>Sanguibacter keddieii</i>	-	-	-
25.	ČR4/16_2 <i>Pseudomonas mohnii</i>	+	+	+
26.	ČR7/16_1 <i>Pseudomonas graminis</i>	-	-	-
27.	ČR8/16_1 <i>Aureobasidium pullulans</i>	+	+	+
28.	ČR9/16_1 <i>Pantoea agglomerans</i>	+	+	+
29.	P1/1 <i>Pseudomonas graminis</i>	+	-	+
30.	P1/16_1 <i>Pseudomonas synxantha</i>	++	++	++
31.	P2/16_1 <i>Terribacillus goriensis</i>	-	-	-
32.	P2/16_2 <i>Sphingomonas dokdonensis</i>	+	-	-

33.	P2/2	<i>Pseudomonas graminis</i>	+	-	+
34.	P3	<i>Pseudomonas graminis</i>	-	-	-
35.	P3/1	<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	+	+
36.	P3/16_1	<i>Pseudomonas graminis</i>	-	-	-
37.	P3/2	<i>Pantoea agglomerans</i>	+	-	+
38.	P4/16_1	<i>Pseudomonas synxantha</i>	++	++	++
39.	P4/16_2	<i>Pseudomonas graminis</i>	+	-	-
40.	P6/16_1	<i>Pseudomonas graminis</i>	-	-	-
41.	P6/16_2	<i>Frigoribacterium endophyticum</i>	-	-	-
42.	P8/16_2	<i>Labedella endophyticum</i>	-	-	-
43.	P9/16_2	<i>Frigoribacterium faeni</i>	-	-	-
44.	R1/1	<i>Arthrobacter luteolus</i>	-	-	-
45.	R1/16_1	<i>Pantoea ananatis</i>	+	+	+
46.	R1/16_2	<i>Pseudomonas graminis</i>	-	-	-
47.	R1/2	<i>Pseudomonas graminis</i>	+	-	+
48.	R1/3	<i>Bacillus megaterium</i>	-	-	-
49.	R2	<i>Frigoribacterium faeni</i>	-	-	-
50.	R2/1	<i>Pseudomonas graminis</i>	-	-	-
51.	R2/16_1	<i>Pseudomonas graminis</i>	-	-	-
52.	R2/2	<i>Pseudomonas graminis</i>	-	-	+
53.	R3	<i>Pseudomonas graminis</i>	-	-	-
54.	R3/16_1	<i>Pseudomonas orientalis</i>	+	+	+
55.	R3/3	<i>Bacillus thuringiensis</i>	-	-	+
56.	R5/16_2	<i>Pseudomonas mohnii</i>	-	-	-
57.	R6/16_2	<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	+	+
58.	R7/16_2	<i>Metschnikowia</i> aff. <i>chrysoperlae</i>	+	+	+

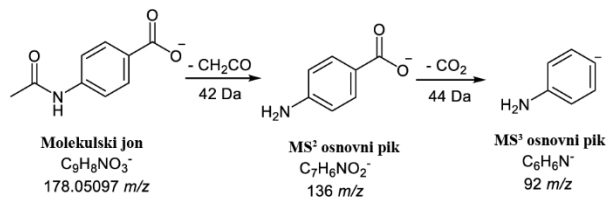
Prilog 9. Predloženi obrasci fragmentacije detektovanih jedinjenja u sirovom benzenovom ekstraktu izolata *P. synxantha* P4/16_1.



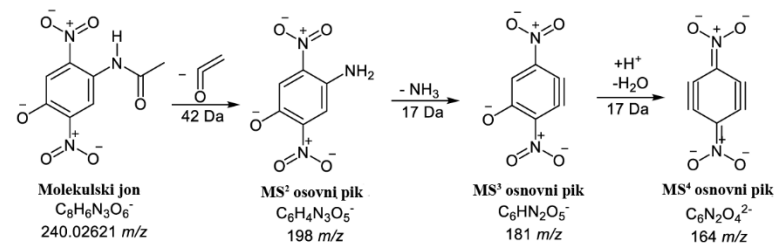
JEDINJENJE 2
 7.98 min



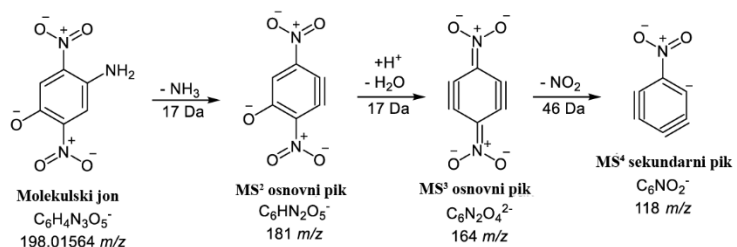
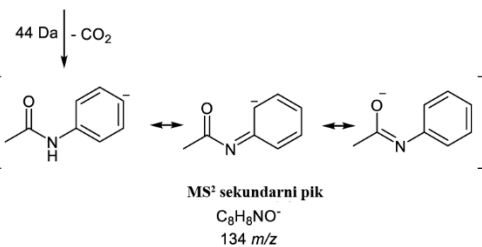
JEDINJENJE 5
 9.02 min



JEDINJENJE 3
 8.14 min



JEDINJENJE 6
 9.13 min



JEDINJENJE 7
 9.95 min

BIOGRAFIJA

Tamara Z. Janakiev je rođena 25.01.1989. u Beogradu gde je završila osnovnu školu i XIII beogradsku gimnaziju. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2008/09, studijska grupa Molekularna biologija i fiziologija, a diplomirala je 2013. godine. Iste godine upisuje master akademske studije u okviru modula Biologija mikroorganizama, studijska grupa Molekularna biologija i fiziologija. Master rad pod nazivom nazivom “Ispitivanje antimikrobnog potencijala smola iz pupoljaka nekih drvenastih biljaka na izabranim patogenim bakterijama” urađen je na Katedri za mikrobiologiju i uspešno je odbranjen 2014 godine sa ocenom 10. Školske 2014/15 godine upisala je doktorske akademske studije, modul Mikrobiologija. Od marta 2015. godine angažovana je kao istraživač-pripravnik na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije OI 173026 „Molekularna karakterizacija bakterija iz rodova *Bacillus* i *Pseudomonas* kao potencijalnih agenasa za biološku kontrolu“, a od januara 2017. godine u zvanju istraživač-saradnik. Na Katedri za mikrobiologiju je od 2015. godine uključena u praktični deo nastave u okviru predmeta Mikrobiologija i Mikrobiološki praktikum na osnovnim studijama i na master akademskim studijama u okviru predmeta Metode u mikrobiologiji. Saradnik je na seminarima Istraživačke stanice Petnica. Član je Udruženja mikrobiologa Srbije, Srpskog Biološkog Društva, Društva genetičara Srbije i Federacije evropskih mikrobioloških društava (Federation of European Microbiological Societies). Tokom perioda 2016. – 2017. godine bila je član bilateralnog projekta pod nazivom „*Arbutus unedo* L. – prirodni pristup u kontroli infekcije mokraćnih puteva” organizovanog između Srbije i Hrvatske, a u toku 2018. je postala član bilateralnog projekta Srbije i Slovenije („Novi pristup: prirodni proizvodi kao potencijalni agensi u kontroli bolesti paunovog oka masline”). Dobitnica je stipendije za učešće na Desetom balkanskom kongresu mikrobiologije održanom 2017. Takođe, dobila je sertifikat za učestvovanje u radionici Američkog društva za mikrobiologiju održanoj 2018. godine pod nazivom „ASM Workshop on Scientific Writing and Publishing”. Do sada je objavila 6 naučnih radova od kojih su 2 rada u kategoriji M21a, 1 rad u kategoriji M22, 2 rada u kategoriji M23 i 1 rad nacionalnog značaja. Na naučnim skupovima u zemlji i inostranstvu imala je 10 saopštenja.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора **Тамара Јанакиев**

Број индекса **Б3009/2014**

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Микробиом шљиве (*Prunus domestica* L.) и потенцијал одабраних изолата за биоконтролу патогена шљиве

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 16.11.2019.



Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора **Тамара Јанакиев**

Број индекса **Б3009/2014**

Студијски програм **Биологија**

Наслов рада **Микробиом шљиве (*Prunus domestica* L.) и потенцијал одабраних
изолата за биоконтролу патогена шљиве**

Ментор **Проф. др Тања Берић**

Потписана **Тамара Јанакиев**

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 16.11.2019.



Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Микробиом шљиве (*Prunus domestica* L.) и потенцијал одабраних изолата за биоконтролу патогена шљиве

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
- 3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)**
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 16.11.2019.



1. **Ауторство.** Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.