



UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET



***Fusarium* spp. - prouzročivači fuzariozne truleži ploda jabuke i mogućnosti suzbijanja**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentori:

Prof. dr Mila Grahovac
Dr Jovana Hrustić

Kandidat:

Mladen Petreš

Novi Sad, 2021. godine

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА¹

Врста рада:	Докторска дисертација
Име и презиме аутора:	Младен Петреш
Ментор (титула, име, презиме, звање, институција)	Др Мила Граховац, ванредни професор, Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет Др Јована Хрустић, виши научни сарадник, Институт за пестициде и заштиту животне средине, Земун-Београд
Наслов рада:	<i>Fusarium</i> spp. - проузроковачи фузариозне трулежи плода јабуке и могућности сузбијања
Језик публикације (писмо):	Српски латиница
Физички опис рада:	Унети број: Страница 139 Поглавља 9 Референци 227 Табела 24 Слика 15 Графикона 21 Прилога //
Научна област:	Биотехничке науке
Ужа научна област (научна дисциплина):	Фитопатологија
Кључне речи / предметна одредница:	<i>Fusarium avenaceum</i> , <i>Fusarium graminearum</i> , јабука, секундарни метаболити, микотоксини, биолошко сузбијање, етарска уља, третмани топлом водом, 1-МСП
Резиме на језику рада:	Јабука је веома цењена воћна врста, чији плодови су због могућности дугог чувања доступни на тржишту целе године. Међутим, током складиштења јабуке могући су значајни губици који настају као последица физиолошких и паразитних обољења. Последњих година све чешће се детектују врсте рода <i>Fusarium</i> као проузроковачи трулежи јабуке у складиштима, а у Републици Србији су детектоване врсте <i>Fusarium avenaceum</i> и <i>Fusarium graminearum</i> . Надаље, ови патогени имају способност за продукцију микотоксина, што може довести до контаминације плодова и производа од јабуке микотоксинима. Циљеви овог рада су били да се утврди присуство и распрострањеност врста <i>Fusarium avenaceum</i> и <i>Fusarium graminearum</i> на ускладиштеним плодовима јабуке у АП Војводини; надаље, да се детектовањем разлика у морфолошким, патогеним, молекуларним, филогенетским и токсиколошким карактеристикама ове две врсте прошири укупно знање

¹ Аутор докторске дисертације потписао је и приложио следеће Обрасце:

5б – Изјава о ауторству;

5в – Изјава о истоветности штампане и електронске верзије и о личним подацима;

5г – Изјава о коришћењу.

Ове Изјаве се чувају на факултету у штампаном и електронском облику и не кориче се са тезом.

	<p>о овим врстама, а филогенетском анализом допринесе бољем сагледавању биодиверзитета популације ове две врсте у Републици Србији; да се утврди да ли потенцијал изолата <i>Fusarium</i> spp. за производњу микотоксина представља ризик од контаминације плодова и производа од јабуке. Такође, циљ је био да се дефинишу могућности сузбијања <i>Fusarium</i> врста на плодовима јабуке биолошким и физичким мерама.</p> <p>Утврђено је да се заступљеност врста рода <i>Fusarium</i> на плодовима јабуке са симптомима трулежи на територији АП Војводине кретала од 17,74%, током 2016. године, преко 7,94% током 2017. године, до 11,21% током 2018. године, при чеми је доминантна врста <i>F. avenaceum</i>. На основу морфолошких карактеристика сакупљени изолати су груписани у четири морфолошке групе. Утврђено је да изолати врсте <i>F. graminearum</i> формирају полни стадијум у лабораторијским условима, док изолати <i>F. avenaceum</i> нису развили полни стадијум. Универзалним прајмерима ITS1/ITS4 и EF1/EF2 секвенце циљних региона се могу успешно амплификовати и користити за филогенетску анализу, док се прајмерима специфичним за врсту <i>F. avenaceum</i> (FA-ITSF/ FA-ITSR) поуздано може детектовати ова врста. Утврђен је капацитет за производњу микотоксина зеараленон и деоксиниваленол ELISA тестом у хранљивој подлози од јабуке и на инокулисаним плодовима јабуке. Анализом генома биоинформатичким алатима утврђен је изузетно велики потенцијал оба испитивана изолата за продукцију различитих секундарних метаболита, укључујући и микотоксине. Утврђено је да су сва испитана етарска уља (<i>Origanum vulgare</i>, <i>Satureja hortensis</i>, <i>Ocimum basilicum</i> и <i>Salvia sclarea</i>), као и хидролат етарског уља <i>Satureja hortensis</i> испољила снажно антифунгално дејство против проузроковача фузариозне трулежи плодова јабуке. Утврђено је снажно инхибиторно дејство биолошких агенаса на развој колоније тестираних изолата у следећим концентрацијама: <i>Bacillus</i> spp. (1,5; 2 и 2,5%) и <i>Streptomyces hygroscopicus</i> (4 и 5%) <i>in vitro</i>, док је у <i>in vivo</i> испитивању виша испитана концентрација (5%) биолошког агенса <i>Bacillus</i> spp. испољила снажно инхибиторно дејство на развој трулежи, а у случају <i>S. hygroscopicus</i> обе концентрације (5 и 100%) су испољиле снажно инхибиторно дејство. Утврђена је снажна инхибиција раста колонија тестираних изолата применом биолошког агенса <i>Bacillus velezensis</i> у <i>in vitro</i> огледу у свим тестираним концентрацијама. У <i>in vivo</i> огледу утврђено је да третмани топлом водом поседују високи потенцијал за сузбијање оба испитивана проузроковача фузариозне трулежи на плодовима јабуке, међутим, неопходна је виша температура и дужи периоди излагања за инхибицију раста врсте <i>F. avenaceum</i> у односу на врсту <i>F. graminearum</i>. Утврђено је да третман са 1-MCP и DCA услови складиштења значајно утичу на развој фузариозне трулежи на плодовима јабуке, међутим, по престанку складиштења, њихов инхибиторни ефекат престаје.</p>
Датум прихватања теме од стране надлежног већа:	21.2.2020.
Датум одбране: (Попуњава одговарајућа служба)	
Чланови комисије: (титула, име, презиме, звање, институција)	Председник: Др Драгана Будаков, ванредни професор, Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет _____

	<p>Ментор: Др Мила Граховац, ванредни професор, Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет</p> <hr/> <p>Ментор: Др Јована Хрустић, виши научни сарадник, Институт за пестициде и заштиту животне средине, Земун-Београд</p> <hr/> <p>Члан: Др Ненад Магазин, ванредни професор, Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет</p> <hr/> <p>Члан: Др Ана Обрадовић, научни сарадник, Институт за кукуруз „Земун Поље“, Земун Поље, Београд</p> <hr/>
Напомена:	УДК 581.2:634.11.0(043.3)

KEY WORD DOCUMENTATION²

Document type:	Doctoral dissertation
Author:	Mladen Petreš
Supervisor (title, first name, last name, position, institution)	Dr. Mila Grahovac, associate professor, University of Novi Sad, Faculty of Agriculture Dr. Jovana Hrustić, senior research associate, Institute of Pesticides and Environmental Protection, Zemun-Belgrade
Thesis title:	<i>Fusarium</i> spp. – causal agents of <i>Fusarium</i> apple fruit rot and control options
Language of text (script):	Serbian language Latin script
Physical description:	Number of: Pages 139 Chapters 9 References 227 Tables 24 Illustrations 15 Graphs 21 Appendices //
Scientific field:	Biotechnical sciences
Scientific subfield (scientific discipline):	Plant Pathology
Subject, Key words:	<i>Fusarium avenaceum</i> , <i>Fusarium graminearum</i> , apple, secondary metabolites, mycotoxins, biological control, essential oils, hot water treatments, 1-MCP
Abstract in English language:	<p>Apple is a highly valued fruit, and due to the possibility of long-term storage, apple fruits are available on the market all year round. However, during the storage period, significant losses can occur as a consequence of physiological and parasitic diseases. In recent years, <i>Fusarium</i> species have been increasingly detected as causal agents of apple rot in storages, and in the Republic of Serbia two species <i>Fusarium avenaceum</i> and <i>Fusarium graminearum</i> were detected. Furthermore, these pathogens have the ability to produce mycotoxins, which can lead to contamination of apple fruits and products with mycotoxins.</p> <p>The objectives of this study were to determine the presence and distribution of <i>Fusarium avenaceum</i> and <i>Fusarium graminearum</i> on stored apple fruits in AP Vojvodina; furthermore, by detecting differences in morphological, pathogenic, molecular, phylogenetic and toxicological characteristics of these species the objective was to expand the overall knowledge about these species, and phylogenetic analysis to contribute to a better understanding of the biodiversity of the population of these two species in the Republic of Serbia; to determine whether the potential of <i>Fusarium</i> spp. for the production</p>

² The author of doctoral dissertation has signed the following Statements:

56 – Statement on the authority,

5B – Statement that the printed and e-version of doctoral dissertation are identical and about personal data,

5r – Statement on copyright licenses.

The paper and e-versions of Statements are held at the faculty and are not included into the printed thesis.

	<p>of mycotoxins carries a risk of apple fruits and apple products contamination; Also, the goal was to define the possibilities for control of <i>Fusarium</i> apple fruit rot by biological and physical measures.</p> <p>It was determined that the occurrence of <i>Fusarium</i> species on apple fruits with symptoms of rot on the territory of AP Vojvodina ranged from 17.74% in 2016, 7.94% in 2017, to 11.21% in 2018, and that the dominant species is <i>F. avenaceum</i>. Based on the morphological characteristics, the isolates were grouped into four morphological groups. Isolates of <i>F. graminearum</i> were found to form sexual stage under laboratory conditions, while isolates of <i>F. avenaceum</i> did not develop sexual stage. With universal primers ITS1/ITS4 and EF1/EF2 sequences of target regions can be successfully amplified and used for phylogenetic analysis, while species-specific primers for <i>F. avenaceum</i> (FA-ITSF/FA-ITSR) can be used for reliable detection of this species. The production of mycotoxins zearalenone and deoxynivalenol by ELISA was determined in apple agar medium and in inoculated apple fruits. Genome analysis with bioinformatics tools revealed an extremely high potential of both tested isolates for the production of various secondary metabolites, including mycotoxins. It was determined that all tested essential oils (<i>Origanum vulgare</i>, <i>Satureja hortensis</i>, <i>Ocimum basilicum</i> and <i>Salvia sclarea</i>), as well as the hydrolate of the essential oil of <i>Satureja hortensis</i> expressed a strong antifungal effect against the causal agent of <i>Fusarium</i> apple fruit rot. A strong inhibitory effect of biological agents on the colony development of tested isolates was determined at the following concentrations: <i>Bacillus</i> spp. (1.5; 2 and 2.5%) and <i>Streptomyces hygroscopicus</i> (4 and 5%) <i>in vitro</i>, while the higher tested concentration (5%) of the biological agent <i>Bacillus</i> spp. exhibited a strong inhibitory effect on the rot development, and in the case of <i>S. hygroscopicus</i> both concentrations (5 and 100%) exhibited strong inhibitory effect <i>in vivo</i>. Strong inhibition of colony growth of the tested isolates was determined after application of the biological agent <i>Bacillus velezensis</i> <i>in vitro</i> at all tested concentrations. <i>In vivo</i> experiments showed that hot water treatments have a high potential to control both causal agents of <i>Fusarium</i> apple fruit rot, however, higher temperature and longer exposure periods are required to inhibit the growth of <i>F. avenaceum</i>, compared to <i>F. graminearum</i>. Treatment with 1-MCP, as well as DCA storage conditions were found to significantly affect the rot development, however, upon the termination of the storage period, the inhibitory effect ceases.</p>
Accepted on Scientific Board on:	February 21, 2020
Defended: (Filled by the faculty service)	
Thesis Defend Board: (title, first name, last name, position, institution)	<p>President: Dr. Dragana Budakov, associate professor, University of Novi Sad, Faculty of Agriculture</p> <p>_____</p> <p>Mentor: Dr. Mila Grahovac, associate professor, University of Novi Sad, Faculty of Agriculture</p> <p>_____</p> <p>Mentor: Dr. Jovana Hrustić, senior research associate, Institute of Pesticides and Environmental Protection, Zemun-Belgrade</p> <p>_____</p>

	<p>Member: Dr. Nenad Magazin, associate professor, University of Novi Sad, Faculty of Agriculture</p> <hr/> <p>Member: Dr. Ana Obradović, research associate, Maize Research Institute “Zemun Polje”, Belgrade</p> <hr/>
Note:	UDC 581.2:634.11.0(043.3)

Posebnu zahvalnost dugujem mojoj mentorki prof. dr Mili Grahovac koja me je uvela u naučnoistraživački rad, koja je nadgledala i rukovodila izradom doktorske disertacije, koja mi je pružila nesebičnu podršku, pomoć, svoje znanje i iskustvo, bez kojih bi izrada ove doktorske disertacije bila nezamisliva.

Veoma sam zahvalan dr Jovani Hrustić, koja mi je, kao mentor, pružila dragocenu pomoć, podršku i korisne savete u toku izrade disertacije.

Zahvaljujem se dr Ani Obradović koja je rukovodila eksperimentalnim delom disertacije koji se odnosio na kvalitativnu i kvantitativnu analizu mikotoksina, kao i na obuci za sprovođenje analiza i pomoći u tumačenju rezultata.

Veoma sam zahvalan članovima komisije, prof. dr Dragani Budakov i prof. dr Nenadu Magazinu, na stručnoj pomoći, korisnim savetima i primedbama, bez kojih disertacija ne bi ovako izgledala.

Special thanks to Prof. Li-Jun Ma from the University of Massachusetts Amherst for the hospitality, for the knowledge and experience I earned during my Fulbright visit to her laboratory. I owe Dr. Dilay Hazal Ayhan immense gratitude for her selfless help.

*Zahvaljujem se prof. dr Jovani Grahovac, dr Ivani Pajčin i dr Vanji Vljakov sa Tehnološkog fakulteta, Univerzitet u Novom Sadu za pripremu metabolita *S. hygroscopicus* i kultivacione tečnosti *B. velezensis*. Dr Milici Aćimović sa Instituta za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu dugujem zahvalnost jer je obezbedila etarska ulja i hidrolate korišćene u ovom radu.*

Hvala mojim kolegama i prijateljima na podršci, strpljenju i razumevanju.

Mojoj majci Vesni, sestrama Katarini i Marini, mojoj supruzi Aleksandri i našem sinu Davidu hvala na pruženoj ljubavi i podršci.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE.....	5
2.1. Značaj jabuke	5
2.2. Značaj <i>Fusarium</i> vrsta na jabuci	5
2.3. Koncept vrste u rodu <i>Fusarium</i>	7
2.4. Metode identifikacije vrsta roda <i>Fusarium</i>	9
2.5. Mikotoksini i sekundarni metaboliti roda <i>Fusarium</i>	10
2.6. Biološke i fizičke mere zaštite plodova jabuke od <i>Fusarium</i> spp.....	13
2.6.1. Primena bakterija rodova <i>Bacillus</i> i <i>Streptomyces</i> u biološkoj zaštiti plodova jabuke od <i>Fusarium</i> spp.	15
2.6.2. Primena etarskih ulja u biološkoj zaštiti uskladištenih plodova jabuke od prouzrokovaca truleži.....	16
2.6.3. Primena tretmana toplom vodom u zaštiti uskladištenih plodova jabuke od prouzrokovaca truleži.....	17
2.6.4. Uticaj primene 1-MCP i dinamički kontrolisane atmosfere (DCA) na razvoj prouzrokovaca truleži uskladištenih plodova jabuke.....	18
3. ZADACI I CILJEVI ISTRAŽIVANJA	20
4. RADNE HIPOTEZE.....	22
5. MATERIJAL I METODE	23
5.1. Prikupljanje uzoraka, izolacija patogena i priprema monohifalnih izolata.....	23
5.2. Provera patogenosti izolata i zastupljenost vrsta roda <i>Fusarium</i>	25
5.3. Morfološke i odgajivačke odlike izolata <i>Fusarium</i> spp.	25
5.3.1. Morfološke odlike vegetativnih struktura.....	26
5.3.2. Morfološke odlike reproduktivnih struktura.....	26
5.3.3. Odgajivačke odlike izolata <i>Fusarium</i> spp.....	26
5.3.4. Obrazovanje polnog stadijuma	27
5.4. Molekularna identifikacija i karakterizacija izolata <i>Fusarium</i> spp.....	28
5.4.1. Ekstrakcija DNK i provera uspešnosti ekstrakcije.....	28
5.4.2. Identifikacija prajmerima specifičnim za vrstu.....	29
5.4.3. Amplifikacija sekvence gena <i>TEF-1a</i>	30
5.4.4. Filogenetska analiza.....	31

5.5.	Potencijal za sintezu mikotoksina izolata <i>Fusarium</i> spp.	32
5.6.	Procena potencijala za sintezu sekundarnih metabolita izolata <i>Fusarium</i> spp.	34
5.6.1.	Sekvenciranje, sklapanje i anotacija celog genoma	34
5.6.2.	Predikcija potencijala za sintezu sekundarnih metabolita	35
5.7.	Biološke i fizičke mere zaštite plodova jabuke od <i>Fusarium</i> spp.....	36
5.7.1.	Proizvodnja etarskih ulja, hidrolata i bioloških agenasa korišćenih u ogledima	36
5.7.2.	Izolati <i>Fusarium</i> spp. korišćeni u <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> ogledima	37
5.7.3.	Uticaj etarskih ulja i hidrolata etarskih ulja na fuzarioznu trulež ploda jabuke.....	38
5.7.4.	Uticaj bioloških agenasa <i>Bacillus</i> spp. i <i>Streptomyces hygroscopicus</i> na <i>Fusarium</i> spp.	40
5.7.5.	Uticaj biološkog agensa <i>Bacillus velezensis</i> na <i>Fusarium</i> spp.	41
5.7.6.	Uticaj toplotnih tretmana na <i>Fusarium</i> spp.	42
5.7.7.	Uticaj primene 1-MCP i dinamički kontrolisane atmosfere (DCA) u skladištu na razvoj fuzariozne truleži plodova jabuke	45
5.8.	Statističke metode i obrada podataka	47
6.	REZULTATI.....	48
6.1.	Prikupljanje uzoraka, izolacija patogena i priprema monohifalnih izolata.....	48
6.2.	Provera patogenosti izolata i zastupljenost vrsta roda <i>Fusarium</i>	50
6.3.	Morfološke i odgajivačke odlike izolata <i>Fusarium</i> spp.....	53
6.3.1.	Morfološke odlike vegetativnih struktura.....	53
6.3.2.	Morfološke odlike reproduktivnih struktura.....	55
6.3.3.	Odgajivačke odlike izolata <i>Fusarium</i> spp.....	57
6.3.4.	Obrazovanje polnog stadijuma	62
6.4.	Molekularna identifikacija i karakterizacija izolata <i>Fusarium</i> spp.....	64
6.4.1.	Ekstrakcija DNK i provera uspešnosti ekstrakcije.....	64
6.4.2.	Identifikacija prajmerima specifičnim za vrstu.....	65
6.4.3.	Amplifikacija sekvence gena <i>TEF-1α</i>	66
6.4.4.	Filogenetska analiza.....	67
6.5.	Potencijal za sintezu mikotoksina izolata <i>Fusarium</i> spp.	69
6.6.	Procena potencijala za sintezu sekundarnih metabolita izolata <i>Fusarium</i> spp.	71
6.6.1.	Sekvenciranje, sklapanje i anotacija celog genoma	71
6.6.2.	Predikcija potencijala za sintezu sekundarnih metabolita	73
6.7.	Biološke i fizičke mere zaštite plodova jabuke od <i>Fusarium</i> spp.....	74
6.7.1.	Uticaj etarskih ulja i hidrolata etarskih ulja različitih biljaka na fuzarioznu trulež ploda jabuke	74

6.7.2.	Uticaj bioloških agenasa <i>Bacillus</i> spp. i <i>Streptomyces hygroscopicus</i> na <i>Fusarium</i> spp.	81
6.7.3.	Uticaj biološkog agensa <i>Bacillus velezensis</i> na <i>Fusarium</i> spp.	85
6.7.4.	Uticaj toplotnih tretmana na <i>Fusarium</i> spp.	86
6.7.5.	Uticaj primene 1-MCP i dinamički kontrolisane atmosfere (DCA) u skladištu na razvoj fuzariozne truleži plodova jabuke	93
7.	DISKUSIJA	96
7.1.	Rasprostranjenost i značaj <i>Fusarium</i> spp. na plodovima jabuke	96
7.2.	Provera patogenosti izolata i zastupljenost vrsta roda <i>Fusarium</i>	96
7.3.	Morfološke i odgajivačke odlike izolata <i>Fusarium</i> spp.	97
7.3.1.	Morfološke odlike izolata <i>Fusarium</i> spp.	97
7.3.2.	Odgajivačke odlike izolata <i>Fusarium</i> spp.	99
7.3.3.	Obrazovanje polnog stadijuma	100
7.4.	Molekularna identifikacija i karakterizacija izolata <i>Fusarium</i> spp.	100
7.5.	Potencijal za sintezu mikotoksina izolata <i>Fusarium</i> spp.	102
7.6.	Procena potencijala za sintezu sekundarnih metabolita	103
7.7.	Biološke i fizičke mere zaštite plodova jabuke od <i>Fusarium</i> spp.	105
7.7.1.	Uticaj etarskih ulja i hidrolata etarskih ulja različitih biljaka na fuzarioznu trulež ploda jabuke	105
7.7.2.	Uticaj bioloških agenasa <i>Bacillus</i> spp., <i>Bacillus velezensis</i> i <i>Streptomyces hygroscopicus</i> na <i>Fusarium</i> spp.	106
7.7.3.	Uticaj tretmana toplom vodom na <i>Fusarium</i> spp.	107
7.7.4.	Uticaj primene 1-MCP i dinamički kontrolisane atmosfere (DCA) u skladištu na razvoj fuzariozne truleži plodova jabuke	109
8.	ZAKLJUČCI	112
9.	LITERATURA	115

1. UVOD

Jabuka je visoko hranljivo voće koje se široko koristi u ljudskoj ishrani pre svega zbog mogućnosti dugog čuvanja plodova u skladištu i dostupnosti na tržištu tokom cele godine. Međutim, održavanje visokog kvaliteta plodova nije jedini izazov tokom skladištenja, već je veoma važno osigurati mikrobiološku bezbednost plodova tokom i nakon skladištenja, jer osim fizioloških poremećaja, gubitke uzrokuju i brojni fitopatogeni mikroorganizmi među kojima se posebno ističu fitopatogene gljive. U slučaju nesprovođenja adekvatnih mera zaštite, ovi gubici se mogu kretati u rasponu od 5 do 25% u razvijenim zemljama, pa čak i do 50% u zemljama u razvoju (Ewekeye et al., 2013).

Vrste roda *Fusarium* su poznate kao patogeni velikog broja biljnih vrsta. Infekcije biljaka vrstama roda *Fusarium* mogu se ispoljiti na semenu, korenu, stablu, listu i plodu biljaka u vidu pegavosti, truleži, uvenuća, raka i dr. (Leslie and Summerell, 2006). Najzastupljenije vrste ovog roda koje prouzrokuju trulež ploda jabuke su: *F. avenaceum* (Fr.) Sacc., *F. culmorum* (W. G. Sm.) Sacc., *F. lateritium* Nees, *F. solani* (Mart.) Sacc. (Trkulja, 2008; Snowdon, 1990), *F. equiseti* (Gao et al., 2013), *F. proliferatum* (Konstantinou et al., 2011), a prema novijim istraživanjima i vrsta *F. graminearum* (Petreš i sar., 2017). Prema podacima iz Hrvatske, vrste ovog roda se javljaju na 9,4 – 33,2% trulih jabuka u hladnjačama sa veoma niskim procentom kiseonika (Ultra Low Oxygen - ULO) u zavisnosti od sorte (Sever et al., 2012). U Republici Srbiji zastupljenost ovih vrsta na plodovima sa simptomima truleži iznosi 4 – 22% (Krsmanović i sar., 2018), dok Wenneker (2019) navodi da se u Holandiji *F. avenaceum* javlja na do 25% plodova sorte Elstar. Ipak, zastupljenost *Fusarium* spp. u populacijama fitopatogenih gljiva koje prouzrokuju trulež plodova jabuke je varijabilna i razlikuje se od godine do godine. Do sada je vrsta *F. avenaceum* detektovana kao prouzrokovač truleži plodova jabuke u Sloveniji (Sørensen et al., 2009), Hrvatskoj (Sever et al., 2012), Italiji (Sanzani et al., 2013), SAD (Kou et al., 2014), Holandiji (Wenneker et al., 2016) i Srbiji, zajedno sa vrstom *F. graminearum* (Petreš i sar., 2017).

Ekonomski gubici koji nastaju kao posledica delovanja prouzrokovača truleži u skladištu mogu da premaše gubitke koji mogu nastati u samom procesu proizvodnje (Grahovac i sar., 2011). Međutim, štete koje pričinjavaju ove vrste se ne ogledaju samo u direktnom narušavanju

kvaliteta uskladištenih plodova, već i u tome što su vrste roda *Fusarium* sposobne da proizvode mikotoksine. Mikotoksini su termostabilni, sekundarni metaboliti gljiva koje je u procesu prerade gotovo nemoguće ukloniti iz kontaminiranih proizvoda, a imaju dokazano štetno delovanje na zdravlje ljudi i životinja. Vrste *F. avenaceum* i *F. graminearum* sintetišu veći broj mikotoksina, i to *F. graminearum*: deoksinivalenol (DON), nivalenol (NIV) i zearalenon (ZEA) (Obradović, 2017; Lević, 2008), dok *F. avenaceum* proizvodi: moniliformin, eniatine (A, A1, B, B1, B2 i B3), fuzarin C, antibiotik Y, 2-amino-14,16-dimetiloktadekan-3-ol (2-AOD-3-ol), hlamidosporol, aurofuzarin, fuzaristatin A i dr. (Sørensen et al., 2014; Sørensen et al., 2009). U istraživanjima Petreš et al. (2018) utvrđeno je da su ove dve vrste sposobne da proizvode mikotoksine u zaraženim plodovima jabuke, te zbog toga postoji mogućnost kontaminacije kako plodova, tako i proizvoda od jabuke ovim štetnim materijama.

Klasične metode identifikacije vrsta roda *Fusarium* podrazumevaju ispitivanje makroskopskih i mikroskopskih morfoloških i odgajivačkih karakteristika kao što su: boja kolonije, veličina i oblik mikrokonidija i makrokonidija, stvaranje hlamidospora, optimalna temperatura i pH za rast i razvoj, kao i sposobnost formiranja teleomorfnog stadijuma *Gibberella* (Lević, 2008; Leslie and Summerell, 2006). Identifikacija patogena klasičnim fitopatološkim metodama uz upotrebu hranljivih podloga i mikroskopa jeste jednostavna metoda, ali oduzima dosta vremena i često može biti nepouzdana, jer se pojedini mikroorganizmi, pogotovo srodni, teško mogu razlikovati na osnovu morfoloških karakteristika. U slučaju roda *Fusarium* identifikacija do nivoa vrste primenom klasičnih metoda je veoma nepouzdana. Zbog nedovoljne preciznosti i pouzdanosti klasičnih metoda, neophodna je potvrda identifikacije primenom molekularnih metoda - metoda lančane reakcije polimeraze (Polymerase chain reaction, PCR) (Grantina-Ievina, 2015; Sever et al., 2012; Tančić i sar., 2009). Molekularna identifikacija i filogenetsko proučavanje izolata roda *Fusarium* moguće je na osnovu razlika u sekvenci *TEF-1 α* (translation elongation factor 1- α) regiona kod različitih vrsta. Region *TEF-1 α* uspešno se umnožava PCR metodom pomoću prajmera EF1/EF2 (Geiser et al., 2004). Sa druge strane, vrsta *F. avenaceum* veoma pouzdano se može identifikovati pomoću PCR metode primenom prajmera specifičnih za ovu vrstu (Turner et al., 1998; Schilling et al., 1996).

Za suzbijanje truleži plodova jabuke u Republici Srbiji registrovani su sintetički fungicidi koji se primenjuju najkasnije sedam dana pre berbe, dok karenca kod pojedinih preparata može biti kraća i iznosi tri dana. Sa druge strane, vreme primene i karenca kod registrovanih bioloških

preparata namenjenih za suzbijanje truleži plodova iznosi tri dana (Petrović i Sekulić, 2021). Međutim, nakon poslednjeg tretmana plodovi ostaju nezaštićeni od prouzrokača truleži. Zbog nedostatka preparata koji bi se mogli primenjivati nakon berbe i tokom skladištenja plodova jabuke, kao i zbog nepovoljnih ekotoksikoloških svojstava sintetičkih fungicida, na čijoj primeni je zasnovana savremena zaštita plodova jabuke od prouzrokača truleži, neophodno je pronalaženje novih, alternativnih metoda za suzbijanje ovih patogena. Ove metode mogu da budu zasnovane na primeni bioloških agenasa (biofungicida), ali i primeni fizičkih mera suzbijanja (npr. tretmani toplom vodom, tretmani vodenom parom, tretmani toplim vazduhom, ali i jonizujuće zračenje, UV zračenje, itd.). Biofungicidi mogu biti na bazi mikroorganizama izolovanih iz prirodne sredine koji su sposobni da inhibiraju ili spreče razvoj fitopatogenih organizama (Degtyareva et al., 2009). Neki od organizama koji se već duže vreme istražuju i koriste u biološkom suzbijanju pripadaju rodovima *Bacillus* (Burr et al., 1978), *Streptomyces* (Tahvonen, 1982), *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Pantoea*, *Paenibacillus*, itd. (Carmona-Hernandez et al., 2019).

Vrste roda *Bacillus* su široko izučavane i komercijalno dostupne kao biološki preparati u poljoprivrednoj proizvodnji (Nicholson, 2002), a koji su ispoljili značajnu efikasnost u suzbijanju mnogih prouzrokača truleži (Grahovac et al., 2019; Wachowska et al. 2013). Takođe, metaboliti vrste *Streptomyces hygroscopicus* su ispoljili značajan potencijal za suzbijanje fitopatogenih vrsta gljiva iz rodova *Colletotrichum*, *Fusarium* i *Alternaria* (Grahovac et al., 2017; Mitrović et al., 2017; Tadijan et al., 2016; Grahovac, 2014).

Osim toga, etarska ulja pojedinih biljaka se nameću kao logičan izbor u zaštiti od prouzrokača truleži zbog snažne antifungalne aktivnosti, lake biorazgradivosti, povoljnih ekoloških svojstava i malom riziku za razvoj rezistentnosti patogena (Grahovac et al., 2012; Duduk et al., 2010; Daferera et al., 2003).

S obzirom da temperatura značajno utiče na razvoj fitopatogenih mikroorganizama (Caffarra et al., 2012), tretmani plodova voća toplotom vodom predstavljaju ekološki prihvatljivu i zdravstveno bezbednu alternativnu metodu suzbijanja patogena i insekata na plodovima voća (Petreš i sar., 2016).

Jedinjenje 1-metilciklopropan (1-MCP) deluje kao inhibitor biljnog hormona etilena, te usporava proces sazrevanja plodova vezujući se za etilenske receptore (Mao et al., 2007). Koristi se za sprečavanje pojave fizioloških oboljenja uskladištenih plodova, kao i za očuvanje kvaliteta

i svežine nakon skladištenja (Magazin et al., 2010; Akbudak et al., 2009). Takođe, više istraživača u svetu je ispitivalo uticaj 1-MCP na razvoj prouzrokovala truleži uskladištenih plodova jabuke (Li et al., 2017; Xu et al., 2017; Cameldi et al., 2016). Hladnjače sa dinamički kontrolisanom atmosferom (Dynamic Controlled Atmosphere – DCA) su sistemi za skladištenje gde se koncentracija kiseonika postepeno smanjuje i dinamički optimizuje tokom skladištenja i održava iznad donje granice kiseonika (lower oxygen limit – LOL) (Maxin, 2012; Prange et al., 2013). 1-MCP i DCA mogu da uspore sazrevanje plodova jabuke i da produže rok čuvanja plodova (Köpcke, 2015).

Imajući u vidu značaj i štetnost vrsta roda *Fusarium* na plodovima jabuka, kao i nedostatak podataka o ovim patogenima na plodovima jabuke u Srbiji, u ovom istraživanju ispitana je zastupljenost vrsta roda *Fusarium* na uskladištenim plodovima jabuke, njihov potencijal za sintezu mikotoksina kako bi se procenio rizik od kontaminacije koji prisustvo ovih patogena nosi sa sobom, kao i mogućnosti suzbijanja ovih patogena u skladu sa održivim razvojem proizvodnje jabuke.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Značaj jabuke

Jedna od ekonomski najisplativijih grana poljoprivrede jeste proizvodnja voća, dok je jabuka jedna od vodećih voćnih vrsta. Prema podacima FAO, tokom 2019. godine jabuka se proizvodila na 4.717.384 hektara, sa ukupnim prinosom od 87.236.221 tona. Najveći proizvođač jabuke u svetu je Kina sa 42.425.400 tona, odnosno 48,63% svetske proizvodnje, dok su SAD sa 4.997.680 tona drugom mestu. Najveći evropski proizvođači su Poljska sa 3.080.600 tona i Italija sa 2.303.690 tona. U Republici Srbiji površine pod zasadima jabuke u 2019. godini iznosile su 26.089 hektara, sa ukupnim prinosom od 499.578 tona (FAOSTAT, 2019). Od proizvodnje jabuke postoje višestruki ekonomski benefiti, s obzirom da proizvodnja jabuka donosi zaradu po jedinici površine koja je 10 do 15 puta veća od vrednost proizvodnje po hektaru u odnosu na žitarice i kukuruz. Takođe, proizvodnja jabuka zahteva i do 20 puta više radne snage od proizvodnje strnih žita. Jabuka je visoko hranljivo voće, koje se široko koristi u ljudskoj ishrani, čiji plodovi sadrže razne hranljive materije koje doprinose očuvanju zdravlja. Poznata je narodna izreka na engleskom jeziku „An apple a day, keeps a doctor away“, koja govori o blagotvornom dejstvu jabuke na zdravlje ljudi. Zbog svoje sposobnosti dugog čuvanja u skladištu, plodovi jabuke dostupni su na tržištu tokom cele godine (Vico et al., 2014).

2.2. Značaj *Fusarium* vrsta na jabuci

Rod *Fusarium* je jedna od najznačajnijih grupa patogena biljaka, ali sve češće se javlja i kao patogen ljudi i životinja. Među nekoliko vrsta koje se javljaju kao ljudski patogeni najzastupljenije su *F. solani* (oko 50%) i *F. oxysporum* (oko 20%), dok se ostale vrste (*F. verticillioideis*, *F. moniliforme*, itd.) javljaju u značajno manjem procentu (Batista et al., 2020; Al-Maqtoofi and Thornton, 2016; Nucci and Anaissie, 2007). Fuzarioze su, nakon aspergiloza, najčešće oportunističke gljivične infekcije kod ljudi (Guarro, 2013). Kao prouzrokovatelj bolesti kod ljudi *Fusarium* vrste mogu prouzrokovati širok spektar oboljenja, od lokalnih, kao što je gljivični keratitis, do teških sistemskih infekcija kod imunokompromitovanih pacijenata (Hof, 2020; Nucci and Anaissie, 2007). Iako oportunistički patogeni, *Fusarium* vrste su vodeći

uzročnik slepila među pacijentima obolelih od gljivičnog keratitisa, dok je smrtnost kod sistemskih infekcija veoma visoka i može da dosegne i 100% (Zhang et al., 2020). Takođe, zabeleženi su kao patogeni više vrsta životinja i insekata (Gleason et al., 2019; Sharma and Marques, 2018; Makkonen et al., 2013; Evans et al., 2004; Ortoneda et al., 2002).

Ipak, *Fusarium* vrste su najznačajnije kao prouzrokovajući bolesti biljaka i predstavljaju jedan od ekonomski najznačajnijih rodova fitopatogenih gljiva (Ferrigo et al., 2016). Kako navode Leslie i Summerell (2006), a prema podacima Američkog fitopatološkog društva (APS), od 101 ekonomski značajne biljne vrste, najmanje 81 biljna vrsta ima barem jednu bolest koju prouzrokuju vrste roda *Fusarium*. Simptomi infekcije ovim gljivama se mogu ispoljiti na semenu, korenu, stablu, listu i plodu biljaka u vidu pegavosti, truleži, uvenuća, raka i dr. (Leslie and Summerell, 2006), a najpoznatije su kao prouzrokovajući oboljenja žitarica i kukuruza, ali i soje i graška (O'Donnell et al., 2013). Možda i najbolji primer u kome se ogleda značaj *Fusarium* vrsta kao biljnih patogena jeste pojava devastirajuće bolesti banane koja je izazvala gotovo potpuno izumiranje sorte Gros Michel, a uzročnik je *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropska rasa 1 (TR1). To je dovelo do velikih promena u proizvodnji banana, pa se tako danas proizvodi sorta Cavendish. Međutim, poslednjih godina pojavila se tropska rasa 4 (TR4), koja sve više ugrožava proizvodnju sorte Cavendish (Dale et al., 2017).

Osim toga, *Fusarium* vrste se sve češće javljaju i kao prouzrokovajući truleži uskladištenih plodova jabuke. Najčešće vrste ovog roda koje su identifikovane kao prouzrokovajući truleži plodova jabuke jesu *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. lateritium*, *F. solani* (Trkulja, 2008; Snowdon, 1990), *F. equiseti* (Gao et al., 2013), *F. proliferatum* (Konstantinou et al., 2011), a prema novijim istraživanjima i vrste *F. graminearum* (Petreš i sar., 2017) i *F. decemcellulare* (Lee et al., 2017). Štete koje prouzrokuju vrste ovoga roda na plodovima jabuke se razlikuju u zavisnosti od sorte i vrste skladišta. Tako, prema dostupnim podacima iz naše zemlje zastupljenost ovih vrsta kao prouzrokovача truleži iznosi 4 – 22% (Krsmanović i sar., 2018), a slični podaci su zabeleženi i u susednoj Republici Hrvatskoj gde zastupljenost vrsta ovog roda kao prouzrokovача truleži u ULO hladnjačama, u zavisnosti od sorte, iznosi 9,4 – 33,2% (Sever et al., 2012). U Holandiji na sorti Elstar trulež prouzrokovana vrstom *F. avenaceum* iznosi i do 25%, navodi Weneker (2019). Vrsta *F. avenaceum* potvrđena je kao prouzrokovач truleži plodova jabuke u više zemalja i to: Sloveniji (Sørensen et al., 2009), Hrvatskoj (Sever et al.,

2012), Italiji (Sanzani et al., 2013), SAD (Kou et al., 2014), Holandiji (Wenneker et al., 2016) i Srbiji, zajedno sa vrstom *F. graminearum* (Petreš i sar., 2017).

Štete koje vrste ovog roda prouzrokuju se ne ogledaju samo u direktnom narušavanju kvaliteta uskladištenih plodova. Mora se uzeti u obzir da vrste roda *Fusarium* imaju sposobnost za proizvodnju mikotoksina na supstratima na kojima se razvijaju. Mikotoksini su sekundarni metaboliti gljiva za koje se smatra da nemaju ulogu u njihovom rastu i razvoju, već im je uloga odbrana od drugih mikroorganizama (Pitt, 2000). Kod životinja koje konzumiraju kontaminiranu hranu mogu prouzrokovati poremećaje metabolizma koji, opet, mogu dovesti do uginuća, a značajnu opasnost predstavljaju i po zdravlje ljudi (Ferrigo et al., 2016; Marasas, 1984). Imajući u vidu da su plodovi jabuke značajna sirovina u prehrambenoj industriji i da, vrlo često, plodovi slabijeg kvaliteta i oni sa simptomima truleži završavaju upravo kao osnovna sirovina za proizvodnju prehrambenih proizvoda, veoma je značajno proučavanje ovih vrsta, a posebno pronalaženje rešenja za sprečavanje njihove pojave i njihovih metabolita na uskladištenim plodovima jabuke. Vrste roda *Fusarium* imaju sposobnost da produkuju veći broj mikotoksina. Najznačajniji mikotoksini koje sintetišu vrste za koje je dokazano da prouzrokuju trulež uskladištenih plodova jabuke su sledeći: *F. graminearum* sintetiše deoksinivalenol (DON), nivalenol (NIV) i zearalenon (ZEA) (Obradović, 2017; Lević, 2008); *F. avenaceum* sintetiše moniliformin, eniatine (A, A1, B, B1, B2 i B3), fuzarin C, antibiotik Y, 2-amino-14,16-dimethiloktadekan-3-ol (2-AOD-3-ol), hlamidosporol, aurofuzarin, fuzaristatin A itd. (Sørensen et al., 2014; Sørensen et al., 2009; Uhlig et al., 2005). Potencijal ovih vrsta za sintezu mikotoksina na plodovima jabuke je, takođe, utvrđen u Republici Srbiji u istraživanjima Petreš et al. (2018).

2.3. Koncept vrste u rodu *Fusarium*

Aktuelna taksonomska klasifikacija vrsta roda *Fusarium* je sledeća: anamorfnu stadijum *Fusarium* je svrstan u razdeo Ascomycota, klasu Sordariomycetes, red Hypocreales, familiju Nectriaceae (Ma et al., 2013), dok se teleomorfnu stadijum najčešće svrstava u rod *Gibberella*, a manji broj vrsta u rodove *Hemanectria* i *Albonectria* (Moretti, 2009), mada su Geiser et al. (2013) predložili da se, po principu jedna vrsta jedan naziv, zadrži i koristi samo naziv *Fusarium* prilikom imenovanja vrsta iz ovog roda. Kriterijumu za definisanje vrste mogu biti morfološki,

biološki (sposobnost da se ukrštanjem izolata dobiju fertilne askospore) i filogenetski (ispitivanje srodnosti vrsta na osnovu zajedničke evolutivne istorije) (Aoki et al., 2014; Moretti, 2009; Leslie and Summerell, 2006). Rod *Fusarium* je prvi put opisao Link 1809. godine (Manawasinghe et al., 2021; Summerell, 2019) i to na osnovu prisutnosti i morfologije karakterističnih makrokonidija zakrivljenog oblika. Mnogo kasnije, 1935. godine Wollenweber i Reinking u Nemačkoj objavljuju delo “Die *Fusarien*”, u kom su prema morfološkim svojstvima opisali 65 vrsta, 55 varijeteta i 22 forme i klasifikovali ih u 16 sekcija, a 1940. godine u SAD Snyder i Hansen uvode novi taksonomski sistem u rod *Fusarium* (Summerell, 2019; Babadoost, 2018). Rad na taksonomiji *Fusarium* vrsta nastavljen je i u narednim decenijama. U Ujedinjenom Kraljevstvu Booth 1971. godine izdaje delo “The Genus *Fusarium*”, koje je donelo značajna unapređenja u taksonomiji, te su opisane 44 vrste (Summerell, 2019). Od sredine 1980-ih godina javljaju se i razvijaju molekularne metode, te istraživači danas koriste kombinaciju morfološkog, biološkog i filogenetskog koncepta u determinaciji *Fusarium* vrsta (Summerell, 2019). Naime, Leslie i Summerell objavili su 2006. godine kapitalno delo “The *Fusarium* Laboratory Manual”, koje objedinjuje sva tri koncepta i opisali 70 *Fusarium* vrsta. Neophodno je spomenuti delo od izuzetnog značaja za proučavanje vrsta iz roda *Fusarium* kakvo predstavlja monografija “Vrste roda *Fusarium*”, koju je priredila Lević (2008), što je prva monografija takve vrste u našoj zemlji.

Molekularna filogenetska istraživanja su ukazala da je podela na sekcije kakvu su uveli Wollenweber i Reinking (1935) veštačka, odnosno da su vrste polifiletskog porekla, što je dovelo do definisanja kompleksa vrsta kao monofiletskih kategorija (Thomas et al., 2019; Aoki et al., 2014). Prema Summerell (2019) kompleks vrsta, iako nema formalno priznati status u nomenklaturi, može doprineti stabilizaciji nomenklature i pripomoći u jasnom definisanju vrsta. Više od 300 vrsta roda *Fusarium*, koliko ih je danas poznato, grupisano je u 23 kompleksa vrsta (Dongzhen et al., 2020; Bansal et al., 2019; Moretti, 2009), a većina biljnih patogena iz ovog roda su svrstani u četiri kompleksa vrsta: *Fusarium fujikuroi* species complex (FFSC), *Fusarium graminearum* species complex (FGSC), *Fusarium oxysporum* species complex (FOSC) i *Fusarium solani* species complex (FSSC) (Aoki et al., 2014). Nadalje, infraspecifična odrednica koja se danas najviše koristi kod *Fusarium* vrsta jeste forma *specialis* i najčešće se povezuje sa *F. oxysporum*. Forma *specialis* je veštačka taksonomska grupa koja se oslanja na sposobnost da se prouzrokuje bolest na određenom domaćinu, a ona dalje može da se deli na nižu kategoriju

rase (Ma et al., 2013; Leslie and Summerell, 2006). Veliki doprinos izučavanju dali su Ma et al. (2010) kada su prilikom ispitivanja *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* utvrdili postojanje prekobrojnih hromozoma, odnosno utvrdili da je genom podeljen na osnovni (core) genom i adaptivni genom. Ti prekobrojni (lineage specific – LS chromosomes) hromozomi su nosioci virulentnosti prema specifičnom domaćinu i horizontalnim transferom mogu se prenositi na nepatogene sojeve, koji na taj način postaju patogeni. Na ovaj način se može objasniti polifiletsko poreklo specifičnosti za domaćina unutar *F. oxysporum* kompleksa vrste (Zhang et al., 2020; Ma et al., 2013).

2.4. Metode identifikacije vrsta roda *Fusarium*

Identifikacija vrsta roda *Fusarium* klasičnim metodama podrazumeva ispitivanje makroskopskih i mikroskopskih morfoloških, ali i odgajivačkih karakteristika kao što su: boja kolonije, veličina i oblik mikrokonidija i makrokonidija, stvaranje hlamidospora, optimalna temperatura i pH za rast i razvoj, kao i sposobnost formiranja teleomorfnog stadijuma (Lević, 2008; Leslie and Summerell, 2006). Prema Lević (2008) micelija vrste *F. avenaceum* na PDA podlozi raste 5 – 8 cm za deset dana pri 25 °C. Micelija je vazдушna, obilna, bela do ružičasta. U podlogu luči pigment sivkasto ružičaste do tamno crvene boje. Formira sporodohije na CLA podlozi svetlo narandžaste do smeđe boje u sredini kolonije (Lević, 2008; Leslie and Summerell, 2006). Konidiofore mogu biti tipa monofijalida i polifijalida. Prema Lević (2008) i Yli-Mattila et al. (2018) vrsta ne formira mikorokonidije i hlamidospore, dok mezokonidije (sa 3 – 5 septi) i makrokonidije (sa 3, 5 ili 7 septi) formira. Leslie i Summerell (2006) ne prave razliku između mikrokonidija i mezokonidija. Kod vrste *F. graminearum* na PDA podlozi porast micelije je brz, i to 7,5 – 8 cm za pet dana pri 25 °C (Lević, 2008). Micelija je vazдушna, gusta, bela, svetlo narandžasta do žuta, sa karmin crvenim pigmentom u podlozi (Lević, 2008; Leslie and Summerell, 2006). Sporodohije su žute, narandžaste, do crveno smeđe, konidiofore su tipa monofijalida (Lević, 2008). Mikrokonidije i mezokonidije ne formira, dok su makrokonidije karakteristične, ujednačeno savijene, umereno srpaste sa najčešće 5 – 6 septi, izuzetno 3 – 4 ili 7 – 9 septi, vršne ćelije su kupaste, a bazalna ćelija oblika stopala. Hlamidospore su loptaste, bezbojne do bledosmeđe, pojedinačne ili u nizovima, češće u makrokonidijama nego u miceliji (Lević, 2008; Leslie and Summerell, 2006).

Identifikacija klasičnim metodama, iako jednostavna, oduzima dosta vremena i vrlo često može biti nepouzdana. Naime, pojedini mikroorganizmi, pogotovo srodni, teško se mogu razlikovati samo na osnovu morfoloških karakteristika. Tako su Snyder i Hansen 1940. godine opisali metodologiju identifikacije *Fusarium* vrsta samo na osnovu vizuelnog posmatranja kolonija na hranljivoj podlozi u Petri kutiji, na osnovu čega su opisali svega devet vrsta, što se pokazalo kao preterano uprošćavanje (Aoki et al., 2014). Iako najznačajnije fitopatogene vrste roda *Fusarium* mogu da se, uz neophodno iskustvo, identifikuju na osnovu morfologije (Summerell, 2019), vrlo često je identifikacija do nivoa vrste primenom klasičnih metoda veoma teška, zbog veoma malih razlika između pojedinih vrsta (Zhu et al., 2014). Zbog nedovoljne preciznosti i pouzdanosti klasičnih metoda, potvrda identifikacije je neophodna primenom molekularnih metoda, u prvom redu metodom lančane reakcije polimeraze (Polymerase chain reaction – PCR) (Grantina-Ievina, 2015; Sever et al., 2012; Tančić i sar., 2009). Molekularna identifikacija vrste *F. avenaceum* se veoma pouzdano izvodi PCR metodom primenom prajmera specifičnih za ovu vrstu (Turner et al., 1998; Schilling et al., 1996). Takođe, opisani su prajmeri specifični i za druge vrste iz ovog roda kao što su *F. graminearum*, *F. culmorum* (Schilling et al., 1996), *F. redolens* (Bogale et al., 2007), itd. Na osnovu filogenetskih markera moguće je utvrditi postojanje različitih vrsta i genetskih populacija gljiva (Walkowiak et al., 2016). Filogenetska proučavanja vrsta roda *Fusarium* se vrše na osnovu razlika u sekvenci nekoliko gena kao što su *TEF-1 α* (translation elongation factor 1- α), *TUB* (β -tubulin), *URA* (UTP-ammonia ligase), *TRH101* (trichothecene 3-O-acetyltransferase), *PHO* (phosphate permase genes), *RPB1* i *RPB2* (RNA polymerase II), *MATI* (mating type locus) i drugi (Stakheev et al., 2016; O'Donnell et al., 2013; Kawabe et al., 2007; Geiser et al., 2004; O'Donnell et al., 2000).

2.5. Mikotoksini i sekundarni metaboliti roda *Fusarium*

Sekundarni metaboliti filamentoznih gljiva su jedinjenja male molekulske težine koji nemaju esencijalnu ulogu u rastu i razvoju, već im daju prednost u različitom okruženju i u odnosu na druge mikroorganizme. Njihova uloga je veoma raznolika, od pigmenta do mikotoksina, hormona i antibiotika (Ma et al., 2013). Produkcija ovih jedinjenja je kontrolisana od strane više gena koji su grupisani u klastere gena pozicioniranih duž hromozoma (Sieber et al., 2014). Većina sekundarnih metabolita se sintetiše kroz aktivnost poliketid sintaza (PKS), a za

njima slede neribozomalne peptid sintaze (NRPS) i terpen sintaze (TS) (Brown and Proctor, 2016; Ma et al., 2013). Produkti ovih gena tzv. backbone gena su ključni enzimi koji su kasnije podvrgnuti modifikacijama od strane enzima i drugih produkata koji su kodirani preostalim genima iz klastera, sve do formiranja biološki aktivnih materija (Theobald et al., 2018). Više autora je dokazalo da *Fusarium* vrste poseduju ogroman potencijal za sintezu sekundarnih metabolita (Brown and Proctor, 2016; Ma et al., 2013; Cuomo et al., 2007), međutim detekcija tih jedinjenja hemijskim analizama je otežana, jer ekspresija klastera gena nije uvek moguća u laboratorijskim uslovima (Sieber et al., 2014).

Veliki broj vrsta roda *Fusarium* poseduje sposobnost za sintezu mikotoksina. Ova jedinjenja mogu prouzrokovati poremećaje metabolizma domaćih životinja koji dovode do uginuća, a mogu predstavljati značajnu opasnost i po zdravlje ljudi (Marasas, 1984). Prema Lević (2008), 35 vrsta ovog roda sposobno je da produkuje 137 mikotoksina. Vrste *F. avenaceum* i *F. graminearum* sintetišu veći broj mikotoksina, i to *F. graminearum*: deoksinivalenol (DON), nivalenol (NIV) i zearalenon (ZEA) (Obradović, 2017; Lević, 2008), dok *F. avenaceum* produkuje: moniliformin, eniatine (A, A1, B, B1, B2 i B3), fuzarin C, antibiotik Y, 2-amino-14,16-dimetiloktadekan-3-ol (2-AOD-3-ol), hlamidosporol, aurofuzarin, fuzaristatin A i dr. (Sørensen et al., 2014; Sørensen et al., 2009). U istraživanjima Petreš et al. (2018) utvrđeno je da su ove dve vrste sposobne da produkuju mikotoksine u zaraženim plodovima jabuke.

U nastavku će biti opisane najvažnije grupe mikotoksina koje produkuju vrste roda *Fusarium*, što uključuje trihotecene, fumonizine, zearalenon, moniliformin i eniatine (Lysøe et al., 2014).

Trihoteceni su derivati seskviterpena i najčešće kontaminiraju kukuruz, ječam i druga strna žita (Lević, 2008). Mehanizam delovanja trihotecena se ogleda u inibiciji sinteze ribozomalnih proteina, te na taj način ispoljavaju svoju toksičnost (Desjardins and Proctor, 2007). Trihoteceni su podeljeni u dve grupe: tip A i tip B, na osnovu prisustva, odnosno odsustva određenih hemijskih grupa na molekulu ugljenika C-8. Tip A uključuje nekoliko mikotoksina: T-2, HT-2, monoacetoksiscirpenol, diacetoksiscirpenol i druge, dok tip B uključuje: deoksinivalenol, nivalenol i fuzarenon-X (Logrieco et al., 2002). Intoksikacija trihotecenima se manifestuje različitim simptomima (povraćanje, dermatitis, hemoragične lezije, gastroenteritis i bolesti koštane srži, poremećaj humornog i ćelijskog imunološkog odgovora, nervne

poremećaje, itd.) kod životinja, kao i kod ljudi (Jimenez-Garcia et al., 2018; Logrieco et al., 2002). Deoksinivalenol (DON), poznat i kao vomitoksin, i njegovi derivati (3-ADON, 15-ADON i 3,15-ADON) najčešći su trihoteceni koji kontaminiraju strna žita i kukuruz, kao i prehrambene proizvode od kukuruza i žitarica. Intoksikacija može biti hronična i akutna i manifestuje se pojavom različitih simptoma: mučnina, povraćanje, dijareja i drugi gastrointestinalni simptomi, reproduktivni poremećaji, hematološki poremećaji, itd. (Ferrigo et al., 2016; Sobrova et al., 2010).

Fumonizini su derivati poliketida i široko su prisutni kao prirodni kontaminanti žitarica, kukuruza, kao i hrane za ljude i životinje (Ferrigo et al., 2016; Lević, 2008). Postoje četiri vrste fumonizina, i to A, B, C i P (Logrieco et al., 2002). Fumonizini imaju hemijsku strukturu sličnu sfinganinu i sfingozinu koji se nalaze u sfingolipidima. Kao inhibitori biosinteze sfingolipida, njihova toksičnost je povezana sa poremećajem metabolizma sfingolipida (Glenn et al., 2008). Kod oglednih životinja izlaganje fumonizinima dovelo je do hepatotoksičnih i kancerogenih efekata. Kod ljudi je utvrđena veza između fumonizina i raka jednjaka (Myburg et al., 2002). Prema Lević (2008), intoksikacija fumonizinima može izazvati hepatotoksične, nefrotoksične, mijelotoksične i neurotoksične poremećaje. Do sada nije otkriveno prisustvo fumonizina u zaraženim plodovima jabuke.

Zearalenon (ZEA) je derivat poliketida i najčešći je prirodni prouzročivač kontaminacije uskladištenih poljoprivrednih proizvoda (kukuruz, ječam, pšenica, sirak, itd.), smeša za ishranu životinja, itd. (Lević, 2008). ZEA i DON se vrlo često javljaju zajedno (Ferrigo et al., 2016). S obzirom da je hemijska struktura zearalenona slična strukturi estrogena, ovaj mikotoksin može izazvati kod životinja i ljudi neplodnost, hipertrofiju mlečnih žlezda, hiperestrogenizam i stimulaciju rasta ćelija raka dojke kod ljudi (Jimenez-Garcia et al., 2018; Logrieco et al., 2002). Takođe, intoksikacija zearalenonom povezana je sa pojavom preuranjenog puberteta kod devojčica koje su bile izložene kontaminiranoj hrani. Iz tog razloga neophodna je stroga kontrola hrane za bebe na prisustvo zearalenona (Obradović, 2017). Prisustvo mikotoksina deoksinivalenola i zearalenona detektovano je u uskladištenim plodovima jabuke zaraženim *F. graminearum* u Srbiji (Petreš et al., 2018).

Moniliformin je natrijumova ili kalijumova so 1-hidroksi-ciklobut-1-en-3,4-diona. Dobio je naziv po vrsti *F. moniliforme* iz koje je prvi put izolovan (Lević, 2008). Moniliformin je inhibitor tiamin pirofosfat zavisnih enzima, toksičan je za živinu, glodare i svinje, a takođe je

povezan sa hematološkim poremećajima i hipertrofijom miokarda kod sisara, dok je u Kini utvrđeno da su osobe izložene moniliforminu obolele od lezija srca (Uhlig et al., 2007; Logrieco et al., 2002). Moniliformin je takođe detektovan u plodovima jabuke veštački i prirodno zaraženim vrstom *F. avenaceum* (Sørensen et al., 2009).

Eniatini i bovericin su neribozomski, ciklični heksadepsipeptidi koji ispoljavaju antibiotsku aktivnost, a proizvode ih različite *Fusarium* vrste (Lević, 2008; Desjardins and Proctor, 2007). Bovericin je prvi put detektovan kao produkt entomopatogene gljive *Beauveria bassiana* (Liuzzi et al., 2017), a utvrđeno je da poseduje antifungalno, antibiotsko i insekticidno delovanje (Sørensen et al., 2009). Eniatini takođe imaju antibiotsko, insekticidno i fitotoksično delovanje (Lević, 2008). Prema Liuzzi et al. (2017), do sada je prijavljeno 29 prirodnih analoga eniatina: eniatini A (A1, A2, A3, A4), eniatini B (B1, B2, B3, B4), te eniatini C, D, E i F. Eniatini A, A1, B i B1 detektovani su u plodovima jabuke, veštački i prirodno zaraženim sa *F. avenaceum* u ogledima Sørensen et al. (2009).

Postoji nekoliko mikotoksina koji se sve češće detektuju i čija značajnost kao kontaminanata je sve veća. Jedan od njih je 2-amino-14,16-dimetiloktadekan-3-ol (2-AOD-3-ol). Slično fumonizinima, sekundarni je metabolit sa strukturom sličnom sfinganinu i pripada grupi sfinganin analognim metabolitima (SAM). Do sada nije bilo drugih podataka o SAM osim fumonizina (Kim et al., 2020), međutim, za razliku od fumonizina, dokazano je da *F. avenaceum* proizvodi 2-AOD-3-ol (Uhlig et al., 2007). Sørensen et al. (2009) detekovali su ovaj mikotoksin u plodovima jabuke veštački i prirodno zaraženim sa *F. avenaceum*. Takođe, Sørensen et al. (2009) otkrili su značajne količine i drugih mikotoksina, kao što su akuminatopiron, hrizogin, hlamidosporol, aurofuzarin i antibiotik Y u plodovima jabuke zaraženim sa *F. avenaceum*.

2.6. Biološke i fizičke mere zaštite plodova jabuke od *Fusarium* spp.

Suzbijanje truleži plodova jabuke pomoću sintetičkih fungicida u Republici Srbiji dozvoljeno je najkasnije sedam dana pre berbe, dok karenca preparata može iznositi tri, sedam ili 14 dana. U slučaju bioloških preparata namenjenih za suzbijanje truleži plodova vreme primene i karenca iznose tri dana (Petrović i Sekulić, 2021). S obzirom da infekcije plodova mogu da se ostvare i nakon berbe, odnosno tokom skladištenja, plodovi ostaju nezaštićeni od prouzrokovača truleži. Prema istraživanjima Ewekeye et al. (2013) i Nunes (2012), gubici koji se javljaju tokom

perioda skladištenja se kreću od 5 do 25% u razvijenim zemljama, pa čak do 50% u zemljama u razvoju. Nedostatak adekvatnih preparata koji mogu da se primenjuju nakon berbe i tokom skladištenja plodova jabuke, kao i zbog nepovoljnih ekotoksikoloških svojstava sintetičkih fungicida njihovog negativnog uticaja na životnu sredinu, nameće potrebu pronalaženja novih, alternativnih metoda za suzbijanje ovih patogena (Grahovac i sar., 2009). Ove metode mogu da se zasnivaju na biološkim agensima (biofungicidi) i fizičkim merama. Biofungicidi mogu biti na bazi mikroorganizama izolovanih iz prirodne sredine koji su sposobni da inhibiraju ili spreče razvoj fitopatogenih organizama (Degtyareva et al., 2009), ali i na bazi etarskih ulja i biljnih ekstrakata (Grahovac i sar., 2009). Prema Grahovac i sar. (2009) mehanizam delovanja biofungicida se zasniva na jednoj od sledećih pojava: direktna kompeticija, antibioza, predatorstvo, odnosno parazitizam i indukovana otpornost biljke domaćina. Organizmi koji se već duže vreme istražuju i koriste u biološkom suzbijanju najčešće su iz rodu *Bacillus* (Burr et al., 1978) i *Streptomyces* (Tahvonen, 1982). Takođe, zbog visoke antifungalne aktivnosti etarskih ulja biljaka ona se mogu koristiti kao alternativna sredstva u zaštiti od patogena (Grahovac et al., 2012; Duduk et al., 2010), dok mali rizik od razvoja rezistentnosti patogena na etarska ulja, kao i netoksičnost za sisare, ptice i ribe, te njihova biorazgradivost potvrđuju njihov visok potencijal u zaštiti bilja (Pavela, 2014; Daferera et al., 2003).

Toplotni tretmani kao fizička mera u suzbijanju pojave patogena uskladištenih plodova jabuke mogu da budu jedna od alternativnih i efikasnih metoda borbe protiv ovih patogena imajući u vidu da temperatura značajno utiče na razvoj fitopatogenih mikroorganizama (Caffarra et al., 2012). Oni predstavljaju ekološki prihvatljivu i zdravstveno bezbednu metodu suzbijanja patogena i insekata na plodovima voća, s obzirom da je primena sintetičkih hemijskih sredstava izostavljena, te je isključena i mogućnost da se rezidue nađu u tretiranim plodovima (Petreš i sar., 2016). Prema Lurie (1998) toplotni tretmani mogu da se podele na tretmane toplom vodom, tretmane vodenom parom i tretmane toplim vazduhom. Na osnovu dužine trajanja dele se na kratkotrajne (do jednog časa) i dugotrajne (od nekoliko časova do nekoliko dana). Osim za suzbijanje patogena i štetočina u skladištu, toplotni tretmani se mogu koristiti i za usporavanje sazrevanja plodova voća, ali i da bi se sprečila pojava ozleda od niskih temperatura (Petreš i sar., 2016; Fruk, 2014; Maxin, 2012).

Etilen je biljni hormon koji pospešuje zrenje plodova. Jedinjenje 1-metilciklopropan (1-MCP) deluje kao inhibitor etilena i usporava proces sazrevanja plodova vezujući se za etilenske

receptore (Mao et al., 2007), te na taj način sprečava vezivanje etilena za receptore i smanjuje respiraciju, te, posledično, i sazrevanje plodova (Magazin et al., 2010; Akbudak et al., 2009). Takođe, prema navodima nekoliko autora, tretman plodova jabuke pre skladištenja može da uspori razvoj truleži tretiranih plodova (Li et al., 2017; Jeziorek et al., 2010; Rizzoli and Accler, 2009).

2.6.1. Primena bakterija rodova *Bacillus* i *Streptomyces* u biološkoj zaštiti plodova jabuke od *Fusarium* spp.

Vrste roda *Bacillus* jesu jedne od najčešće izučavanih vrsta, a koje su dostupne kao komercijalni biološki preparati namenjeni za primenu u poljoprivrednoj proizvodnji (Nicholson, 2002). Uz *Bacillus* spp. značajna pažnja je posvećena i vrsti *Streptomyces hygroscopicus*. Oba agensa su ispoljila značajan potencijal, ne samo u zaštiti uskladištenih plodova jabuke, već i u zaštiti drugih gajenih biljaka, što potvrđuju istraživanja mnogih autora (Pajčin et al., 2020; Anusha et al., 2019; Grahovac et al., 2019; Mitrović et al., 2017; Grahovac et al., 2017; Tadijan et al., 2016; Grahovac, 2014; Wachowska et al., 2013). *Bacillus* vrste se smatraju bezbednim za upotrebu u ekološkoj zaštiti bilja i kao takve su označene i od strane Administracije za hranu i lekove SAD (United States Food and Drug Administration) (Lastochkina et al., 2019; Grahovac, 2014). Vrste roda *Bacillus* su štapićaste, gram-pozitivne bakterije koje stvaraju endospore koje im omogućavaju da prežive različite uticaje spoljne sredine, kao što su nepovoljne temperature i pH vrednost, desikanti, UV zračenje, itd. (Lastochkina et al., 2019; Härtig and Jahn, 2012). Ove osobine koje olakšavaju formulisanje preparata, koriste se pri proizvodnji biopesticida baziranih na *Bacillus* vrstama. *Bacillus* vrste zauzimaju istu ekološku nišu kao i većina patogena, ali takođe produkuju širok spektar bioaktivnih supstanci sa antibiotskim svojstvima (Lastochkina et al., 2019; Grahovac, 2014). Postoji više vrsta roda *Bacillus* za koje je utvrđeno da mogu da se koriste u suzbijanju skladišnih patogena, i to: *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. velezensis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus* (Grahovac, 2014; Li et al., 2013; Jamalizadeh et al., 2009). U Republici Srbiji su sprovedena istraživanja o efikasnosti vrsta ovog roda u suzbijanju patogena uskladištenih plodova jabuke (Pajčin, 2019; Grahovac et al., 2017). Preparati na bazi *B. subtilis* registrovani u našoj zemlji za suzbijanje biljnih bolesti su Ekstrasol F, Bacillomix Aurum B, Erwix i Skladix, dok je za suzbijanje prouzrokovala truleži uskladištenih plodova jabuke registrovano dva preparat - Ekstrasol F i Skladix (Petrović i Sekulić, 2021).

Bakterije iz razdela Actinobacteria, gde se ubrajaju i vrste roda *Streptomyces*, su gram-pozitivne bakterije čiji metaboliti čine oko trećine svih poznatih antibiotika (van der Meij et al., 2018). U ispitivanjima koja su sprovedena u Republici Srbiji metaboliti vrste *S. hygrosopicus* su ispoljili visok potencijal za suzbijanje fitopatogenih vrsta gljiva iz rodova *Colletotrichum*, *Fusarium* i *Alternaria* (Mitrović et al., 2017; Grahovac et al., 2017; Tadijan et al., 2016; Grahovac, 2014). Mitrović et al. (2020) su dokazali da vrsta *S. hygrosopicus* ima sposobnost da asimiluje glicerol iz sredine i pretvara ga u metabolite koji imaju antifungalnu aktivnost protiv prouzrokovaca truleži plodova jabuke *Alternaria alternata* i *F. avenaceum*. Prapagdee et al. (2008) navode da upravo ova vrsta produkuje ekstracelularnu hitinazu i β -1,3-glukanazu koje su odgovorne za inhibiciju rasta kultura *Colletotrichum gloeosporioides* i *Sclerotium rolfsii*. Takođe, u istraživanjima Grahovac (2014) je utvrđeno da primena *S. hygrosopicus* ispoljava značajnu inhibiciju rasta vrsta *Colletotrichum acutatum* i *C. gloeosporioides*, prouzrokovaca gorke truleži plodova jabuke u *in vitro* i *in vivo* ogledima. Međutim, prema raspoloživim podacima, nijedan biološki preparat zasnovan na *S. hygrosopicus* nije registrovan za upotrebu u Republici Srbiji (Petrović i Sekulić, 2021).

2.6.2. Primena etarskih ulja u biološkoj zaštiti uskladištenih plodova jabuke od prouzrokovaca truleži

Etarska ulja biljaka su produkti sekundarnog metabolizma biljaka, od kojih neka ispoljavaju antimikrobno dejstvo. Ona su smeše različitih jedinjenja, od kojih najznačajnija pripadaju dvema različitim grupama terpena i terpenoida i aromatičnih jedinjenja (Werrie et al., 2021; Tripathi et al., 2009; Bakkali et al., 2008). Ona se razlikuju u sastavu i odnosu jedinjenja koja ulaze u njihov sastav, pa je tako najzastupljenije jedinjenje u etarskom ulju bosiljka (*Ocimum basilicum*) eugenol (Joshi, 2014), u etarskom ulju origana (*Origanum vulgare*) i čubra (*Satureja hortensis*) najzastupljeniji je karvakrol (Teixeira et al., 2013; Mihajilov-Krstev et al., 2009), a kod etarskog ulja muskatne žalfije (*Salvia sclarea*) linalool (Aćimović et al., 2018; Kužma et al., 2009), itd. Više autora su u svojim ispitivanjima uočili da etarska ulja biljaka poseduju antifungalna svojstva (Tarlanović et al., 2017; Grahovac et al., 2012; Duduk et al., 2010). Zbog lake biorazgradivosti i bezbednosti upotrebe za ljude i životnu sredinu (Tanović et al., 2020), kao i zbog malog rizika za razvoj rezistentnosti patogena (Daferera et al., 2003),

etarska ulja se sve više pozicioniraju kao alternativna sredstva sa visokim potencijalom u zaštiti plodova jabuke nakon berbe. Zbog visoke isparljivosti, upotreba etarskih ulja u zaštiti plodova jabuke je prikladnija u zatvorenom prostoru nego u voćnjaku (Tarlanović et al., 2017). Više istraživača je do sada radilo na ispitivanju mogućnosti primene etarskih ulja u suzbijanju prouzrokovaca truleži plodova jabuke: *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* (Banani et al., 2018; Abd-El-Latif, 2016; Lopez-Reyes et al., 2010), *F. avenaceum*, *A. alternata* (Tarlanović et al., 2017), *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* (Grahovac et al., 2012), itd. U Republici Srbiji su registrovani sledeći preparati na bazi etarskih ulja: Timorex Gold (ulje čajnog drveta) i Biox M (ulje mente). Ovde treba dodati i preparat Mevalone, koji kao aktivne supstance sadrži eugenol, geraniol i timol, ključna jedinjenja iz etarskih ulja biljaka (Petrović i Sekulić, 2021).

2.6.3. Primena tretmana toplom vodom u zaštiti uskladištenih plodova jabuke od prouzrokovaca truleži

Alternativna metoda borbe protiv prouzrokovaca truleži uskladištenih plodova jabuke mogu biti toplotni tretmani, s obzirom da temperatura značajno utiče na razvoj fitopatogenih mikroorganizama (Caffarra et al., 2012). Toplotni tretmani mogu se podeliti na tretmane toplom vodom, tretmane vodenom parom i tretmane toplim vazduhom (Lurie, 1998). Tretmani toplom vodom predstavljaju ekološki prihvatljivu i zdravstveno bezbednu metodu suzbijanja patogena (Petreš i sar., 2016), pogotovo u organskoj proizvodnji (Gasser et al., 2015; Maxin et al., 2006). Prema Maxin (2012), postoje tri načina delovanja tretmana toplom vodom: fizičko uklanjanje inokuluma ispiranjem, toplotna inaktivacija spora i aktivacija odbrambenog odgovora plodova jabuke, odnosno stresom indukovana aktivacija proteina toplotnog šoka (heat shock proteins – HSP). Do sada je efikasnost ovih tretmana ispitivana na plodovima više vrsta voća. Karabulut et al. (2010) su u svojim ispitivanjima dokazali da na odgovarajućim temperaturama toplotni tretmani vodom mogu biti veoma efikasni u suzbijanju smeđe truleži (*Monilinia fructicola*) plodova breskve, nektarine i šljive. Takođe, Spadoni et al. (2014) su dobili dobre rezultate u suzbijanju smeđe truleži na plodovima breskve. Ispitivanja na ananasu su pokazala da tretmani toplom vodom značajno smanjuje pojavu truleži na plodovima veštački inokulisanim sa *Fusarium verticillioides* (Vilaplana et al., 2019). Isto tako, Yasser et al. (2019) su ispitali uticaj ovih tretmana na sprečavanje pojave truleži plodova paradajza prouzrokovane od *A. alternata*, *B.*

cinerea i *Geotrichum candidum* i utvrdili da je pojava truleži značajno smanjena. U Danskoj je utvrđeno da tretmani toplom vodom mogu inhibirati razvoj truleži plodova jabuke u skladištu prouzrokovane od *P. expansum*, *Neonectria galligena*, *B. cinerea* i *Phacidiopycnis washingtonensis* (Maxin, 2012; Maxin et al., 2012). Trierweiler et al. (2003) su u svojim istraživanjima utvrdili da tretmani toplom vodom značajno smanjuju pojavu truleži plodova jabuke koju prouzrokuje *Gloeosporium* spp. U Italiji su takođe vršena ispitivanja tretmana toplom vodom na razvoj *B. cinerea*, *C. acutatum* i *Neofabraea vagabunda* na plodovima jabuke i dobijeni rezultati ukazuju na značajan potencijal tretmana. Takođe, u Republici Srbiji sprovedena su preliminarna istraživanja kojima je utvrđen potencijal ovog metoda u zaštiti plodova jabuke od skladišnih patogena, prvenstveno vrsta roda *Fusarium* (Petreš i sar., 2018).

2.6.4. Uticaj primene 1-MCP i dinamički kontrolisane atmosfere (DCA) na razvoj prouzrokovala truleži uskladištenih plodova jabuke

Vrste voća se prema načinu sazrevanja plodova mogu podeliti u dve grupe: klimakterične i neklimakterične vrste. Sazrevanje klimakteričnih plodova, u koje se svrstava i plod jabuke, je kontrolisano od strane biljnog hormona etilena, a samo sazrevanje odlikuje značajno povećanje intenziteta disanja (Li et al., 2017; Busatto et al., 2017). 1-metilciklopropan (1-MCP) je derivat ciklopropena koji se vezuje za receptore etilena, te na taj način sprečava njegovo delovanje i usporava proces sazrevanja plodova (Mao et al., 2007). 1-MCP se uspešno koristi za sprečavanje pojave posmeđivanja pokožice zelenih plodova (skalda) tokom čuvanja u skladištu, kao i za sprečavanje narušavanja kvaliteta i očuvanje svežine plodova nakon iskladištenja (Magazin et al., 2010; Akbudak et al., 2009). McCormick et al. (2012) navode da plodovi tretirani sa 1-MCP mogu uspešno da se čuvaju i na višim temperaturama, što rezultira u uštedi energije i zahteva manje troškove čuvanja. Više istraživača je vršilo ispitivanja uticaja 1-MCP na razvoj više prouzrokovala truleži plodova jabuke u skladištu, i to Li et al. (2017) na razvoj *P. expansum*, Tarlanović et al. (2018) na razvoj *F. avenaceum*, Cameldi et al. (2016) na pojavu *Neofabraea* spp. na plodovima jabuke. Juhnevica-Radenkova et al. (2016) su ispitali uticaj ovog jedinjenja na razvoj mikroflore na površini uskladištenih plodova jabuke, dok su Xu et al. (2017) ispitali uticaj 1-MCP na prouzrokovala antraknoze ploda manga (*C. gloeosporioides*). Dinamički kontrolisana atmosfera (DCA) je sistem skladištenja gde se koncentracija kiseonika postepeno smanjuje i dinamički optimizuje tokom skladištenja i održava iznad donje granice kiseonika (lower oxygen

limit - LOL) (Maxin, 2012; Prange et al., 2013). Donja granica kiseonika je koncentracija pri kojoj se metabolizam ćelije menja od aerobnog ka fermentativnom (Wright et al., 2012). Dinamička kontrola praćenja LOL je moguća kroz praćenje stvaranja produkata anaerobnog metabolizma (proizvodnje etanola), praćenjem respiratornog koeficijenta ili praćenje fluorescencije hlorofila (DCA-CF), koja je zasnovana na detekciji nagle promene fluorescencije na donjoj granici kiseonika, od kojih se upravo detekcija fluorescencije hlorofila najčešće koristi (Zanella et al., 2008; Wright et al., 2012; Prange et al., 2013; Weber et al., 2017).

3. ZADACI I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Zadaci ovog istraživanja bili su:

1. Prikupljanje plodova jabuke sa karakterističnim simptomima fuzariozne truleži u hladnjačama sa veoma niskim sadržajem kiseonika (Ultra Low Oxygen – ULO), hladnjačama sa dinamički kontrolisanom atmosferom (Dynamic Controlled Atmosphere – DCA), hladnjačama sa normalnom atmosferom (NA), marketima, pijacama i proizvodnim voćnjacima tokom tri uzastopne godine.
2. Izolacija *Fusarium* spp. na hranljivu podlogu i formiranje kolekcije monohifalnih izolata.
3. Provera Kohovih postulata: provera patogenosti monohifalnih *Fusarium* spp. izolata na plodovima jabuke, reizolacija patogena, provera patogenosti reizolata.
4. Utvrđivanje morfoloških i odgajivačkih karakteristika na hranljivim podlogama PDA (podloga od krompira, dekstroze i agara), CLA (podloga od lista karanfila) i CA (podloga od mrkve i agara).
5. Molekularna identifikacija i filogenetsko proučavanje – identifikacija do nivoa vrste prajmerima specifičnim za vrstu, umnožavanje *TEF-1 α* regiona primenom univerzalnih prajmera, sekvenciranje *TEF-1 α* regiona, analiza sekvenci i izrada filogenetskog stabla.
6. Procena potencijala izolata *Fusarium* spp. za sintezu mikotoksina deoksinivalenola (DON) i zearalenona (ZEA) na hranljivim podlogama i na veštački inokulisanim plodovima jabuke ELISA metodom.
7. Sekvenciranje, sklapanje i anotacija celog genoma izolata KA13 (*F. avenaceum*) i TaB10 (*F. graminearum*) i predikcija potencijala za sintezu sekundarnih metabolita bioinformatičkim alatima.
8. Ispitivanje mogućnosti suzbijanja patogena biološkim agensima *Bacillus* spp. (kompleks vrsta), *Streptomyces hygroscopicus* i *Bacillus velezensis*, kao i etarskim uljima i hidrolatima etarskih ulja u ogledima *in vitro* i *in vivo*.
9. Ispitivanje mogućnosti suzbijanja patogena tretmanima toplom vodom u *in vitro* i *in vivo* ogledima na plodovima jabuke pre skladištenja.

10. Ispitivanje uticaja primene 1-MCP (1-metilciklopropen) i dinamički kontrolisane atmosfere (DCA) u hladnjači na razvoj fuzariozne truleži plodova jabuke.

Ciljevi istraživanja bili su sledeći:

1. Utvrditi prisustvo i rasprostranjenost vrsta *F. avenaceum* i *F. graminearum* na uskladištenim plodovima jabuke u AP Vojvodini.
2. Detektovanjem razlika u morfološkim, odgajivačkim, patogenim, molekularnim, filogenetskim i toksikološkim karakteristikama vrsta *F. avenaceum* i *F. graminearum* proširiti ukupno znanje o ovim vrstama, a filogenetskom analizom doprineti boljem sagledavanju biodiverziteta populacije ove dve vrste kod nas.
3. Utvrditi da li postoji potencijal izolata *F. avenaceum* i *F. graminearum* za sintezu mikotoksina koji predstavlja rizik od kontaminacije plodova jabuke i proizvoda od jabuke ovim materijama.
4. Definisati mogućnosti suzbijanja *Fusarium* vrsta na plodovima jabuke biološkim i fizičkim merama, u cilju doprinosa ekološki održivoj proizvodnji jabuke.

4. RADNE HIPOTEZE

Pregledom aktuelne naučne literature utvrđeno je da se vrste roda *Fusarium* sve češće javljaju kao prouzrokovajući truleži uskladištenih plodova jabuke. Pored direktnih šteta koje ove gljive nanose uskladištenim plodovima u vidu truleži, kao mikotoksigene gljive sa visokim potencijalom za proizvodnju mikotoksina i raznih drugih sekundarnih metabolita, ove vrste mogu kontaminirati plodove jabuke. Plodovi jabuke se, nadalje, koriste kao značajna sirovina za proizvodnju mnogih prehrambenih proizvoda (sokovi, kaše za bebe, itd.), a kako se mikotoksini teško uklanjaju i razgrađuju, za očekivati je da će oni dospeti u krajnje proizvode. S obzirom da literatura ukazuje da pojedini mikroorganizmi, etarska ulja, kao i fizičke mere borbe mogu delovati antifungalno na prouzrokovaoce uskladištenih plodova jabuke, pretpostavlja se da ove metode suzbijanja mogu ispoljiti antifungalno dejstvo i na proučavane *Fusarium* vrste. Polazeći od saznanja iz literature, kao i ciljeva i zadataka ovog istraživanja postavljene su sledeće radne hipoteze:

- Na osnovu morfoloških, odgajivačkih i molekularnih metoda identifikacije potvrdiće se da prouzrokovajući fuzariozne truleži uskladištenih plodova jabuke pripadaju vrstama *F. avenaceum* i *F. graminearum*;
- Procenom potencijala za sintezu mikotoksina ELISA testom će se utvrditi sposobnost izolata da sintetišu mikotoksine tokom razvoja na hranljivim podlogama i plodovima jabuke;
- Sekvenciranjem, sklapanjem i anotacijom celog genoma izolata obe ispitivane vrste i upotrebom bioinformatičkih alata i softvera utvrdiće se potencijal za sintezu sekundarnih metabolita;
- Ispitivanjem nekoliko rešenja za biološko i fizičko suzbijanje prouzrokovaoča fuzariozne truleži uskladištenih plodova jabuke u *in vitro* i *in vivo* ogledima utvrdiće se njihov potencijal za sprečavanje pojave truleži i smanjenje potencijalnih gubitaka.

5. MATERIJAL I METODE

Eksperimentalna istraživanja izvedena su u Laboratoriji za biološka istraživanja i pesticide, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Departman za fitomedicinu i zaštitu životne sredine; u Laboratoriji za fitopatologiju, Institut za pesticide i zaštitu životne sredine Zemun, Beograd; u Laboratoriji za fitopatologiju i entomologiju, Institut za kukuruz „Zemun Polje“, Beograd; u ULO hladnjači kompanije “Pollino Agrar”, Jazak, u DCA hladnjači kompanije PIK „Južni Banat“, Bela Crkva i u hladnjači sa normalnom atmosferom Oglednog dobra na Rimskim Šančevima, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Departman za voćarstvo, vinogradarstvo, hortikulturu i pejzažnu arhitekturu. Genomska istraživanja su izvedena u laboratoriji Prof. Li-Jun Ma na Univerzitetu Masačusets Amherst, SAD (University of Massachusetts Amherst, College of Natural Sciences, Department of Biochemistry and Molecular Biology) u okviru istraživačkog boravka preko programa Fulbrajt Vlade SAD (Fulbright Doctoral Research Program). Etarska ulja i hidrolati korišćeni u ovom radu su pripremljeni na Institutu za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu, dok su metaboliti *S. hygroscopicus* i kultivaciona tečnost *B. velezensis* pripremljeni na Tehnološkom fakultetu, Univerzitet u Novom Sadu.

5.1. Prikupljanje uzoraka, izolacija patogena i priprema monohifalnih izolata

Plodovi jabuke sa simptomima truleži prikupljeni su u periodu od 2016. do 2018. godine na 10 lokaliteta u Autonomnoj pokrajini Vojvodini: Tavankut, Ljutovo, Hajdukovo, Bački Vinogradi, Ridica, Jazak, Mala Remeta, Kać, Titel i Novi Sad. Na ovim lokalitetima plodovi jabuke sa simptomima truleži su uzorkovani u hladnjačama sa veoma niskim sadržajem kiseonika (Ultra Low Oxygen - ULO), hladnjačama sa dinamički kontrolisanom atmosferom (Dynamic Controlled Atmosphere – DCA), hladnjačama sa normalnom atmosferom (NA), marketima, pijacama i proizvodnim voćnjacima.

Uzorci su obeleženi i upakovani pojedinačno u polietilenske kese i transportovani u laboratoriju na Departman za fitomedicinu i zaštitu životne sredine, Univerzitet u Novom Sadu,

Poljoprivredni fakultet, gde su zavedeni u dnevnik istraživanja i fotografisani. Nazivi izolata su formirani pomoću latiničnih slova i brojeva koji redom označavaju sledeće: lokalitet (T - Tavankut i sl.), objekat (u slučaju lokaliteta Tavankut, a - Agroprom, i – Imgrund, h – Horvat), naziv sorte (J – Jonagold, GS - Granny Smith, B – Braeburn i sl.) i redni broj ploda, a ukoliko je iz istog ploda izolovano više izolata, tada je to označeno superskriptom posle broja ploda (npr. TaB10²).

Iz zaraženih plodova jabuke izvršena je izolacija patogena standardnim fitopatološkim metodama na hranljivu podlogu od krompira, dekstroze i agara (eng. PDA - potato dextrose agar). Podloga je pripremljena od 200 g krompira, 20 g agara, 20 g dekstroze i 1000 ml destilovane vode, a zatim je sterilisana autoklaviranjem (20 min, pri temperature od 121 °C i pritisku od 1,5 bar). Ovako pripremljena podloga je razlivena u sterilne Petri kutije.

Plodovi jabuke su površinski dezinfikovani 70% alkoholom, zatim su sterilnim skalpelom presečeni po sredini nekroze, te su fragmenti tkiva uzeti na prelazu zdravog i obolelog tkiva obuhvatajući oba dela. Fragmenti tkiva su postavljeni na hranljivu PDA podlogu, od tri do pet isečaka, te inkubirani u termostatu u mraku pri temperaturi 25 ± 1 °C u trajanju od sedam dana. Nakon inkubacije novoformirana micelija je prenesena u Petri kutije sa sterilnom PDA podlogom u cilju dobijanja čistih kultura. Iz kolekcije čistih kultura zadržani su oni izolati za koje se vizuelnim pregledom moglo pretpostaviti da pripadaju rodu *Fusarium*, dok su ostali izolati izdvojeni iz kolekcije.

Formiranje monohifalnih izolata izvršeno je metodom opisanom od strane Leslie i Summerell (2006) za 15 izolata, odabranih iz kolekcije na osnovu razlika u morfološkim karakteristikama: TaB10, TaB10², TaB62, TaB12, LjG15/17, TAV18¹, JF1¹, Bv4/17², JGS3³, JZ13/17¹, JvZ8/18, R2G11², KA13, HG3 i HG8. Izolati su zasejani u Petri kutije na slabo hranljivu podlogu vodeni agar (WA). Podloga je pripremljena od 20 g agara i 1000 ml destilovane vode i nakon sterilizacije u autoklavu izlivena u tankom sloju u Petri kutije (Ø 90 mm). Iz prethodno razvijene čiste kulture uzet je kružni isečak prečnika 3 mm i stavljen u sredinu svake Petri kutije na podlogu. Petri kutije su zatim inkubirane u termostatu u mraku na temperaturi 25 ± 1 °C. Kako kolonija ne bi prekrila celu površinu kutije, inkubacija je bila kraća i trajala je 3 – 4 dana. Nakon inkubacije, pod mikroskopom u sterilnim uslovima je pomoću kopljaste igle isečen vrh pojedinačnih hifa i prenesen u nove Petri kutije sa sterilnom PDA podlogom na inkubaciju u termostatu pri 25 ± 1 °C kako bi se formirale uniformne kolonije.

Nakon sedam dana inkubacije ovako dobijene kulture su aseptično usitnjene i uskladištene u 1,5 ml mikrotube za dalji rad i čuvanje u frižideru pri 4 ± 1 °C.

5.2. Provera patogenosti izolata i zastupljenost vrsta roda *Fusarium*

Test provere patogenosti za svaki od 62 prikupljena izolata izvršen je ozleđivanjem i veštačkom inokulacijom plodova jabuke sorte Zlatni delišes, prema izmenjenoj metodi Vignutelli et al. (2002), opisanoj od strane Grahovac (2014). Plodovi su oprani vodom iz česme, površinski dezinfikovani 70% etanolom, isprani destilovanom vodom, te ostavljeni da se osuše. Izolati su gajeni sedam dana na PDA podlozi pri 25 ± 1 °C. Sterilnim bušačem na plodovima su napravljena po dva ujednačena udubljenja promera 4 mm i dubine 3 mm. Za svaki izolat su pripremljena po tri ploda. Plodovi jabuke su inokulisani okruglim fragmentima micelije sa podlogom prečnika 3 mm tako da micelija naleže na ozleđeno tkivo jabuke. Negativna kontrola je inokulisana isečcima sterilne PDA podloge. Inokulisani plodovi su inkubirani u plastičnim kutijama, prethodno dezinfikovanim alkoholom, u laboratoriji na sobnoj temperaturi i pri prirodnim uslovima smene dana i noći tokom 16 dana uz održavanje visoke vlažnosti unutar kutija. Nakon perioda inkubacije u slučaju 15 prethodno definisanih reprezentativnih izolata izmereni su prečnik nekroze i dubina nekroze presecanjem plodova po središnjem delu mesta inokulacije. Nakon merenja, izmerene vrednosti su umanjene za prečnik/dubinu oštećenja formiranih na plodu pre inokulacije (4 mm/3 mm, respektivno). Zatim je izvršena reizolacija patogena iz plodova na isti način kao inicijalna izolacija patogena, kao i provera patogenosti reizolata. Zastupljenost *Fusarium* spp. utvrđena je poređenjem broja uzorkovanih plodova sa simptomima truleži, sa brojem dobijenih patogenih izolata *Fusarium* spp.

5.3. Morfološke i odgajivačke odlike izolata *Fusarium* spp.

Zbog velike varijabilnosti u morfološkim svojstvima, identifikacija izolata klasičnim metodama moguća je proučavanjem makroskopskih i mikroskopskih svojstava izolata (Lević, 2008). Makroskopska (intenzitet rasta, izgled i boja kolonije, pigment u podlozi) i mikroskopska (oblik i veličina makrokonidija, način obrazovanja mikrokonidija, obrazovanje hlamidospora, tip fialida) svojstva su ispitana gajenjem izolata iz kolekcije na tri hranljive podloge: PDA, CA

(carrot agar; hranljiva podloga pripremljena od 400 g mrkve, 20 g agara i 1000 ml destilovane vode) i CLA (carnation leaf agar; hranljiva podloga pripremljena od 20 g agara, 1000 ml destilovane vode i sterilnih fragmenata lista karanfila).

5.3.1. Morfološke odlike vegetativnih struktura

Kružni fragmenti micelije prečnika 3 mm zasejani su na PDA, CA i CLA podlogu, te su makroskopska svojstva proučavana na kulturama gajenim sedam dana pri temperaturi 25 ± 1 °C u mraku. Na osnovu izgleda oboda micelije, izgleda i boje micelije i pigmentacije podloge svi prikupljeni izolati (62 izolata) su razvrstani u morfološke grupe. Ogled je postavljen u tri ponavljanja, a pojedinačna Petri kutija predstavljala je jedno ponavljanje.

5.3.2. Morfološke odlike reproduktivnih struktura

Mikroskopska morfološka svojstava reproduktivnih struktura ispitana su pregledom kultura 15 reprezentativnih izolata predstavnika sve četiri morfološke grupe, starosti sedam dana i gajenih na podlogama koje stimulišu sporulaciju i obrazovanje konidija (CA i CLA) u mraku, na temperaturi 25 ± 1 °C, direktnim pregledom pod svetlosnim mikroskopom Krüss MBL 2100 (Germany) *in situ* pri uvećanju od 4x i 10x, kao i pregledom nativnih preparata pripremljenih od kultura svih izolata gajenih na svim ispitivanim podlogama, posmatranjem pod uvećanjem od 4x i 10x. Merenje dimenzija konidija je izvršeno pomoću svetlosnog mikroskopa Carl Zeiss Axiolab A1 (Germany) u Laboratoriji za fitopatologiju i entomologiju Instituta za kukuruz „Zemun Polje“, Beograd. Ogled je postavljen u tri ponavljanja, a pojedinačna Petri kutija predstavljala je jedno ponavljanje.

5.3.3. Odgajivačke odlike izolata *Fusarium* spp.

5.3.3.1. Uticaj različitih hranljivih podloga na rast kolonija izolata *Fusarium* spp.

Uticaj različitih hranljivih podloga na rast kolonija izolata *Fusarium* spp. ispitan je merenjem prečnika kolonija kultura 15 reprezentativnih izolata gajenih na tri ispitivane hranljive podloge (PDA, CA i CLA) u dva pravca pod uglom od 90 stepeni nakon sedam dana inkubacije

u termostatu na 25 ± 1 °C. Ogled je postavljen u tri ponavljanja, a pojedinačna Petri kutija predstavljala je jedno ponavljanje.

5.3.3.2. Uticaj temperature na rast kolonija izolata *Fusarium* spp.

Uticaj temperature na rast kolonija *Fusarium* spp. ispitan je na temperaturama od 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 i 35 °C. Zbog složenosti ogleada, odabrano je 8 od 15 reprezentativnih izolata, iz svake morfološke grupe. Fragmenti micelije prečnika 3 mm i starosti sedam dana zasejani su na PDA, inkubirani sedam dana u termostatu na određenoj temperaturi, a nakon ovog perioda izvršeno je merenje prečnika kolonije u dva pravca pod uglom od 90 stepeni. Ogled je postavljen u tri ponavljanja, gde je pojedinačna Petri kutija predstavljala jedno ponavljanje.

5.3.3.3. Uticaj kiselosti podloge na rast kolonija izolata *Fusarium* spp.

Uticaj kiselosti podloge na rast kolonija *Fusarium* spp. ispitan je pri pH vrednostima podloge od 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 i 10. Fragmenti micelije 15 reprezentativnih izolata prečnika 3 mm i starosti sedam dana zasejani su na PDA određene kiselosti. Kiselost podloge je podešena dodavanjem hlorovodonične kiseline (HCl), odnosno kalijum hidroksida (KOH). Nakon sedam dana inkubacije u termostatu na 25 ± 1 °C izvršeno je merenje prečnika kolonije u dva pravca pod uglom od 90 stepeni. Ogled je postavljen u tri ponavljanja. Pojedinačna Petri kutija, zasejana sa jednim fragmentom predstavljala je jedno ponavljanje.

5.3.4. Obrazovanje polnog stadijuma

Razvoj teleomornog stadijuma je praćen na hranljivoj podlozi od mrkve (CA) prema delimično korigovanoj metodi Cavinder et al. (2012). Isečci prečnika 3 mm su zasejani u Petri kutije, koje su, zatim, inkubirane na sobnoj temperaturi pod fluorescentnim svetlom dok micelija nije ispunila celu Petri kutiju. Micelija je zatim pažljivo uklonjena sterilnom plastičnom bakteriološkom petljom, te je u Petri kutiju unet 1 ml 2,5% vodenog rastvora Tween 60 i ravnomerno raspoređen po površini podloge pomoću špatule po Drigalskom. Petri kutije su ponovo vraćene pod svetlo. Parafilm nije stavljen na kutije. U slučajevima gde se micelija ponovo pojavila, postupak uklanjanja micelije i dodavanja rastvora Tween 60 je ponovljen. Razvoj peritecija je praćen tokom narednih sedam dana. Nakon toga, razvijene peritecije i

askospore su posmatrane pod mikroskopom. Ogled je postavljen u tri ponavljanja, a pojedinačna Petri kutija predstavljala je jedno ponavljanje.

5.4. Molekularna identifikacija i karakterizacija izolata *Fusarium* spp.

Svi prikupljeni izolati (ukupno 62) su molekularno identifikovani pomoću metode lančane reakcije polimeraze (Polymerase chain reaction - PCR). Identifikacija izolata izvršena je pomoću prajmera specifičnih za vrstu, dok je pomoću univerzalnih prajmera izvršena amplifikacija regiona *TEF-1a*, za 19 odabranih morfološki različitih izolata. Na osnovu *TEF-1a* sekvenci je izvršena filogenetska analiza i izrađeno je filogenetsko stablo, kao i identifikacija vrsta koje nisu identifikovane kao *F. avenaceum* upotrebom prajmera specifičnih za vrstu.

5.4.1. Ekstrakcija DNK i provera uspešnosti ekstrakcije

Ekstrakcija genomske DNK iz kultura starosti sedam dana je izvršena pomoću DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany) prema uputstvu proizvođača. Uspešnost ekstrakcije DNK je proverena u PCR reakciji pomoću para univerzalnih prajmera ITS1/ITS4 (Tabela 1).

Tabela 1. Univerzalni prajmeri ITS1/ITS4 korišćeni u PCR reakciji

Vrsta prajmera	Naziv prajmera	Sekvenca	Literaturni izvor
Forward prajmer	ITS1	5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G - 3'	White et al., 1990
Reverse prajmer	ITS4	5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC - 3'	

Reakciona smeša za PCR reakciju se sastojala od 1 µl DNK ekstrakta, 12,5 µl Paq5000 Hotstart PCR Master Mix (Agilent Technologies, Inc., USA), 1 µl svakog prajmera i 9,5 µl DNA-free vode. Konačna zapremina reakcione smeše je iznosila 25 µl. Kao negativna kontrola korišćena je reakciona PCR smeša bez dodate DNK.

Amplifikacija PCR produkata izvedena je u PCR reakciji pomoću Agilent SureCycler 8800 (USA) aparata, sa sledećim parametrima:

- inicijalna denaturacija: 1 min 30 s na 94 °C,
- 29 ciklusa

- denaturacija: 30 s na 94 °C
- hibridizacija: 30 s na 55 °C
- elongacija: 30 s na 72°C,
- finalna elongacija: 9 min 30 s na 72 °C.

Produkti PCR reakcije (5 µl) su pomešani sa bojom (2 µl DNA Gel Loading Dye (6X) - Thermo Fisher Scientific), a razdvajanje produkata je izvršeno pomoću horizontalne elektroforeze u 1,5% agaroznom gelu (sa 1,5 µl rastvora etidijum bromida koncentracije 2,5 mg/ml) u 1x TAE puferu, pri konstantnom naponu od 100 V u trajanju od 60 minuta. Produkti razdvojeni na gelu vizuelizovani su na UV transiluminatoru DP-CF-011.C (Vilber Lourmat, France). Na osnovu pozicije u odnosu na DNK lestvicu (GeneRuler 100 bp DNA Ladder - Thermo Scientific) određena je veličina produkata. Očekivana veličina PCR produkata za ITS1/ITS4 par prajmera iznosila je oko 600 bp.

5.4.2. Identifikacija prajmerima specifičnim za vrstu

Za PCR identifikaciju pomoću prajmera specifičnih za vrstu *F. avenaceum* korišćen je par prajmera FA-ITSF/FA-ITSR (Tabela 2).

Tabela 2. Prajmeri specifični za vrstu *Fusarium avenaceum* korišćeni u PCR reakciji za identifikaciju

Vrsta prajmera	Naziv prajmera	Sekvenca	Literaturni izvor
Forward prajmer	FA-ITSF	5'- CCA GAG GAC CCA AAC TCT AA - 3'	Schilling et al., 1996
Reverse prajmer	FA-ITSR	5'- ACC GCA GAA GCA GAG CCA AT - 3'	

PCR reakcija umnožavanja je izvršena prema modifikovanoj metodi Schilling et al. (1996). Reakciona smeša za PCR reakciju je pripremljena od 1 µl DNA ekstrakta, 12,5 µl Paq5000 Hotstart PCR Master Mix (Agilent Technologies, Inc., USA), 1 µl svakog prajmera (25 pmol/µl) i 9,5 µl DNA-free vode, konačne zapremine 25 µl. Kao negativna kontrola korišćena je reakciona PCR smeša bez dodavanja DNK.

Amplifikacija PCR produkata izvedena je u PCR reakciji pomoću Agilent SureCycler 8800 (USA) aparata, sa sledećim parametrima:

- inicijalna denaturacija: 2 min na 94 °C,
- 30 ciklusa
 - denaturacija: 1 min na 94 °C
 - hibridizacija: 1 min na 59 °C
 - elongacija: 2 min na 72°C,
- finalna elongacija: 5 min na 72 °C.

Produkti PCR reakcije (5 µl) su pomešani sa bojom (2 µl DNA Gel Loading Dye (6X) - Thermo Fisher Scientific), a razdvajanje je urađeno pomoću horizontalne elektroforeze u 1,5% agaroznom gelu (sa 1,5 µl rastvora etidijum bromida koncentracije 2,5 mg/ml) u 1x TAE puferu, pri konstantnom naponu od 75 V u trajanju od 45 minuta. Produkti razdvojeni na gelu vizuelizovani su na UV transiluminatoru DP-CF-011.C (Vilber Lourmat, France). Na osnovu pozicije u odnosu na DNK lesticu (GeneRuler 100 bp DNA Ladder - Thermo Scientific) određena je veličina produkata. Očekivana veličina PCR produkata za FA-ITSF/FA-ITSR par prajmera bila je 272 bp.

5.4.3. Amplifikacija sekvence gena *TEF-1α*

Za izradu filogenetskog stabla korišćene su sekvence gena *TEF-1α*. Ovaj gen je esencijalan u procesu translacije proteina, a zbog visoke konzerviranosti veoma je informativan do nivoa vrste kod *Fusarium* spp. i koristi se za proučavanje filogenije ovih vrsta (Geiser et al., 2004). Za umnožavanje ciljnog regiona korišćen je par prajmera EF1/EF2 (Tabela 3), opisan od strane O'Donnell et al. (1998).

Tabela 3. Prajmeri EF1/EF2 korišćeni u PCR reakciji za amplifikaciju sekvence gena *TEF-1α*

Vrsta prajmera	Naziv prajmera	Sekvenca	Literaturni izvor
Forward prajmer	EF1	5' - ATG GGT AAG GAG GAC AAG AC - 3'	O'Donnell et al., 1998
Reverse prajmer	EF2	5' - GGA AGT ACC AGT GAT CAT GTT - 3'	

Za PCR reakciju pripremljena je reakciona smeša od 1 µl DNK ekstrakta, 12,5 µl Paq5000 Hotstart PCR Master Mix (Agilent Technologies, Inc., USA), 1 µl svakog prajmera (10

pmol/μl) i 9,5 μl DNA-free vode, konačne zapremine 25 μl. Kao negativna kontrola korišćena je reakciona PCR smeša bez dodate DNK, a amplifikacija PCR produkata izvedena je u PCR reakciji takođe u aparatu Agilent SureCycler 8800 (USA) pri sledećim uslovima reakcije:

- inicijalna denaturacija: 2 min na 94 °C,
- 35 ciklusa
 - denaturacija: 1 min na 94 °C
 - hibridizacija: 1 min na 53 °C
 - elongacija: 2 min na 72°C,
- finalna elongacija: 10 min na 72 °C.

Produkti dobijeni PCR reakcijom (5 μl) su pomešani sa bojom (2 μl DNA Gel Loading Dye (6X) - Thermo Fisher Scientific). Razdvajanje je urađeno pomoću horizontalne elektroforeze u 1,5% agaroznom gelu (sa 1,5 μl rastvora etidijum bromida koncentracije 2,5 mg/ml) u 1x TAE puferu, pri konstantnom naponu od 100 V u trajanju od 60 minuta.

Produkti razdvojeni na gelu vizuelizovani su na UV transiluminatoru DP-CF-011.C (Vilber Lourmat, France). Na osnovu pozicije u odnosu na DNK lesticu (GeneRuler 100 bp DNA Ladder - Thermo Scientific) određena je veličina produkata. Očekivana veličina PCR produkata za par prajmera EF1/EF2 očekivana veličina PCR produkata iznosila je oko 700 bp.

5.4.4. Filogenetska analiza

PCR produkti amplifikovani univerzalnim prajmerima EF1/EF2 su uslužno sekvencirani u kompaniji Macrogen Inc. (<http://dna.macrogen.com>, Korea), na ABI 3730XL Automatic Sequencer, u oba smera. Sekvence su zatim obrađene u programu FinchTV version 1.4.0., nakon čega su dobijene konsenzus nukleotidne sekvence koje su korišćene za dalje analize. Pomoću National Center for Biotechnology Information (NCBI) i programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) urađeno je višestruko poravnavanje sekvenci sa sekvencama iz GenBank baze i izračunata je genetička sličnost. Za izračunavanje genetičke udaljenosti i određivanje filogenetskih odnosa konstruisano je filogenetsko stablo pomoću programskog paketa MEGA 6.0 (Tamura et al., 2011) korišćenjem Maximum Likelihood metode i bootstrap analize u 1000 ponavljanja. Za ove analize korišćene su sekvence 16 izolata (Tabela 4), od kojih

15 identifikovanih kao *F. avenaceum* i jedan identifikovan kao *F. graminearum*, dok je iz GenBank preuzeta sekvenca *C. gloeosporioides* (GU994503.1) koja je korišćena kao najudaljenija vrsta (outgroup).

Tabela 4. Izolati čije su sekvence korišćene za filogenetsku analizu

Vrsta	Izolat
<i>Fusarium avenaceum</i>	HG8
<i>Fusarium avenaceum</i>	JGS3
<i>Fusarium avenaceum</i>	JGS3 ²
<i>Fusarium avenaceum</i>	JGS3 ³
<i>Fusarium avenaceum</i>	JGS3 ⁴
<i>Fusarium avenaceum</i>	KA13
<i>Fusarium avenaceum</i>	HG3
<i>Fusarium avenaceum</i>	TaB6 ²
<i>Fusarium avenaceum</i>	ThJ4 ¹
<i>Fusarium avenaceum</i>	BV/4/17 ¹
<i>Fusarium avenaceum</i>	JF1 ¹
<i>Fusarium avenaceum</i>	JZ/13/17
<i>Fusarium avenaceum</i>	LjG/15/17
<i>Fusarium avenaceum</i>	R2G11 ²
<i>Fusarium avenaceum</i>	TAV18 ¹
<i>Fusarium graminearum</i>	TaB10 ²

5.5. Potencijal za sintezu mikotoksina izolata *Fusarium* spp.

Potencijal za sintezu mikotoksina odabranih izolata ispitan je na hranljivoj podlozi od jabuke (eng. apple agar - AA) (TaB10, TaB10², TaB62, TaB12, LjG15/17, TAV18¹, JF1¹, Bv4/17², JGS3³, JZ13/17¹, JvZ8/18, R2G11², KA13, HG8 i HG3) i na veštački inokulisanim plodovima jabuke sorte Zlatni delišes (TaB10, TaB10², TaB6², TaB12, JGS3², JGS3³, TvJ3, ThJ4¹, KA12, KA13, HG8 i HG3). Izolati su uzgajani sedam dana na PDA na 25 ± 1 °C, a zatim su kružni isecci micelije sa podlogom prečnika 3 mm korišćeni za inokulaciju podloge od jabuke (apple agar – AA) i plodova jabuke.

Za pripremu podloge od jabuke korišćeno je 300 g homogenizovanih svežih plodova sorte Zlatni delišes, 1 ml rastvora metala (10 g/l ZnSO₄•7H₂O i 5 g/l CuSO₄•5H₂O), 30 g agara i 1000 ml destilovane vode, prema Sørensen et al. (2009). Nakon zasejavanja izolati su 14 dana

gajeni na podlozi pri temperaturi 23 ± 1 °C u tami. Za ekstrakciju je uzeto po devet isečaka iz centra kolonije sa AA podloge za svaki izolat koji su stavljeni u 70% rastvor metanola u staklene bočice sa poklopcem. Bočice su, zatim, stavljene na mešač (šejker) u trajanju od 45 minuta, a nakon toga smeša je profiltrirana kroz Whatman filter hartiju broj 1, a filtrat prikupljen u čiste staklene bočice sa poklopcem.

Plodovi korišćeni za ispitivanje potencijala za sintezu mikotoksina na plodovima jabuke su oprani vodom, osušeni, površinski sterilisani, a potom inokulisani isečcima micelije. Inokulisani plodovi su inkubirani u plastičnim kutijama u kojima je održavana visoka vlažnost na sobnoj temperaturi tokom 14 dana. Po završetku inkubacionog perioda razdvojen je zdrav od trulog dela ploda, koji su zatim zasebno sušeni u sušnici na temperaturi od 80 °C tokom 24 sata do vlažnosti uzorka od 5%, nakon čega su uzorci samleveni.

Ekstrakcija mikotoksina iz samlevenih uzoraka urađena je prema izmenjenoj metodi Obradović (2017). Po 5 g svakog uzorka je pomešano sa 25 ml 70% rastvora metanola, a zatim je smeša homogenizovana u mikseru Osterizer blender (Oster Manufacturing, USA) pri 1300 rpm tokom 3 minuta. Ovako pripremljena homogenizovana smeša filtrirana je kroz Whatman filter hartiju broj 1, a filtrat je prikupljen u staklene bočice sa poklopcem.

Kvalitativna i kvantitativna analiza mikotoksina je urađena pomoću ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) testa. ELISA testovi su brzi imunohemijski testovi koji se koriste u detekciju supstanci sa antigenim osobinama. Analiza je izvedena prema uputstvima proizvođača ELISA testa (Celer[®] ZEA i Celer[®] DON v3, Tecna Srl Italija). U svaki bunar je uneto po 100 µl enzimskog konjugata. Nakon toga dodato je po 50 µl standarda, odnosno uzorka promešanih uz pomoć višekanalne mikropipete. Neposredno nakon mešanja, 100 µl smeše je prebačeno u odgovarajući bunar obložen antitelima. Nakon inkubacije od 10 minuta na sobnoj temperaturi bunari su isprani puferom za ispiranje, a potom su prosušeni na papirnoj vati. U prosušene bunare dodato je po 100 µl rastvora za razvijanje i nakon inkubacije na sobnoj temperaturi od 10 minuta u svaki bunar je dodato po 50 µl reagensa za zaustavljanje reakcije, koji menja boju rastvora iz plave u žutu. Koncentracija mikotoksina je izmerena na 450 nm pomoću ELISA čitača BioTek EL x 800 (USA).

5.6. Procena potencijala za sintezu sekundarnih metabolita izolata

Fusarium spp.

Vrste roda *Fusarium* imaju sposobnost da proizvode širok spektar sekundarnih metabolita, među njima i mikotoksine, od kojih neki mogu biti veoma štetni ukoliko dospeju u lanac ishrane. Kako bi se izvršila procena potencijala za sintezu sekundarnih metabolita, neophodno je izvršiti sekvenciranje DNK molekula odabranih izolata, sklapanje i anotaciju celog genoma. Ovo istraživanje je urađeno pomoću bioinformatičkih programa i alata u Sjedinjenim Američkim Državama na Univerzitetu Masačusets (University of Massachusetts Amherst) u okviru istraživačkog boravka preko programa Fulbrajt Vlade SAD (Fulbright Doctoral Research Program).

5.6.1. Sekvenciranje, sklapanje i anotacija celog genoma

Sekvenciranje je izvršeno koristeći Illumina MiSeq Sequencing System u 150 ciklusa sa pokrivenošću 100x za *F. avenaceum* (izolat KA13) i 113x za *F. graminearum* (izolat TaB10). Kvalitet sekvenciranja je proveren pomoću softvera FastQC verzija 0.11.5 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Program Trimmomatic 0.32 (Bolger et al., 2014) korišćen je za trimovanje očitavanja i uklanjanje adaptera koji su korišćeni prilikom sekvenciranja sa sledećim parametrima: ILLUMINACLIP: TruSeq3-PE-2.fa:2:30:10 TRAILING:10 MINLEN:36. Za sklapanje genoma primenjen je prilagođeni protokol opisan od strane Ayhan et al. (2018). Program ABySS 1.5.2 (Simpson et al., 2009) je korišćen za inicijalno sklapanje genoma, zatim je mapiranje genoma urađeno pomoću programa BWA 0.7.12 (Li and Durbin, 2009), dok su za čišćenje i poliranje sklopljenog genoma korišćeni SAMtools 1.3 (Li et al., 2009) i Picard 2.0.1 (<http://broadinstitute.github.io/picard/>). Za identifikaciju veza između skafolda u inicijalnom genomu korišćen je program GRIDSS 1.4.1. (Cameron et al., 2017). Ovaj program se koristi za detekciju strukturnih varijanti (structural variants - SV), koje obuhvataju različite tipove alteracija genoma, kao što su delecije, duplikacije, inverzije, translokacije i insercije. Posebno pripremljena skripta sa instrukcijama dostupne na github.com/d-ayhan/tools/scaffolding.m je korišćena za skafolding (proces spajanja sekvenci bez kontinuiteta u jedinstveni skafold). Greške uočene prilikom sklapanja genoma su popravljene manuelno

pomoću programa R Studio (<https://rstudio.com/>). Softver MUMmer 3.23 (Kurtz et al., 2004) je korišćen za poravnavanje genoma sa referentnim genomima (*F. avenaceum* FaLH27, GenBank broj: GCA_000769295.1 i *F. graminearum* PH-1, GenBank broj: GCA_000240135.3) uz korišćenje standardnih parametara i dužinom poklapanja od 50 bp. Konačna verzija genoma je dobijena nakon ponovnog mapiranja i poliranja genoma. Mitohondrijalni skafold je uklonjen iz oba genoma. Zatim su pomoću programa RepeatScout 1.0.5 (Price et al., 2005) otkriveni repetitivni elementi, dok je RepeatMasker 4.0.5 (Tarailo-Graovac and Chen, 2009) korišćen za skrining i maskiranje ponavljajućih sekvenci. Output programa RepeatScout se koristi kao input za program RepeatMasker, kako bi se ponavljajuće sekvence u novosklopljenom genomu maskirale (oznake nukleotida se zamenjuju sa N). Nakon procesa maskiranja, pomoću programa AUGUSTUS 3.3.2 (Stanke et al., 2004) izvršena je predikcija gena u oba genoma.

5.6.2. Predikcija potencijala za sintezu sekundarnih metabolita

Bioinformatičkim metodama i softverima je, na osnovu informacija koje se mogu dobiti iz genoma, moguće predvideti genetički potencijal gljiva za sintezu sekundarnih metabolita. U ovom istraživanju su za otkrivanje klastera gena odgovornih za sintezu sekundarnih metabolita u genomima *F. avenaceum* i *F. graminearum*, korišćena dva softvera, SMURF (Secondary Metabolite Unknown Regions Finder) i antiSMASH (antibiotics and Secondary Metabolite Analysis SHell). Predikcija klastera gena za sintezu sekundarnih metabolita se zasniva na identifikaciji gena koji kodira ključni enzim u biosintezi, tzv. backbone geni. Ključni enzim je kasnije podvrgnut modifikacijama od strane enzima i drugih produkata koji su kodirani preostalim genima iz klastera (Theobald et al., 2018). Softver SMURF može da detektuje gene koji kodiraju sledeće tipove ključnih enzima: poliketid sintaze (PKS), neribozomalne peptid sintaze (NRPS), hibride NRPS-PKS i dimetilalil triptofan sintaze (DMATS) (Khaldi et al., 2010). Softverom antiSMASH može da se uradi predikcija gena više tipova ključnih enzima, pa tako, pored gore nabrojanih, mogu da se identifikuju indoli, terpeni i drugi (Blin et al., 2019; Medema et al., 2011).

5.7. Biološke i fizičke mere zaštite plodova jabuke od *Fusarium* spp.

Nekoliko potencijalnih alata za biološko i fizičko suzbijanje prouzrokača fuzariozne truleži uskladištenih plodova jabuke je ispitano u *in vitro* i *in vivo* ogledima. Kao biološka rešenja sa visokim potencijalom ispitani su: etarska ulja i hidrolati etarskih ulja različitih biljaka, kao i biološki agensi *Bacillus* spp. (kompleks vrsta), *S. hygrosopicus* i *B. velezensis*. Od fizičkih mera ispitani su tretmani plodova jabuke toplom vodom i uticaj 1-metilciklopropen (1-MCP) na razvoj fuzariozne truleži.

5.7.1. Proizvodnja etarskih ulja, hidrolata i bioloških agenasa korišćenih u ogledima

Etarska ulja tri vrste biljaka (*Ocimum basilicum* – bosiljak; *Salvia sclarea* – muskatna žalfija; *Satureja hortensis* – čubar) koja su korišćena u ogledima *in vitro* dobijena su ekstrakcijom u procesu destilacije vodenom parom, dok su hidrolati ovih etarskih ulja dobijeni kao sporedni proizvodi u procesu ekstrakcije etarskih ulja. Etarsko ulje divljeg origana (*Origanum vulgare*) korišćeno u *in vitro* i *in vivo* ogledu je komercijalno dostupno i namenjeno za humanu upotrebu.

U ogledima sa biološkim agensima korišćeni su kompleks vrsta roda *Bacillus*, koji je komercijalno dostupan kao mikrobiološko đubrivo, dok su metaboliti *S. hygrosopicus* i kultivaciona tečnost *B. velezensis* namenski pripremljeni za oglede. Sekundarni metaboliti i kultivaciona tečnost dobijeni su trodnevnom kultivacijom *S. hygrosopicus*, odnosno *B. velezensis* u tečnoj podlozi čiji je sadržaj dat u Tabeli 5.

Tabela 5. Sastav hranljive podloge za kultivaciju *Streptomyces hygrosopicus* i *Bacillus velezensis*

Sastojci	Količina (g/l)
Glukoza	15
Sojina saćma	10
CaCO ₃	3
NaCl	3
MgSO ₄	0,5
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,5
K ₂ HPO ₄	1

Kiselost podloge je prilagođena na pH $7,2 \pm 0,1$. U erlenmajer posudu zapremine 100 ml dodato je 30 ml tečne podloge za kultivaciju (Tabela 5), koja je inokulisana sa 10% (v/v) polaznom kulturom *S. hygroscopicus*, odnosno *B. velezensis* starom 48 sata. Inkubacija je trajala 72 sata na 26 ± 1 °C pri 150 o/min u uslovima spontane aeracije. Nakon inkubacije, kultura je centrifugirana 10 minuta pri 10.000 g, a dobijeni supernatant sa sekundarnim metabolitima *S. hygroscopicus* korišćen za potrebe ispitivanja, dok je kultivaciona tečnost sa ćelijama *B. velezensis* korišćena za ogled nakon inkubacije od 72 sata.

5.7.2. Izolati *Fusarium* spp. korišćeni u *in vitro* i *in vivo* ogledima

U ispitivanjima uticaja bioloških i fizičkih mera na razvoj fuzariozne truleži na uskladištenim plodovima jabuke korišćeni su izolati koji su izabrani kao predstavnici morfoloških grupa. Izolati su gajeni sedam dana na PDA podlozi pri 25 ± 1 °C u mraku. Korišćeni su sledeći izolati:

- Uticaj etarskih ulja i hidrolata etarskih ulja različitih biljaka *in vitro* - KA13 (*F. avenaceum*) i TaB10 (*F. graminearum*);
- Uticaj etarskog ulje divljeg origana (*O. vulgare*) na fuzarioznu trulež ploda jabuke pri različitim uslovima skladištenja - KA12 i KA13 (*F. avenaceum*);
- Uticaj bioloških agenasa *Bacillus* spp. i *S. hygroscopicus* na *Fusarium* spp. *in vitro* - KA12, KA13 i BVA14¹ (*F. avenaceum*);
- Uticaj bioloških agenasa *Bacillus* spp. i *S. hygroscopicus* na *Fusarium* spp. *in vivo* - JGS3³ (*F. avenaceum*);
- Uticaj biološkog agensa *B. velezensis* na *Fusarium* spp. *in vitro* - KA12, HG3 i JF1¹ (*F. avenaceum*) i TaB10 (*F. graminearum*);
- Uticaj biološkog agensa *B. velezensis* na *Fusarium* spp. *in vivo* - KA12 (*F. avenaceum*);
- Zaštita plodova jabuke od prouzrokovala truleži tretmanima toplom vodom *in vitro* i *in vivo* - KA12 (*F. avenaceum*) i TaB10² (*F. graminearum*);
- Uticaj primene 1-MCP i dinamički kontrolisane atmosfere (DCA) u skladištu na razvoj fuzariozne truleži plodova jabuke - KA12 (*F. avenaceum*).

5.7.3. Uticaj etarskih ulja i hidrolata etarskih ulja na fuzarioznu trulež ploda jabuke

5.7.3.1. Uticaj etarskih ulja i hidrolata etarskih ulja različitih biljaka na *Fusarium* spp. *in vitro*

U ovom ogledu ispitan je uticaj četiri etarska ulja i tri hidrolata etarskih ulja različitih biljaka na izolate KA13 (*F. avenaceum*) i TaB10 (*F. graminearum*). Etarska ulja, hidrolati etarskih ulja i ispitivane koncentracije dati su u Tabeli 6.

Tabela 6. Etarska ulja, hidrolati etarskih ulja i ispitane koncentracije

Tretman		Koncentracija
Etarsko ulje	<i>Ocimum basilicum</i> (bosiljak)	0,16 µl/ml
	<i>Salvia sclarea</i> (muskatna žalfija)	vazduha
	<i>Satureja hortensis</i> (čubar)	
	<i>Origanum vulgare</i> (divlji origano)	
Hidrolat etarskog ulja	<i>Ocimum basilicum</i> (bosiljak)	100 µl/ml
	<i>Salvia sclarea</i> (muskatna žalfija)	podloge
	<i>Satureja hortensis</i> (čubar)	

Uticaj etarskih ulja je ispitan na sledeći način: fragmenti prečnika 3 mm micelije izolata sedam dana stare kulture gljiva zasejani su u Petri kutije sa PDA podlogom, tako da micelija naleže na podlogu. U svim varijantama pripremljeno je po tri Petri kutije svakog izolata, gde je pojedinačna Petri kutija predstavljala je jedno ponavljanje. Etarsko ulje je naneto na unutrašnju stranu poklopca Petri kutije u količini kojom se obezbeđuje koncentracija ulja u Petri kutiji 0,16 µl/ml vazduha. Odmah po nanošenju etarskog ulja, kutije su zatvorene parafilmom i postavljene u obrnuti položaj. Ispitivanje uticaja hidrolata etarskih ulja je izvršeno inkorporacijom hidrolata u hranljivu podlogu tako što je u laboratorijsku čašu sa magnetom dodata prohlađena PDA podloga, a zatim uneta odgovarajuća količina hidrolata do koncentracije 100 µl/ml podloge, te je smeša homogenizovana na magnetnoj mešalici. U kontrolnoj varijanti su zasejani izolati bez primene etarskih ulja/hidrolata. Petri kutije su inkubirane u termostatu u mraku na temperaturi 25 ± 1 °C u trajanju od sedam dana. Ocena je urađena na kraju sedmodnevnog inkubacionog perioda merenjem prečnika razvijene micelije u dva pravca pod uglom od 90 stepeni. Posle očitavanja, isecci micelije izolata iz Petri kutija u kojima nije došlo do rasta izolata su ponovo

presejani na PDA podlogu, bez aplikacije etarskog ulja, kao i novi isečci sa periferije kultura iz kontrolne varijante. Presejavanje se vršilo kako bi se utvrdilo da li je došlo do letalnog efekta, odnosno da li su ulja delovala fungistatično (ukoliko dođe do porasta nakon presejavanja) ili fungicidno (ukoliko porast izostane i nakon presejavanja). Očitavanje je izvršeno tri dana nakon ponovnog presejavanja.

5.7.3.2. Uticaj etarskog ulja divljeg origana (*Origanum vulgare*) na fuzarioznu trulež ploda jabuke pri različitim uslovima skladištenja

Inhibitorno delovanje etarskog ulja divljeg origana na razvoj fuzariozne truleži ploda jabuke prouzrokovane izolatima KA12 i KA13 (*F. avenaceum*) ispitano je tako što su Petri kutije sa etarskim uljima postavljene u dezinfikovane, zatvorene, plastične kutije sa plodovima jabuke, tako da se u kutiji postigne koncentracija ulja $0,16 \mu\text{l}/\text{cm}^3$. Plodovi jabuke su prethodno površinski sterilisani, na njima su napravljeni otvori prečnika 4 mm i dubine 3 mm, a zatim su inokulisani isečcima sedam dana stare micelije prečnika 3 mm. Kontrolnu varijantu, u odnosu na koju je posmatran efekat etarskog ulja, predstavljali su plodovi koji su smešteni u plastičnu kutiju bez prisustva etarskog ulja. Ogljed je postavljen u tri ponavljanja, gde su tri ploda činila jedno ponavljanje. Plodovi su inkubirani u hladnjači sa normalnom atmosferom (NA, temperatura vazduha $3 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, relativna vlažnost vazduha 70%), u hladnjači sa veoma niskim sadržajem kiseonika (ULO, temperatura vazduha $1 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$, relativna vlažnost 92 – 94%, sastav atmosfere 1% O_2 i 1% CO_2) i na sobnoj temperaturi. Plodovi su čuvani 95 dana u NA i ULO hladnjači. Prečnik nekroze (mm) izmeren je na dan prestanka skladištenja, a zatim je merenje izvršeno nakon 4, 14 i 21 dana dodatne inkubacije na sobnoj temperaturi (shelf life). Ukoliko je do razvoja nekroze na plodovima došlo tokom perioda skladištenja, prečnik razvijene nekroze oduzet je od ukupnog prečnika nekroze razvijene tokom perioda inkubacije na sobnoj temperaturi. Nakon oduzimanja, dobijeni podaci su korišćeni za dalje analize. Prečnici nekroze na plodovima inkubiranim na sobnoj temperaturi takođe su izmereni nakon 4, 14 i 21 dana inkubacije. Brzina razvoja nekroze (eng. necrosis development rate - NDR) (mm/dan) izračunata je deljenjem prečnika nekroze (mm) sa trajanjem perioda posmatranja (broj dana).

5.7.4. Uticaj bioloških agenasa *Bacillus* spp. i *Streptomyces hygroscopicus* na *Fusarium* spp.

5.7.4.1. Uticaj bioloških agenasa *Bacillus* spp. i *Streptomyces hygroscopicus* na *Fusarium* spp. *in vitro*

U *in vitro* ogledu efekat bioloških agenasa je ispitan inkorporacijom agenasa u hranljivu podlogu u koncentracijama datim u Tabeli 7. Inkorporacija preparata (*Bacillus* spp.), odnosno kultivacione tečnosti (*S. hygroscopicus*) u podlogu urađena je na sledeći način: u čašu sa magnetom je uneta prohlađena PDA podloga, te je zatim čaša stavljena na magnetnu mešalicu. Tokom mešanja podloge uneta je odgovarajuća količina bioagensa, različito za svaku varijantu, kako bi se dobila podloga sa odgovarajućim procentom bioagensa. Nakon homogenizacije, podloga je razlivena u označene Petri kutije. Kao kontrolna varijanta korišćene su Petri kutije sa hranljivom podlogom bez bioagensa. Po stezanju podloga, fragmenti micelije izolata KA12, KA13 i BVA14¹ (*F. avenaceum*) prečnika 3 mm, uzeti iz sedam dana starih kultura, zasejani su u centar Petri kutije, posebno za svaku varijantu i svaki izolat. Zasejane Petri kutije su inkubirane u termostatu pri temperaturi 25 ± 1 °C. Ogled je postavljen u tri ponavljanja, a pojedinačna Petri kutija predstavljala je jedno ponavljanje.

Tabela 7. Primenjene koncentracije ispitivanih bioloških agenasa inkorporirane u PDA podlogu

<i>Bacillus</i> spp. (%)	Kultivaciona tečnost <i>Streptomyces</i> <i>hygroscopicus</i> (%)
0,5	1
1	2
1,5	3
2	4
2,5	5

5.7.4.2. Uticaj bioloških agenasa *Bacillus* spp. i *Streptomyces hygroscopicus* na *Fusarium* spp. *in vivo*

U *in vivo* ogledu ispitivanja uticaja bioloških agenasa korišćeni su plodovi jabuke sorte Zlatni delišes. Plodovi su oprani pod tekućom vodom i osušeni, a zatim površinski sterilisani 70% alkoholom. Nakon toga, svaki plod je ozleđen tako što su napravljena četiri otvora prečnika 4 mm i dubine 3 mm.

U pripremljena udubljenja mikropipetom je uneto po 2 µl pripremljenih rastvora bioloških agenasa. Primenjene koncentracije ispitivanih bioloških agenasa unete u otvore na plodovima bile su 1 i 5% za *Bacillus* spp., 5 i 100% za kultivacionu tečnost *S. hygroscopicus*. Nakon 10 minuta u otvore ploda su uneti fragmenti micelije izolata JGS3³ (*F. avenaceum*) sedam dana starih kultura prečnika 3 mm. U pozitivnoj kontroli u otvore je uneta sterilna, destilovana voda, a potom su uneti fragmenti micelije. Kao negativna kontrola, korišćeni su plodovi u čije otvore je uneta sterilna, destilovana voda, ali nije izvršena inokulacija. Ogled je postavljen u tri ponavljanja, gde su tri ploda činila jedno ponavljanje.

Inkubacija plodova u plastičnoj kutiji pri sobnoj temperaturi i prirodnim uslovima smene dana i noći, u uslovima visoke relativne vlažnosti je trajala 10 dana. Po isteku inkubacije, izmeren je prečnik razvijene nekroze na tretiranim i kontrolnim plodovima jabuke.

5.7.5. Uticaj biološkog agensa *Bacillus velezensis* na *Fusarium* spp.

5.7.5.1. Uticaj biološkog agensa *Bacillus velezensis* na *Fusarium* spp. *in vitro*

U *in vitro* ogledu u laboratorijsku čašu sa magnetom uneta je prohlađena PDA podloga, zatim je inkorporirana kultivaciona tečnost *B. velezensis*, te je smeša homogenizovana na magnetnoj mešalici. Nakon homogenizacije ovako pripremljena podloga je razlivena u sterilne Petri kutije, gde je jedna Petri kutija predstavljala jedno ponavljanje. Ogled je postavljen u tri ponavljanja. Ispitane su koncentracije 1, 2, 5 i 10%. Kružni isečci micelije prečnika 3 mm izolata KA12, JF1¹, HG3 (*F. avenaceum*) i TaB10 (*F. graminearum*) zasejani su u Petri kutije tako da micelija naleže na podlogu. U kontrolnoj varijanti je korišćena PDA bez dodavanja agensa.

Nakon završetka inkubacionog perioda od sedam dana izmeren je prečnik razvijenih kolonija u dva pravca pod uglom od 90 stepeni.

5.7.5.2. Uticaj biološkog agensa *Bacillus velezensis* na *Fusarium* spp. *in vivo*

In vivo ispitivanje dejstva agensa je sprovedeno tako što su plodovi sorte Zlatni delišes površinski dezinfikovani, a zatim ozleđeni tako što su formirani ujednačeni otvori prečnika 4 mm i dubine 3 mm. U svaki otvor je uneto po 10 µl kultivacione tečnosti *B. velezensis* u koncentracijama koje su u *in vitro* ogledu ispoljile najjaču inhibiciju porasta micelije, a zatim je izvršena inokulacija isečcima sedam dana stare micelije izolata KA12 (*F. avenaceum*) prečnika 3 mm. Ogled je postavljen u tri ponavljanja, gde su tri ploda činila jedno ponavljanje. Plodovi su inkubirani u uslovima visoke relativne vlažnosti vazduha u plastičnim kutijama na sobnoj temperaturi tokom 14 dana. Nakon inkubacionog perioda izmeren je prečnik razvijene nekroze na plodovima.

5.7.6. Uticaj toplotnih tretmana na *Fusarium* spp.

5.7.6.1. Uticaj toplotnih tretmana na klijavost spora i porast micelije *Fusarium* spp. *in vitro*

U *in vitro* ogledu u Petri kutije sa sedam dana starim kulturama izolata KA12 (*F. avenaceum*) i TaB10² (*F. graminearum*) dodato je po 10 ml sterilne destilovane vode, a zatim ostavljeno da odstoji 15 minuta. Nakon toga, micelija je sastrugana sterilnom plastičnom petljom za inokulaciju, pri čemu se vodilo računa da se ne otkinu delovi podloge. Sadržaj Petri kutije je zatim proceden kroz sterilnu gazu u čašu sa magnetom, a sadržaj koji se zadržao na gazi ispran je sa dodatnih 10 ml sterilne destilovane vode. Čaša sa magnetom je potom prenet na magnetnu mešalicu, kako bi se sadržaj u čaši homogenizovao. Zatim je po 500 µl ovako pripremljene suspenzije spora preneto pipetom u mikrotube od 1,5 ml. Mikrotube sa suspenzijama spora su u termomikseru Eppendorf ThermoMixer C (Germany) izložene delovanju različitih kombinacija temperatura i vremena izlaganja (Tabela 8). Ogled je postavljen u tri ponavljanja, a pojedinačna mikrotuba sa suspenzijom spora predstavljala je jedno ponavljanje.

Tabela 8. Vrednosti parametara izlaganja (temperatura i vreme izlaganja) suspenzija spora *Fusarium* spp. u ogledu ispitivanja uticaja toplotnih tretmana na klijavost spora i porast micelije *in vitro*

Tretman	t (°C)	Vreme	Tretman	t (°C)	Vreme
Kontrola	/		11	53	10 min
1	90	30 s	12	50	1 min
2	90	1 min	13	50	3 min
3	60	30 s	14	50	5 min
4	60	1 min	15	50	10 min
5	57	1 min	16	50	15 min
6	57	3 min	17	45	1 min
7	57	5 min	18	45	5 min
8	53	1 min	19	45	10 min
9	53	3 min	20	45	15 min
10	53	5 min	21	45	20 min

U kontrolnoj varijanti suspenzije spora nisu bile izložene delovanju visokih temperatura. Nakon tretmana, po 5 µl svake suspenzije spora je preneto pipetom u bunare u centru Petri kutije prečnika 3 mm, koji su napravljeni nakon hlađenja PDA podloge, za svaki tretman po tri Petri kutije. Nakon inkubacije od sedam dana izmeren je prečnik razvijene micelije u Petri kutiji u dva smera, pod uglom od 90 stepeni.

5.7.6.2. Zaštita plodova jabuke od prouzrokovala fuzariozne truleži tretmanima toplom vodom

Za *in vivo* ogled odabrani su tretmani 53 i 57 °C u trajanju od 3 i 5 minuta, jer su to kombinacije najnižih temperatura i najkraćih vremena izlaganja gde je zabeležena potpuna inhibicija rasta micelije izolata u *in vitro* ogledu, a za koje se pretpostavilo da neće izazvati štetne efekte na plodovima. Za potrebe *in vivo* ogleda plodovi jabuke sorte Fuji su prethodno inkubirani 24 časa na sobnoj temperaturi, kako bi se izjednačila temperatura plodova, a zatim su plodovi oprani i površinski sterilisani 70% alkoholom. Na svakom plodu su napravljena po dva ujednačena otvora prečnika 4 mm i dubine 3 mm. Veštačka inokulacija plodova izvršena je fragmentima sedam dana stare micelije prečnika 3 mm izolata KA12 (*F. avenaceum*) i TaB10² (*F. graminearum*), a zatim su plodovi podvrgnuti toplotnim tretmanima u vodenom kupatilu. Ogled je izveden u tri ponavljanja, a za svaki tretman pripremljeno je 10 plodova po ponavljanju, ukupno 30 po tretmanu. Nakon tretmana, plodovi su smešteni u plastične kutije. Polovina

plodova je inkubirana sedam dana na sobnoj temperaturi, a druga polovina je inkubirana u hladnjači sa normalnom atmosferom na temperaturi 3 °C tokom 30 dana. Po isteku inkubacije izmeren je prečnik nekroze razvijene na plodovima.

Kako bi se došlo do optimalnih vrednosti temperatura i vremena trajanja na osnovu dobijenih rezultata, ogled je ponovljen. Za planiranje ponovljenog ogleda korišćen je Box-Behnken dizajn ogleda koji omogućava kasniju optimizaciju primenjenih faktora (temperatura i vreme izlaganja) u cilju ostvarivanja maksimalnih efekata, odnosno maksimalne inhibicije fuzariozne truleži. Vrednosti parametara tretmana date su u Tabeli 9.

Tabela 9. Vrednosti parametara (temperatura i vreme izlaganja) u ponovljenom ogledu ispitivanja uticaja toplotnih tretmana na razvoj fuzariozne truleži *in vivo*

Redni broj tretmana	Temperatura vode (°C)	Vreme izlaganja (min)
1	52	1
2		2
3		3
4	54	1
5		2
6		3
7	56	1
8		2
9		3
10	centralna tačka 54	2
11	Kontrola	Netretirano

Ogled je izveden na gore opisan način, s tom razlikom da su u ponovljenom ogledu korišćeni plodovi dve sorte, Zlatni delišes i Fuji. Plodovi su inkubirani na sobnoj temperaturi

tokom deset dana, a dobijeni rezultati dalje su obrađeni u softverskom paketu Design-Expert 7.1.5, a metod željene funkcije je primenjen u cilju determinacije optimalnih vrednosti ispitivanih parametara, odnosno definisanja tretmana (temperatura i vreme izlaganja) koji bi potencijalno ispoljio najjaču inhibiciju razvoja fuzariozne truleži na plodovima jabuke. Tako definisani tretmani (za sortu Fuji za *F. avenaceum* 53,7 °C u trajanju 3 minuta, za *F. graminearum* 53,7 °C u trajanju 1 minut i 6 sekundi, a za sortu Zlatni delišes za *F. avenaceum* 53,9 °C u trajanju 2 minuta i 42 sekunde, za *F. graminearum* 52 °C u trajanju 2 minuta i 54 sekundi) su, zatim, ispitani u *in vivo* ogledu.

5.7.7. Uticaj primene 1-MCP i dinamički kontrolisane atmosfere (DCA) u skladištu na razvoj fuzariozne truleži plodova jabuke

Kao blokator receptora etilena, 1-MCP se primenjuje kako bi se usporilo sazrevanje plodova. Takođe, skladištenje plodova u skladištima sa niskom temperaturom i izmenjenom atmosferom ima za cilj da se zadrži visok kvalitet plodova jabuke. Cilj ovog ogleda bio je da se ispita uticaj primene 1-MCP i uslova dinamički kontrolisane atmosfere (DCA) na razvoj *F. avenaceum* na plodovima jabuke sorte Granny Smith. Od ukupno 60 plodova korišćenih u ogledu, 30 plodova je tretirano sa 1-MCP (komercijalno dostupan kao SmartFresh™), a preostalih 30 nije tretirano. Na površinski sterilisanim plodovima su napravljeni otvori prečnika 4 mm i dubine 3 mm, te su veštački inokulisani isečcima prečnika 3 mm sedam dana stare micelije izolata KA12 (*F. avenaceum*) gajenim na PDA podlozi. Kao negativna kontrola su korišćeni plodovi tretirani i netretirani sa 1-MCP inokulisani sa sterilnim isečcima PDA. Plodovi su smešteni u dezinfikovane, plastične kutije i čuvani na sobnoj temperaturi ili u hladnjači pod DCA uslovima (sastav atmosfere 0,5% O₂ i 0,8% CO₂, temperatura vazduha 1 ± 0,5 °C, relativna vlažnost 92 – 94%). Prečnici nekrotičnih lezija izazvanih sa *F. avenaceum* na plodovima čuvanim na sobnoj temperaturi su izmereni nakon 7, 14 i 21 dana inkubacije. Prečnici nekroze razvijene na plodovima skladištenim u DCA hladnjači su izmereni odmah nakon perioda skladištenja (143 dana), te nakon 7, 14 i 21 dana dodatne inkubacije na sobnoj temperaturi. Vrednosti prečnika nekroze razvijene na netretiranim plodovima i plodovima tretiranim sa 1-MCP izmerene su neposredno nakon završetka skladištenja i nakon dodatne inkubacije na sobnoj

temperaturi i upoređeni su sa podacima dobijenim merenjem prečnika nekroze na tretiranim i netretiranim plodovima inkubiranim na sobnoj temperaturi. Prečnici nekroze razvijeni tokom perioda skladištenja u hladnjači oduzeti su od prečnika nekroze razvijenih nakon inkubacije na sobnoj temperaturi, a podaci su upoređeni sa prečnicima nekroze razvijenim na plodovima inkubiranim samo na sobnoj temperaturi. Brzina razvoja nekroze (eng. necrosis development rate - NDR) (mm/dan) izračunata je deljenjem prečnika nekroze (mm) sa trajanjem perioda posmatranja (broj dana).

5.8. Statističke metode i obrada podataka

Statistička obrada podataka izvršena je pomoću programskog paketa Statistica 13.5 (TIBCO Software, USA) primenom analize varijanse (ANOVA) i post hoc testova (Duncan MRT, Tukey's HSD, Fisher's LSD) u intervalu poverenja 95%.

Molekularna identifikacija sekvenci regiona *TEF-1a* izvršena je višestrukim poravnanjem sekvenci izolata (Multiple sequence alignment) sa sekvencama dostupnim u GenBank bazi podataka pomoću BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) alata (<http://blast.GenBank.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), dok je proračun genetičke sličnosti urađen pomoću programskog paketa MEGA 6.0 (Tamura et al., 2011). Potvrda identifikacije dobijenih sekvenci urađena je pomoću programa ClustalW (Thompson et al., 1994).

Box-Behnken dizajn je korišćen za planiranje oglada optimizacije temperatura toplotnih tretmana, dok je za optimizaciju faktora primenjena metoda željene funkcije u programskom paketu Design-Expert 7.1.5. (StatEase, Inc., USA).

6. REZULTATI

6.1. Prikupljanje uzoraka, izolacija patogena i priprema monohifalnih izolata

Uzorci jabuke sa simptomima truleži su prikupljeni sa 10 lokaliteta, i to iz hladnjača sa veoma niskim sadržajem kiseonika (ULO), hladnjače sa dinamički kontrolisanom atmosferom (DCA), hladnjačama sa normalnom atmosferom, marketima, pijacama i proizvodnim voćnjacima. Svi uzorkovani plodovi su bili sa simptomima truleži, sa ili bez vidljive micelije. Početni simptomi su se javljali u vidu sitnih, okruglih, svetlo smeđih pega. Napredovanjem zaraze, pege su se povećavale, tkivo ulegalo, postajalo vodenasto i lako se odvajalo od zdravog tkiva, a kasnije se javljala beličasta, ružičasta ili žućkasta micelija na površini ploda. Na poprečnom preseku plodova po dužini prečnika pege uočeno je da se nekroza širila u dubinu ploda u obliku slova V (Slika 1). Ovakvi simptomi su primećeni kod plodova sa simptomima truleži za koje se pretpostavljalo da su prouzrokovani od strane gljiva iz roda *Fusarium*, uzorkovani su u devet ULO hladnjača, tri hladnjače sa normalnom atmosferom, iz jedne prodavnice i iz jednog proizvodnog voćnjaka. Na plodovima uzorkovanim iz hladnjača sa dinamički kontrolisanom atmosferom (DCA) i na pijacama nisu se razvili opisani simptomi. Tokom trogodišnjeg perioda prikupljanja uzoraka dobijeno je 320 izolata fitopatogenih gljiva. Za mnoge od njih se, na osnovu izgleda kolonije i spora, moglo sa sigurnošću zaključiti da ne pripadaju rodu *Fusarium*, te su izuzeti iz kolekcije i daljih istraživanja. Ukupno je prikupljeno 59 izolata *Fusarium* spp. (Tabela 10). Ovim izolatima pridružena su tri izolata dobijena 2012. godine u okviru drugih istraživanja kada je u populaciji patogena na uskladištenim plodovima jabuke zabeležen značajan udeo *Fusarium* vrsta, što je iniciralo istraživanja sprovedena u ovom radu. Na ovaj način se došlo do ukupnog broja od 62 izolata koja su uključena u kolekciju.

Za 15 reprezentativnih izolata su formirane monohifalne kulture (TaB10, TaB10², TaB62, TaB12, LjG15/17, TAV18¹, JF1¹, Bv4/17², JGS3³, JZ13/17¹, JvZ8/18, R2G11², KA13, HG8 i HG3).

Tabela 10. Prikupljeni izolati odabrani za formiranje kolekcije i proučavanje u ovom istraživanju

Izolat	Datum izolacije	Lokalitet	Tip objekta	Izolat	Datum izolacije	Lokalitet	Tip objekta
KA12	jul 2012.	Kać	ULO	TvRR6 ³	februar 2017.	Tavankut	ULO
KA13	jul 2012.	Kać	ULO	TvRR6 ⁴	februar 2017.	Tavankut	ULO
MRMZD3	jul 2012.	Mala Remeta	ULO	TvRR6 ^{4k}	februar 2017.	Tavankut	ULO
BVA14 ¹	mart 2016.	Bački Vinogradi	ULO	JB/2/17 ¹	april 2017.	Jazak	ULO
BVA14 ²	mart 2016.	Bački Vinogradi	ULO	JB/2/17 ²	april 2017.	Jazak	ULO
JGS3	mart 2016.	Jazak	ULO	JB/5/17	april 2017.	Jazak	ULO
JGS3 ²	mart 2016.	Jazak	ULO	JZ/13/17	april 2017.	Jazak	ULO
JGS3 ³	mart 2016.	Jazak	ULO	JZ/13/17 ¹	april 2017.	Jazak	ULO
JGS3 ⁴	mart 2016.	Jazak	ULO	LjG/15/17	april 2017.	Ljutovo	NA
JF1 ¹	mart 2016.	Jazak	ULO	BV/4/17 ¹	maj 2017.	Bački Vinogradi	ULO
JF1 ²	mart 2016.	Jazak	ULO	BV/4/17 ²	maj 2017.	Bački Vinogradi	ULO
JF1 ³	mart 2016.	Jazak	ULO	BV/9/17 ²	maj 2017.	Bački Vinogradi	ULO
JF1 ⁴	mart 2016.	Jazak	ULO	N3/17	jul 2017.	Novi Sad	prodavnica
TaB6 ¹	mart 2016.	Tavankut	ULO	N11/17	jul 2017.	Novi Sad	prodavnica
TaB6 ²	mart 2016.	Tavankut	ULO	N23/17	jul 2017.	Novi Sad	prodavnica
TaB12	mart 2016.	Tavankut	ULO	JG/4/18 ¹	mart 2018.	Jazak	ULO
TaB10	mart 2016.	Tavankut	ULO	JG/4/18 ²	mart 2018.	Jazak	ULO
TaB10 ²	mart 2016.	Tavankut	ULO	JvG/5/18	mart 2018.	Jazak	ULO
ThJ4 ¹	mart 2016.	Tavankut	NA	JvG/10/18	mart 2018.	Jazak	ULO
ThJ4 ²	mart 2016.	Tavankut	NA	JvG/13/18	mart 2018.	Jazak	ULO
TiJ7 ¹	mart 2016.	Tavankut	NA	JvG/23/18	mart 2018.	Jazak	ULO
TiJ7 ²	mart 2016.	Tavankut	NA	JvG/26/18	mart 2018.	Jazak	ULO
TvJ3	mart 2016.	Tavankut	ULO	JvZ8/18	mart 2018.	Jazak	ULO
HG3	mart 2016.	Hajdukovo	ULO	JvZ9/18 ¹	mart 2018.	Jazak	ULO
HG8	mart 2016.	Hajdukovo	ULO	JvZ9/18 ²	mart 2018.	Jazak	ULO
R2G11 ²	februar 2017.	Ridica	ULO	JvZ11/18	mart 2018.	Jazak	ULO
BR2GS10 ¹	februar 2017.	Bački Vinogradi	ULO	JvZ15/18	mart 2018.	Jazak	ULO
BR2GS10 ²	februar 2017.	Bački Vinogradi	ULO	TG5/18	mart 2018.	Titel	ULO
BR2GS10 ³	februar 2017.	Bački Vinogradi	ULO	TAV18 ¹	jul 2018.	Tavankut	voćnjak
BR2GS10 ⁴	februar 2017.	Bački Vinogradi	ULO	TAV18 ²	jul 2018.	Tavankut	voćnjak
TvRR6 ^{1k}	februar 2017.	Tavankut	ULO	TAV18 ³	jul 2018.	Tavankut	voćnjak

*Tip objekta iz kog su plodovi uzorkovani:

ULO – hladnjačama sa veoma niskim procentom kiseonika (Ultra Low Oxygen - ULO);

NA – hladnjača sa normalnom atmosferom



Slika 1. Trulež ploda jabuke prouzrokovana *Fusarium avenaceum* (prirodna infekcija): površinski izgled (levo) i poprečni presek (desno)

6.2. Provera patogenosti izolata i zastupljenost vrsta roda *Fusarium*

Za svaki od 62 izolata proverena je patogenost, zatim je urađena reizolacija i ponovna provera patogenosti reizolata. Simptomi koji su se razvili na plodovima sorte Zlatni delišes su bili istovetni sa simptomima plodova iz kojih su izolati izolovani u slučaju svih ispitivanih izolata. Takođe, izgled kolonija reizolata je potpuno odgovarao izgledu kolonija polaznih izolata. Na kraju, proverom patogenosti reizolata ponovo su reprodukovani simptomi koji su odgovarali simptomima fuzariozne truleži ploda jabuke koje su prouzrokovali polazni izolati, te je utvrđeno da je svaki od 62 izolata ispoljio patogenost. Na plodovima u kontrolnoj varijanti nije došlo do pojave simptoma.

Merenje prečnika i dubine razvijene nekroze je izvršeno za 15 reprezentativnih izolata nakon isteka inkubacionog perioda od 16 dana. Analizom varijanse utvrđeno je postojanje značajnih razlika ($p \leq 0,05$) između izolata u prečniku i dubini nekroze koje su prouzrokovali na veštački inokulisanim plodovima jabuke (Tabele 11 i 12).

Tabela 11. Jednofaktorijalna analiza varijanse prečnika nekroze na veštački inokulisanim plodovima jabuke sorte Zlatni delišes izolatima *Fusarium* spp.

Izvori varijacije	Suma kvadrata	Stepeni slobode	Sredina kvadrata	F-odnos	Nivo značajnosti
	SS	Df	MS	F	p
Izolat	3759,33	14	268,52	30,115	0,00
Greška	401,25	45	8,92		

Tabela 12. Jednofaktorijalna analiza varijanse dubine nekroze na veštački inokulisanim plodovima jabuke sorte Zlatni delišes izolatima *Fusarium* spp.

Izvori varijacije	Suma kvadrata	Stepeni slobode	Sredina kvadrata	F-odnos	Nivo značajnosti
	SS	Df	MS	F	p
Izolat	1491,467	14	106,533	28,536	0,00
Greška	56,00	15	3,733		

Najveći prečnik nekroze je izmeren kod izolata JGS3³ od 31,25 mm i brzinom razvoja nekroze egzokarpa od 1,95 mm/dan (Tabela 12). Međutim, na istom nivou značajnosti su bili i izolati R2G11², Bv4/17², JZ/13/17¹ i JvZ8/18 sa brzinom razvoja nekroze u rasponu od 1,69 do 1,89 mm/dan. Preostalih 10 izolata razvili su statistički značajno manji prečnik nekroze. Brzinu razvoja nekroze egzokarpa kod ovih izolata bila je takođe manja i iznosila je od 0,19 do 1,16 mm/dan.

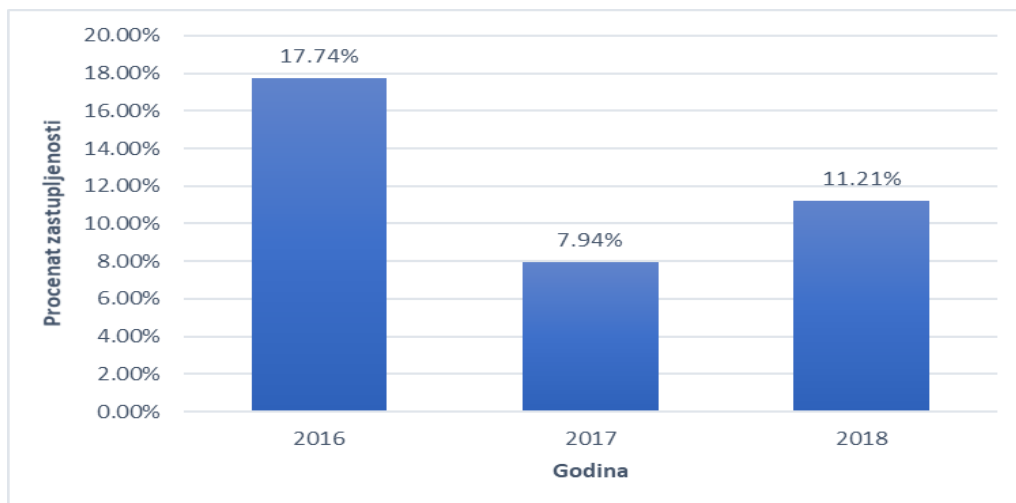
Sposobnost kolonizacije mezokarpa ploda procenjena je merenjem dubine nekroze. Najveća dubina nekroze je izmerena na plodovima inokulisanim izolatima JGS3³, Bv4/17², JvZ8/18, 25,5, 27,5, 24 mm respektivno (Tabela 13). Kod ostalih izolata izmerena dubina nekroze je bila na statistički značajno nižem nivou i iznosila je od 3 do 21 mm. Brzina razvoja nekroze mezokarpa kod izolata JGS3³ i Bv4/17² iznosila je 1,56 mm/dan, odnosno 1,72 mm/dan, dok je kod preostalih izolata iznosila od 0,19 do 1,5 mm/dan.

Tabela 13. Prečnik, dubina i brzina razvoja nekroze egzokarpa i mezokarpa na veštački inokulisanim plodovima jabuke sorte Zlatni delišes izolatima *Fusarium* spp.

Izolat	Prečnik (mm) ± Sd	Brzina razvoja nekroze egzokarpa (mm/dan)	Dubina (mm) ± Sd	Brzina razvoja nekroze mezokarpa (mm/dan)
Bv4/17²	27,25 ± 3,4 e	1,7	27,5 ± 3,54 g	1,72
HG3	12,75 ± 1,5 bc	0,8	9,5 ± 2,12 bc	0,59
HG8	9,75 ± 0,95 b	0,61	7,5 ± 0,71 b	0,47
JF1¹	18 ± 4,76 d	1,12	10,5 ± 0,71 bc	0,66
JGS3³	31,25 ± 2,87 e	1,95	25,5 ± 0,71 g	1,56
JvZ8/18	30,25 ± 3,1 e	1,89	24 ± 0 fg	1,5
JZ/13/17¹	28,5 ± 2,38 e	1,78	21 ± 2,83 ef	1,31
KA13	3 ± 0 a	0,19	3 ± 0 a	0,19
LjG/15/17	14,75 ± 2,06 cd	0,92	8,5 ± 0,71 b	0,53
R2G11²	27 ± 1,83 e	1,69	17,5 ± 0,71 de	1,09
TaB10	18,5 ± 4,65 d	1,16	12 ± 2,83 bc	0,75
TaB10²	18,5 ± 4,65 d	1,16	12 ± 2,83 bc	0,75
TaB12	15 ± 3,46 cd	0,94	9,5 ± 2,12 bc	0,59
TaB6²	14,25 ± 1,26 cd	0,89	10 ± 0 bc	0,62
TAV18¹	17,5 ± 2,89 d	1,09	14 ± 2,83 cd	0,87

*Vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju

Utvrđeno je da je tokom 2016. godine od prikupljena 62 ploda jabuke sa simptomima truleži na 11 plodova identifikovan *Fusarium* spp. kao prouzrokovatelj truleži, što iznosi 17,74%. Nadalje, tokom 2017. godine prikupljeno je 151 plod sa simptomima truleži, a na 12 je potvrđeno prisustvo *Fusarium* spp., što predstavlja 7,94%. Poslednje godine prikupljanja uzoraka, od 107 prikupljenih plodova na 12 je utvrđeno prisustvo *Fusarium* spp., što iznosi 11,21% (Grafikon 1). Prosečna zastupljenost za trogodišnji period iznosi 10,94%. U nekim slučajevima više izolata je prihvaćeno iz istog ploda jer je na takvim plodovima uočeno više nekrotičnih mesta ili su nakon izolacije izolati ispoljili različita morfološka svojstva, što je rezultiralo većim brojem izolata *Fusarium* spp. od broja prikupljenih plodova sa simptomima fuzariozne truleži.



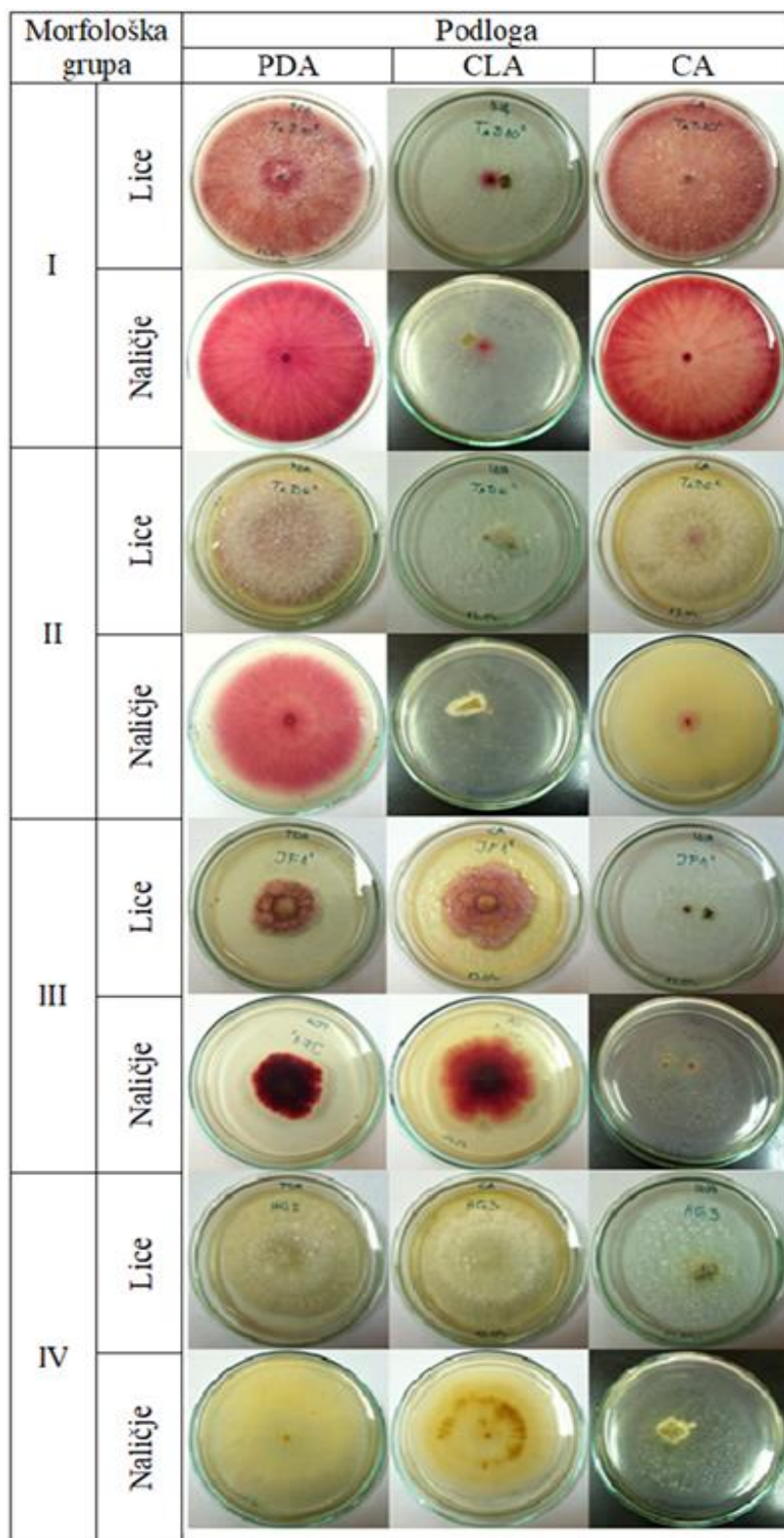
Grafikon 1. Procentualna zastupljenost *Fusarium* spp. na plodovima jabuke po godinama

6.3. Morfološke i odgajivačke odlike izolata *Fusarium* spp.

6.3.1. Morfološke odlike vegetativnih struktura

Za potrebe ispitivanja morfoloških odlika vegetativnih struktura izolati su uzgajani na tri hranljiva medijuma (PDA, CLA i CA). Već nakon 24 sata inkubacije u mraku pri 25 ± 1 °C, kod svih izolata je uočen razvoj vazdušne micelije beličaste boje. Nakon nekoliko dana počinje pigmentacija kolonija, te one menjaju boju i uočava se da se kolonije vizuelno razlikuju. Nakon sedam dana inkubacije svi izolati su na osnovu izgleda i boje kolonije razvijene na hranljivim podlogama razvrstani u četiri morfološke grupe (Slika 2).

U morfološku grupu I su svrstana dva izolata TaB10 i TaB10² (3,23% od ukupnog broja izolata). Micelija ovih izolata na PDA podlozi bila je vazдушna, ružičaste boje koja je starenjem kolonije poprimila žućkastu nijansu u centru. Obod kolonije bio je ravan. Pigmentacija podloge bila je ružičasta i uočeno je zrakasto širenje kolonije u podlozi. Morfologija na CA podlozi bila je slična kao na PDA, dok se izgled kolonije na CLA podlozi razlikovao. Micelija je bila supstratna, prozirna, a samo u centru ružičasta.



Slika 2. Izgled kolonija izolata iz različitih morfoloških grupa na različitim podlogama nakon sedam dana inkubacije

U drugoj morfološkoj grupi su se našli izolati sa sledećim karakteristikama: na PDA podlozi micelija je bila vazдушna, blede ružičaste boje sa ravnim obodom. U podlozi se stvarao pigment ružičaste boje, svetliji nego kod prethodne grupe i zrakasto se širio u podlozi. Na CA je uočeno da je micelija bila bela sa koncentričnim krugovima, u centru svetlo ružičasta, sa pigmentacijom podloge koja je bela, u centru svetlo ružičasta, zrakasto se širila u podlozi. Na podlozi CLA micelija je bila supstratna, dok je na listu karanfila bujna i vazдушna, bela do prozirna. U ovu grupu svrstan je ukupno 21 izolat (33,87%): TaB6¹, TaB6², TaB12, TiJ7¹, TiJ7², ThJ4¹, ThJ4², JB/2/17¹, JB/2/17², JG/4/18², JvG/13/18, JvZ15/18, Bv/4/17², Bv/4/17¹, N3/17, N11/17, N23/17, KA12, TAV18¹, TAV18² i TAV18³.

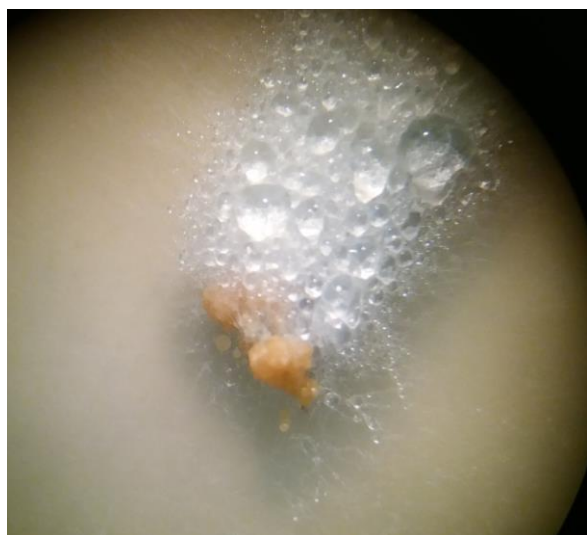
Izolati iz treće morfološke grupe se značajnije razlikuju od

prethodne dve grupe po izgledu micelije. Na PDA podlozi obod kolonije bio je talasast, micelija je vazдушna, gusta i pufnasta, ružičaste boje sa primesama žute. Pigmentacija podloge bila je bordo boje, sa rasponom od svetlih do tamnih nijansi, a takođe su se mogle uočiti mramoraste šare. Na CA podlozi boja kolonije i pigmentacija podloge je bleđa, dok je na CLA micelija bila supstratna, žuta do prozirna. U ovu grupu je svrstan najveći broj izolata (ukupno 34 izolata, odnosno 54,84%) i to: BR2GS10¹, BR2GS10², BR2GS10³, BR2GS10⁴, BVA14¹, BVA14², Bv/9/17², JGS3, JGS3², JGS3³, JGS3⁴, JF1¹, JF1², JF1³, JF1⁴, JB/5/17, JG/4/18, JvG/5/18, JvG/10/18, JvG/23/18, JvG/26/18, JvZ8/18, JvZ9/18¹, JvZ9/18², JvZ11/18, JZ/13/17, JZ/13/17¹, LjG/15/17, MRMDZ3, TG/5/18, TvRR6^{1k}, TvRR6³, TvRR6⁴ i TvRR6^{4k}.

U četvrtoj morfološkoj grupi su se našli izolati koji se prvenstveno razlikuju od ostalih po boji micelije. Naime, ovi izolati na PDA i CA podlozi formirali su kolonije čija je micelija vazдушna, žute do bele boje sa talasastim obodom. Pigmentacija podloge bila je bela do žuta. Na CLA podlozi micelija je bila supstratna, ali bujna vazдушna na listu karanfila, žuta do prozirna. Podloga je bila prozirna. U ovu grupu je svrstano 5 izolata (8,06%) HG3, HG8, TvJ3, R2G11² i KA13.

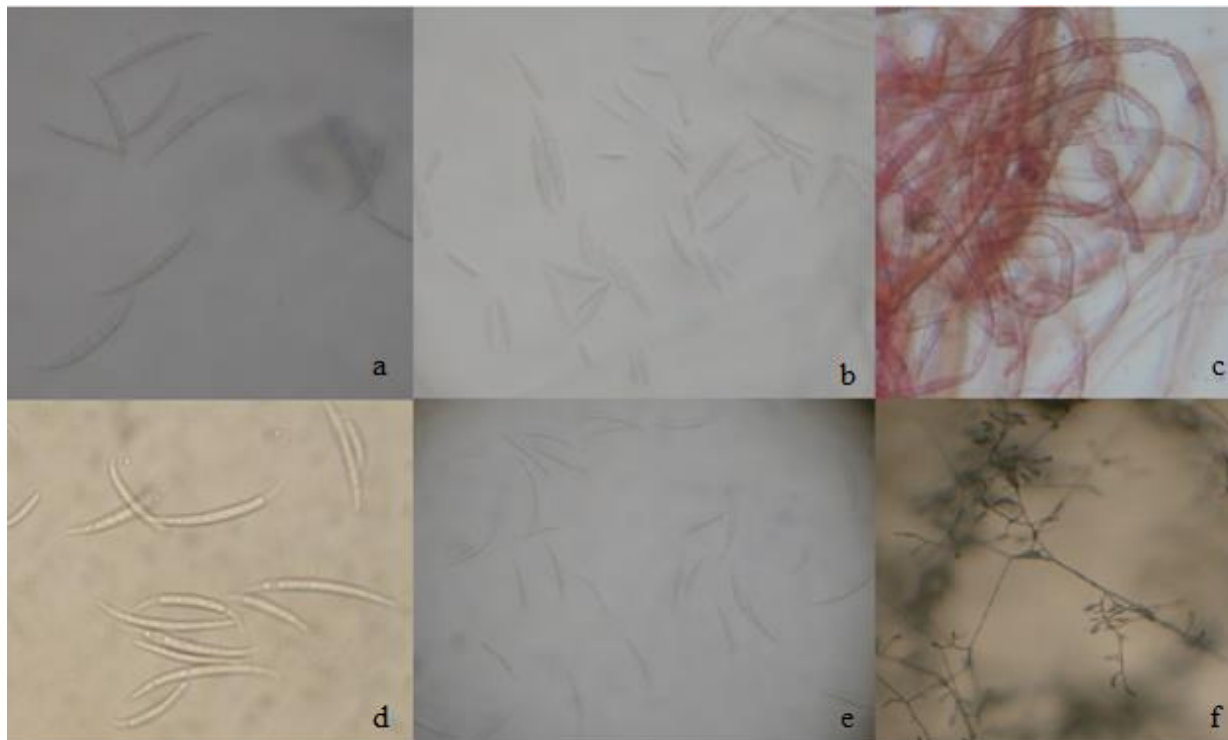
6.3.2. Morfološke odlike reproduktivnih struktura

Posmatranjem 15 reprezentativnih izolata gajenih na podlogama CLA i CA pod mikroskopom detektovane su reproduktivne strukture izolata i upoređene sa opisima *Fusarium* vrsta od strane Lević (2008) i Leslie i Summerell (2006). Izolati iz svih prethodno opisanih morfoloških grupa su formirali sporodohije na listu karanfila (CLA podloga) kao i u centralnom delu kolonije starijih kultura (Slika 3). Boja sporodohija se kretala od svetlo narandžaste do narandžaste kod pripadnika druge, treće i četvrte grupe, dok su kod pripadnika prve morfološke grupe one bile i crvenkaste.



Slika 3. *Fusarium* spp. – Formiranje sporodohija na CLA podlozi

Uočene konidije se razlikuju kod različitih grupa izolata. Naime, u poslednje tri grupe, pored karakterističnih makrokonidija, primećene su i manje konidije, opisane od Lević (2008) kao mezokonidije. Makrokonidije i mezokonidije se formiraju na monofijalidama ili polifijalidama (Slika 4).



Slika 4. Mikroskopske strukture izolata *Fusarium* spp.: a) makrokonidije izolata I grupe; b) makro i mezokonidije izolata II grupe; c) hlamidospora (I grupa); d) makrokonidije izolata III grupe; e) makrokonidije izolata IV grupe; f) snimak kolonije *in situ*

Makrokonidije su izdužene, savijene, sa zašiljenom vršnom ćelijom i bazalnom u obliku stopala, sa 4 do 6, a najčešće 5 septi kod pripadnika druge, treće i četvrte morfološke grupe, odnosno od 4 do 7 septi u prvoj morfološkoj grupi. U Tabeli 14 prikazane su izmerene vrednosti dužina i širina makrokonidija izolata iz sve četiri morfološke grupe. Mezokonidije su prave ili vretenaste, a neke i blago savijene, sa jednom do tri septe. Uočene su kod predstavnika druge, treće i četvrte grupe. Vrednosti dužine i širine mezokonidija za sve tri grupe su bile prilično ujednačene. Dužina mezokonidija se kretala od 13,28 do 18,16 μm sa prosečnom vrednosti od 15,88 μm , dok se širina kretala od 3,61 do 4,27 μm , sa prosečnom vrednosti od 3,96 μm . Kod izolata iz prve morfološke grupe su uočene isključivo makrokonidije. Takođe, kod izolata iz prve grupe uočene su pojedinačne, interkalarne, okruglaste hlamidospore.

Tabela 14. Vrednosti dužina i širina makrokonidija izolata *Fusarium* spp.

Morfološka grupa	dužina (μm)		širina (μm)	
	srednja	raspon	srednja	raspon
I	46,69	32,72 – 68,62	5,57	4,21 – 6,59
II	34,17	29,75 – 40,62	4,00	3,47 – 4,79
III	48,72	36,05 – 55,13	3,93	3,27 – 4,96
IV	39,85	27,4 – 50,77	4,08	2,99 – 4,86

6.3.3. Odgajivačke odlike izolata *Fusarium* spp.

6.3.3.1. Uticaj različitih hranljivih podloga na rast kolonija izolata *Fusarium* spp.

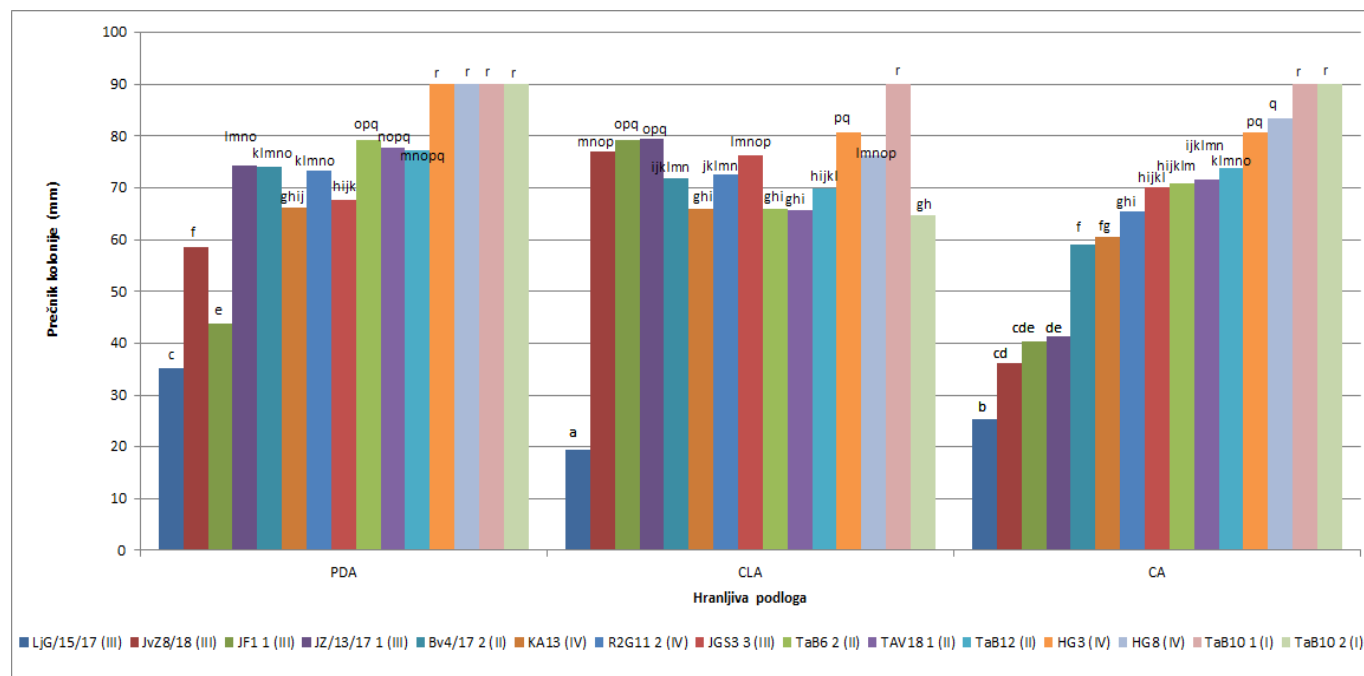
Uticaj različitih hranljivih podloga na brzinu rasta kolonija ispitivanih izolata *Fusarium* spp. je takođe praćen na podlogama PDA, CLA, i CA merjenjem prečnika kolonije (mm). Ocena je vršena nakon sedam dana inkubacije izolata na 25 ± 1 °C.

Tabela 15. Dvofaktorijalna analiza varijanse prečnika kolonije izolata *Fusarium* spp. gajenih na različitim podlogama nakon sedam dana

Izvori varijacije	Suma kvadrata	Stepeni slobode	Sredina kvadrata	F-odnos	Nivo značajnosti
	SS	Df	MS	F	p
Izolat	39000,2	14	2785,7	182,92	0,00
Podloga	2396,5	2	1198,3	78,68	0,00
Izolat*Podloga	12573,8	28	449,1	29,49	0,00
Greška	2056,0	135	15,2		

Na osnovu rezultata statističke obrade može se utvrditi da oba faktora, podloga i izolat, jesu značajan izvor variranja zavisne varijable, prečnika kolonije (Tabela 15). Na osnovu post hoc Duncan MRT testa (Grafikon 2) vidi se da su najveći porast u periodu od sedam dana (90 mm) imali izolati TaB10 (na svim podlogama) i TaB10² (na podlogama PDA i CA) iz prve morfološke grupe, te izolati HG3 i HG8 iz četvrte morfološke grupe na PDA podlozi. Najmanji porast je imao izolat LjG/15/17 na svim podlogama (19 – 35,25 mm) iz treće morfološke grupe.

U prvoj morfološkoj grupi oba predstavnika su imali maksimalan porast (90 mm), odnosno kolonija je ispunila Petri kutiju na svim podlogama, izuzev izolata TaB10² na CLA podlozi. Nadalje, na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da između prečnika kolonija izolata iz druge morfološke grupe nema statistički značajnih razlika, izuzev u slučaju izolata Bv4/17² na podlozi CA, čija je vrednost statistički značajno manja u poređenju sa preostalim izolatima iz ove grupe (TaB6², TAV18¹ i TaB12). Izolati koji pripadaju trećoj morfološkoj grupi ispoljili su različito ponašanje na različitim podlogama. Naime, na PDA podlozi prečnici kolonije izolata JGS3³ i JZ/13/17¹ su statistički značajno bili veći u poređenju sa prečnicima kolonija izolata LjG/15/17, JvZ8/18 i JF1¹. Na CLA podlozi nisu uočene značajne razlike između porasta izolata JvZ8/18, JF1¹, JGS3³ i JZ/13/17¹, međutim prečnici kolonija svih izolata su bili statistički značajno veći od prečnika kolonija izolata LjG/15/17. Na podlozi CA između prečnika kolonija izolata JvZ8/18, JF1¹ i JZ/13/17¹ nema statistički značajnih razlika, dok je prečnik kolonije izolata LjG/15/17 značajno manji, a prečnik kolonije izolata JGS3³ je statistički značajno veći u odnosu na sve izolate iz ove grupe. Predstavnici četvrte morfološke grupe su se mogli podeliti u dve podgrupe: prvu koju čine izolati KA13 i R2G11² i drugu koju čine HG3 i HG8. Naime, izolati HG3 i HG8 razvijaju statistički značajno veći prečnik kolonije nakon sedam dana u odnosu na druga dva izolata, dok između njih nema statistički značajne razlike. Ove razlike su slabije uočljive na CLA podlozi, međutim i ovde se jasno vidi razdvajanje u brzini rasta između dve podgrupe četvrte morfološke grupe.



Grafikon 2. Prečnik (mm) kolonija izolata *Fusarium* spp. nakon sedam dana inkubacije na različitim podlogama; rimski broj u zagradi predstavlja morfološku grupu

*Stubovi obeleženi različitim slovima se statistički značajno razlikuju

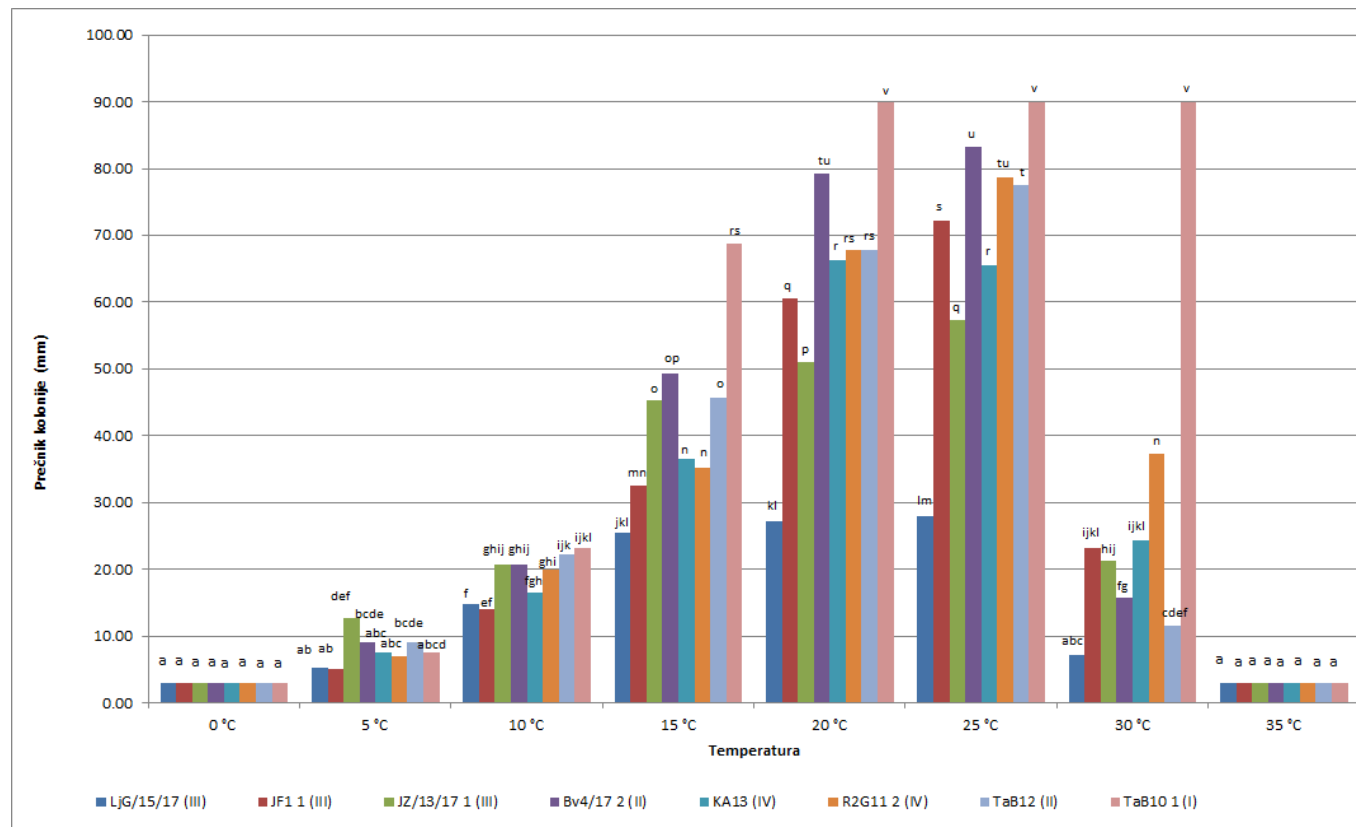
6.3.3.2. Uticaj temperature na rast kolonija izolata *Fusarium* spp.

Rezultati statističke obrade ukazuju da oba faktora, temperatura i izolat, jesu značajan izvor variranja zavisne varijable, odnosno prečnika kolonije (Tabela 16).

Tabela 16. Dvofaktorijalna analiza varijanse prečnika kolonije izolata *Fusarium* spp. gajenih na PDA podlozi pri različitim temperaturama nakon sedam dana

Izvori varijacije	Suma kvadrata	Stepeni slobode	Sredina kvadrata	F-odnos	Nivo značajnosti
	SS	Df	MS	F	p
Izolat	18291,1	7	2613,0	234,88	0,00
Temperatura	156218,8	7	22317,0	2006,02	0,00
Izolat*Temperatura	27081,1	49	552,7	49,68	0,00
Greška	2136,0	192	11,1		

Nakon sedam dana izlaganja različitim temperaturama izmeren je prečnik kolonija svih testiranih izolata. Na temperaturi 0 °C kod svih izolata je zabeleženo odsustvo porasta kolonije. Porastom temperature prečnik kolonija izolata je bio veći nakon istog inkubacionog perioda. Razlika u porastu izolata gajenih na različitim temperaturama je bila prilično oštra na svakoj narednoj višoj temperaturi do temperature od 20 °C. Nakon ove tačke razlika između različitih temperatura se smanjuje, tako da ako uporedimo prečnike kolonija izolata razvijenih na 20 i 25 °C vidimo da razlika, iako statistički značajna kod većine izolata, ipak nije toliko velika. Na temperaturi od 30 °C dolazi do oštrog pada, osim kod izolata TaB10, gde je prečnik isti kao i na prethodnoj temperaturi, da bi na temperaturi 35 °C ponovo bilo uočena inhibicija rasta kolonija (Grafikon 3).



Grafikon 3. Prečnik (mm) kolonija izolata *Fusarium* spp. nakon sedam dana inkubacije na različitim temperaturama; rimski broj u zagradi predstavlja morfološku grupu

*Stubovi obeleženi različitim slovima se statistički značajno razlikuju

Kako bi se proverilo da li je inhibitorno dejstvo temperatura od 0 i 35 °C bilo ujedno i letalno za miceliju, izolati gajeni na ovim temperaturama su, nakon završetka inkubacionog

perioda od sedam dana, dodatno inkubirani na sobnoj temperaturi pet dana. Tokom ovog inkubacionog perioda izolati prethodno izloženi temperaturi od 0 °C su nastavili da normalno rastu, dok kod izolata prethodno gajenih na 35 °C nije zabeležen rast micelije ni nakon dodatnog inkubacionog perioda na sobnoj temperaturi, što navodi na zaključak da je ova temperatura imala letalni efekat na izolate tokom inkubacionog perioda od sedam dana.

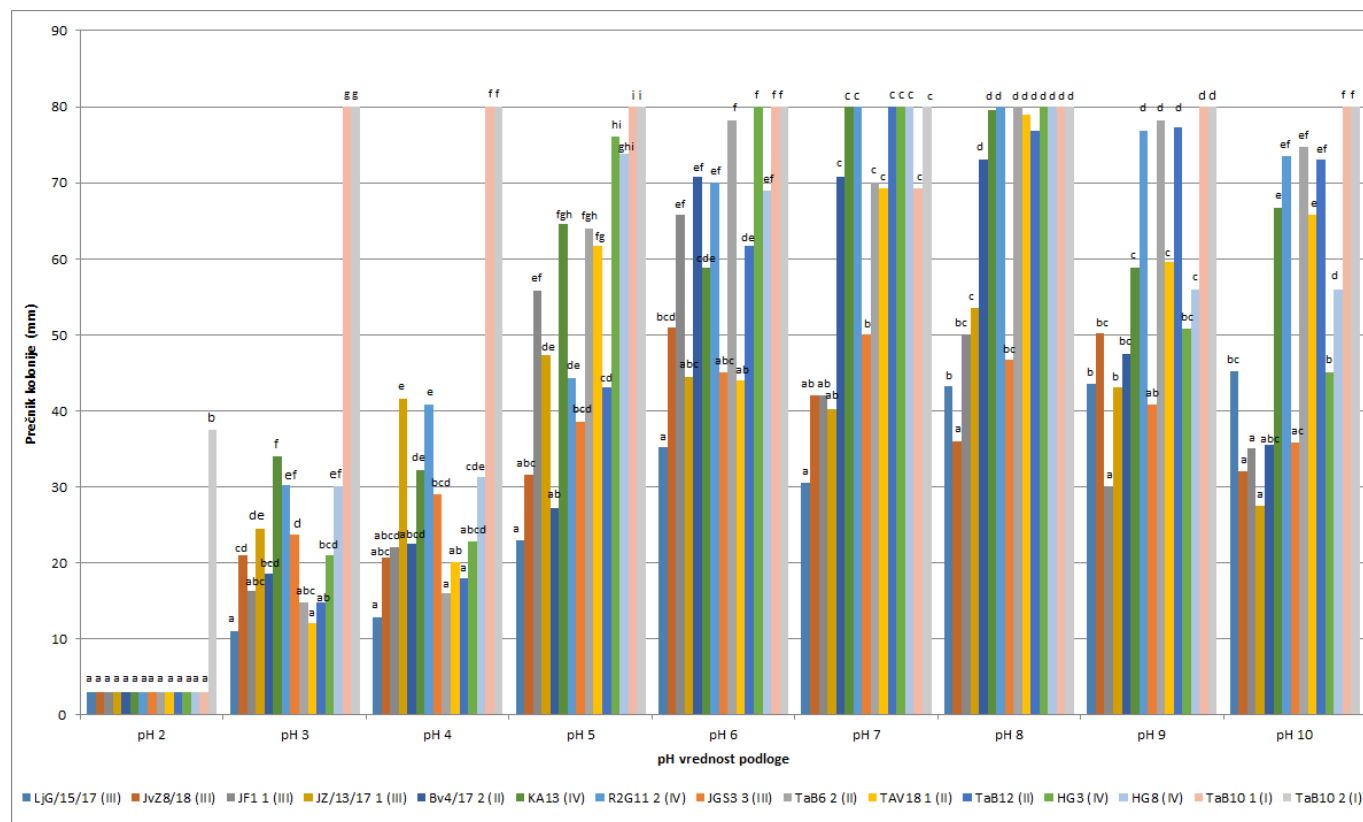
6.3.3.3. Uticaj kiselosti podloge na rast kolonija izolata *Fusarium* spp.

Na osnovu ostvarenih rezultata utvrđeno je da je pH vrednost podloge takođe značajan i ograničavajući faktor za razvoj izolata na hranljivoj podlozi (Tabela 17).

Tabela 17. Dvofaktorijalna analiza varijanse prečnika kolonije izolata *Fusarium* spp. gajenih na PDA podlozi pri različitim pH vrednostima nakon sedam dana

Izvori varijacije	Suma kvadrata	Stepeni slobode	Sredina kvadrata	F-odnos	Nivo značajnosti
	SS	Df	MS	F	p
pH vrednost	208710	8	26089	580,63	0,00
Izolat	93150	14	6654	148,08	0,00
pH vrednost*Izolat	65831	112	588	13,08	0,00
Greška	18198	405	45		

Ispitivani izolati ispoljili su statistički značajnu razliku u brzini porasta micelije na različitim pH vrednostima podloge. Na porast kolonije izolata prve morfološke grupe (TaB10 i TaB10²) kiselost podloge, izuzev pri pH 2, nije značajno uticala. Predstavnicima druge morfološke grupe su ispoljili najbolji porast pri kiselosti podloge pH 7 i 8. Izolati treće morfološke grupe su različito reagovali na promenu kiselosti podloge. Najveći porast kolonije su ispoljili TAV18¹ pri pH 7 i 8, TaB6² pri pH 6, 7, 8 i 9, TaB12 pri pH 7, 8, 9 i 10. Izolati četvrte morfološke grupe su ispoljili najveći porast pri pH 7 i 8, kao i izolati HG3 i HG8 pri pH 5 i 6, te R2G11² pri pH podloge od 6 i 9 (Grafikon 4).

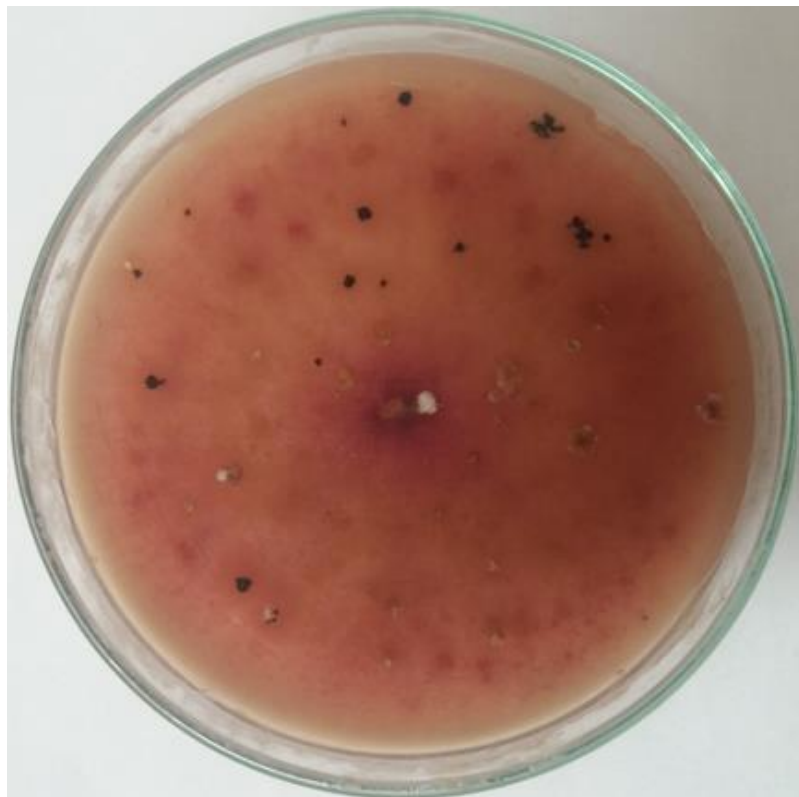


Grafikon 4. Prečnik kolonija (mm) izolata *Fusarium* spp. nakon sedam dana inkubacije pri različitim pH podloge; rimski broj u zagradi predstavlja morfološku grupu

*Stubovi obeleženi različitim slovima se statistički značajno razlikuju

6.3.4. Obrazovanje polnog stadijuma

Razvoj peritecija je praćen tokom inkubacionog perioda od sedam dana. Peritecije tamno mrke do crne boje su se formirale u grupama i pojedinačno uronjene u podlogu tako da delom izviruju iz podloge, dok su neke bile potpuno uronjene u podlogu (Slika 5).



Slika 5. Peritecije izolata TaB10 formirane na hranljivoj podlozi u Petri kutiji



Slika 6. Askusi u grupi (levo) i pojedinačno (desno) izolata TaB10

pripadaju drugoj vrsti, najverovatnije vrsti *F. graminearum*. Ova pretpostavka je ispitana primenom molekularnih metoda.

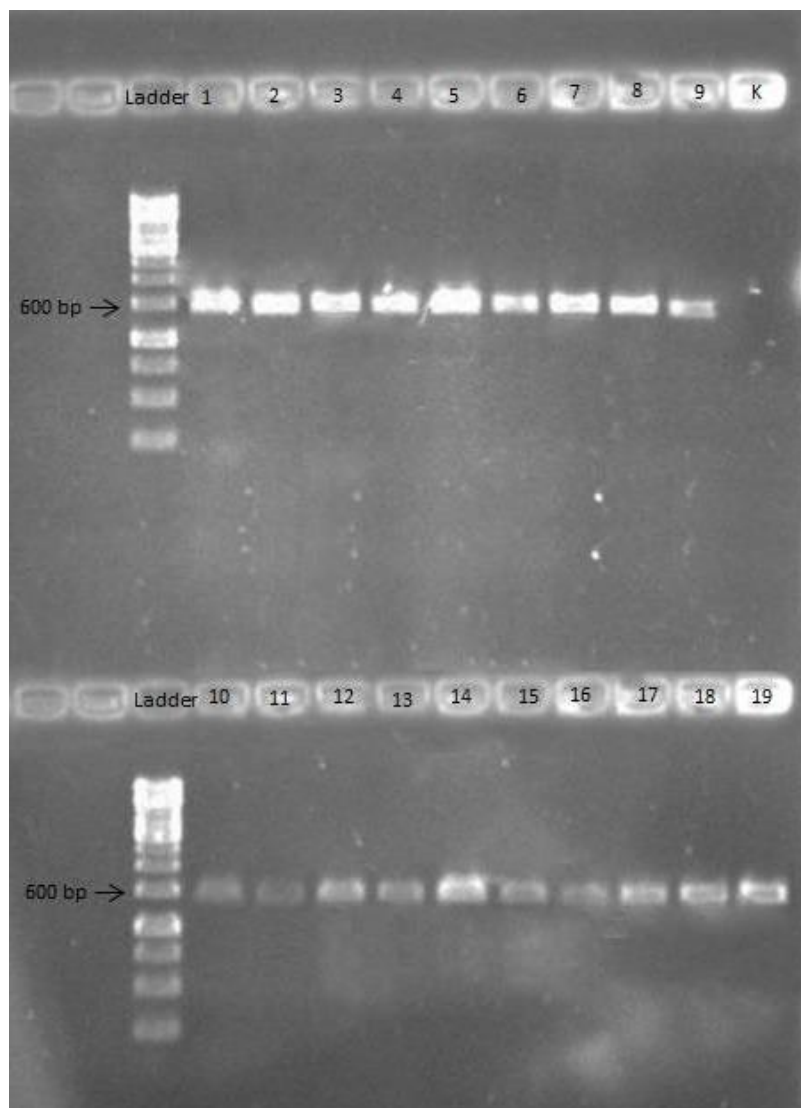
Po isteku inkubacionog perioda formirane peritecije su pregledane pod mikroskopom kako bi se utvrdilo da li je došlo do formiranja askusa sa askosporama. U slučaju izolata iz prve morfološke grupe zabeleženo je prisustvo askusa sa askosporama koje su bile na različitim stupnjevima razvoja i zrelosti (Slika 6). Askusi i askospore nisu uočene kod izolata iz preostalih morfoloških grupa posmatranjem peritecija pod mikroskopom.

Na osnovu predstavljenih rezultata, odnosno na osnovu mikroskopskih i makroskopskih odlika vegetativnih i reproduktivnih struktura, odgajivačkih odlika izolata, kao i obrazovanja polnog stadijuma, pretpostavljeno je da predstavnici druge, treće i četvrte morfološke grupe pripadaju vrsti *F. avenaceum*, dok izolati iz prve morfološke grupe (TaB10 i TaB10²)

6.4. Molekularna identifikacija i karakterizacija izolata *Fusarium* spp.

6.4.1. Ekstrakcija DNK i provera uspešnosti ekstrakcije

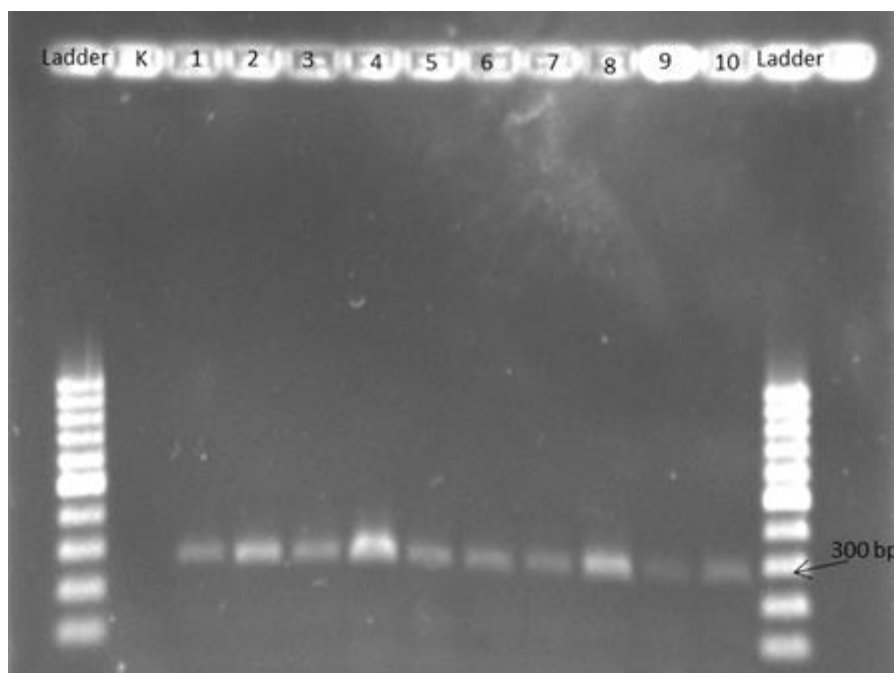
Nakon uspešne ekstrakcije DNK iz sedam dana starih kultura proveren je kvalitet iste pomoću PCR reakcije upotrebom para univerzalnih prajmera ITS1/ITS4. Produkti PCR reakcije su razdvojeni elektroforezom u agaroznom gelu obojenom etidijum-bromidom na UV-transiluminatoru. Korišćen je marker (ladder) od 100 bp. Veličina dobijenih amplikona je bila očekivana, od oko 600 bp (Slika 7), čime je potvrđeno da je ekstrakcija uspeła i da izolovana DNK može da se koristi za dalja ispitivanja.



Slika 7. Vizuelizacija PCR produkata dobijenih upotrebom univerzalnih prajmera ITS1/ITS4 (kolone redom: Ladder - marker, 1 - TaB10, 2 - TaB10², 3 - KA13, 4 - R2G11², 5 - JGS3, 6 - JGS3², 7 - JGS3³, 8 - JGS3⁴, 9 - JF1¹, K - negativna kontrola, Ladder - marker, 10 - LjG/15/17, 11 - BV/4/17², 12 - ThJ4¹, 13 - TaB6², 14 - TaB12, 15 - HG3, 16 - HG8, 17 - JZ/13/17¹, 18 - TAV18¹, 19 - TvJ3)

6.4.2. Identifikacija prajmerima specifičnim za vrstu

Na osnovu dosadašnjih rezultata pretpostavljeno je da većina izolata pripada vrsti *F. avenaceum*, a da dva izolata pripadaju vrsti *F. graminearum*. Stoga su za molekularnu identifikaciju korišćeni prajmeri specifični za vrstu *F. avenaceum* FA-ITSF/FA-ITSR (Schilling et al., 1996). Nakon razdvajanja produkata dobijenih u PCR reakciji sa prajmerima FA-ITSF/FA-ITSR elektroforezom u agaroznom gelu i vizuelizacijom na UV transluminatoru potvrđeno je da 60 od ukupno 62 izolata iz kolekcije pripadalo vrsti *F. avenaceum*. Veličina amplicona je bila očekivane veličine 272 bp (Slika 8).

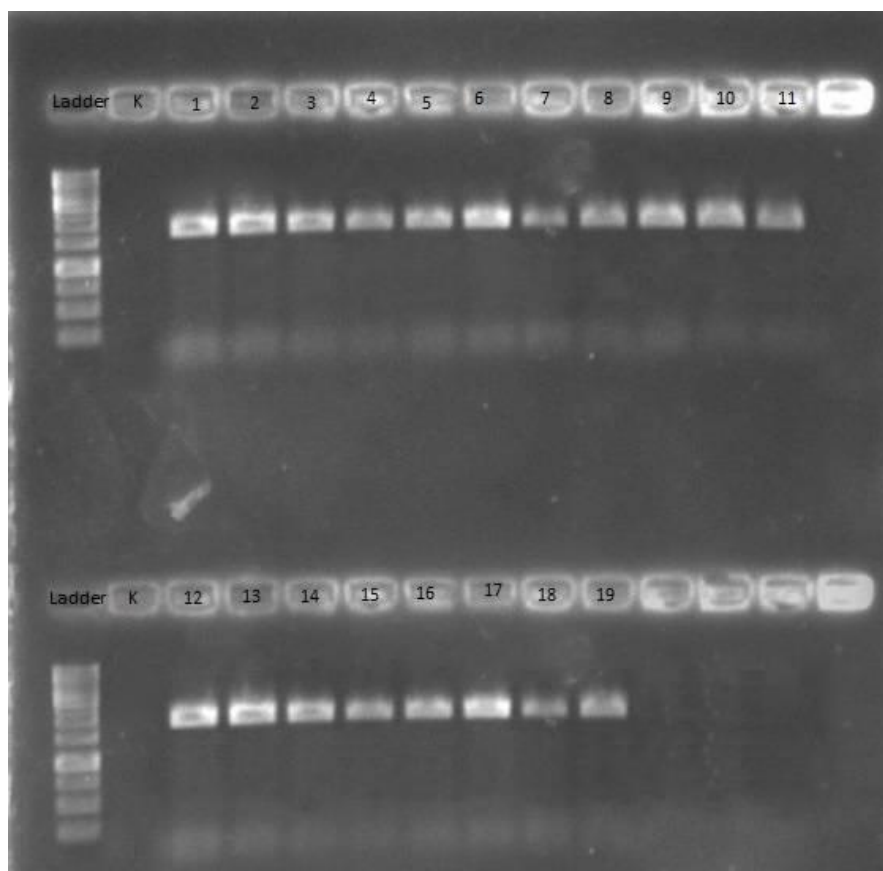


Slika 8. Vizuelizacija PCR produkata dobijenih primenom prajmera specifičnih za vrstu *Fusarium avenaceum* FA-ITSF/FA-ITSR (kolone redom: Ladder - marker, 1 - KA13, 2 - JGS3², 3 - TaB6², 4 - JGS3⁴, 5 - HG8, 6 - TaB12, 7 - ThJ4¹, 8 - HG3, 9 - TvJ3, 10 - JGS3, Ladder - marker)

U slučaju preostala dva izolata (TaB10 i TaB10²) nije došlo do umnožavanja željenog regiona, te je zaključeno da ne pripadaju vrsti *F. avenaceum*, kao što je i pretpostavljeno. Determinacija do nivoa vrste ova dva izolata je izvršena kasnije, nakon sekvenciranja amplicona dobijenih u PCR reakciji sa EF1/EF2 prajmerima.

6.4.3. Amplifikacija sekvence gena *TEF-1α*

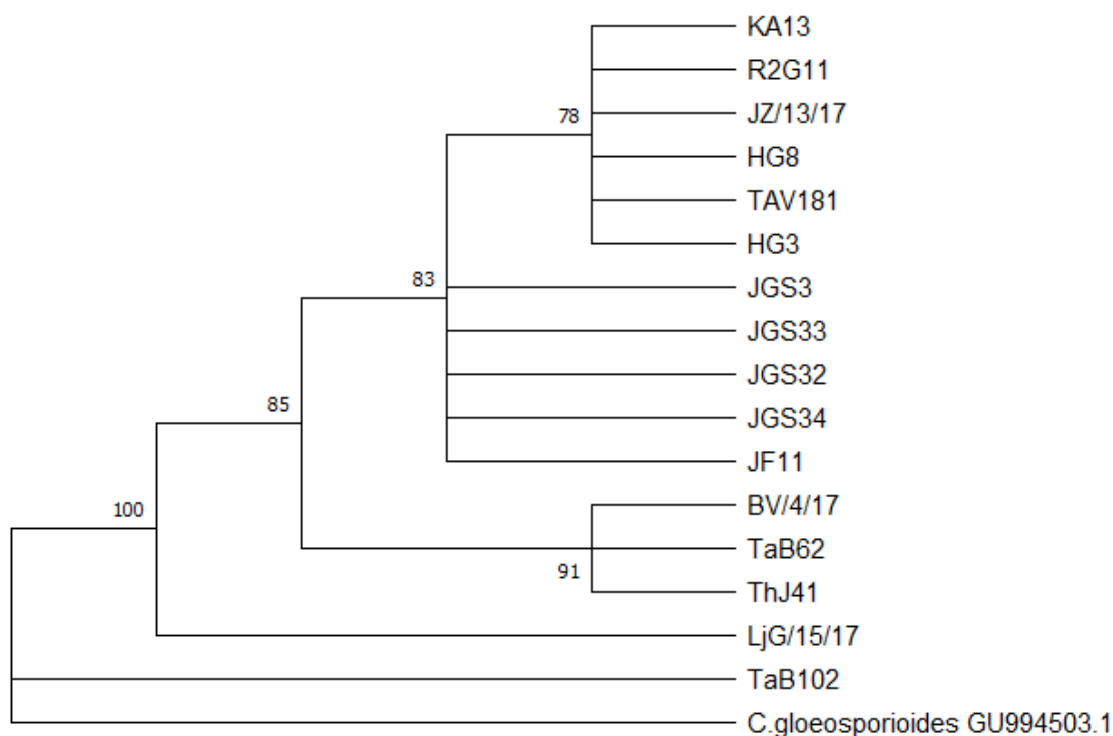
U PCR reakciji umnožavanja regiona *TEF-1α* korišćen je set prajmera EF1/EF2, opisani od strane O'Donnell et al. (1998). Ispitano je 19 izolata, od čega 17 izolata potvrđenih da pripadaju vrsti *F. avenaceum* i dva izolata za koja se pretpostavljalo da pripadaju vrsti *F. graminearum*. Nakon PCR reakcije i razdvajanja produkata elektroforezom, vizuelizacijom je ustanovljeno da su dobijeni amplikoni željene veličine od oko 700 bp kod svih ispitivanih izolata (Slika 9). Amplikoni su zatim poslani na uslužno sekvenciranje i dobijene sekvence su korišćene za izradu filogenetskog stabla.



Slika 9. Vizuelizacija PCR produkata dobijenih upotrebom prajmera EF1/EF2 (kolone redom: Ladder - marker, K - negativna kontrola, 1 - TaB10, 2 - TaB10², 3 - KA13, 4 - R2G11², 5 - JGS3, 6 - JGS3², 7 - JGS3³, 8 - JGS3⁴, 9 - JF1¹, 10 - LjG/15/17, 11 - BV/4/17², Ladder - marker, K - negativna kontrola, 12 - ThJ4¹, 13 - TaB6², 14 - TaB12, 15 - HG3, 16 - HG8, 17 - JZ/13/17¹, 18 - TAV18¹, 19 - TvJ3)

6.4.4. Filogenetska analiza

Filogenetskom analizom su obuhvaćene delimične nukleotidne sekvence dobijene amplifikacijom regiona *TEF-1 α* , i to sekvence 15 izolata *F. avenaceum* i jednog izolata *F. graminearum* iz kolekcije, dok je iz GenBank preuzeta sekvenca *C. gloeosporioides* (GU994503.1) kao outgroup. Filogenetska stabla su rekonstruisana pomoću metoda Maximum Likelihood i bootstrap analize u 1000 ponavljanja (Slika 10). Na osnovu filogenetskog stabla izrađenog primenom metode Maximum Likelihood dobijena je prosečna bootstrap vrednost 87,4%.



Slika 10. Filogenetsko stablo izrađeno primenom metode Maximum Likelihood na osnovu sekvence regiona *TEF-1 α* izolata *Fusarium avenaceum* i *Fusarium graminearum* sa bootstrap vrednostima u 1000 replikacija prikazanim na mestima grananja.

Analizom filogenetskog stabla se vidi jasno razdvajanje outgroup sekvence (*C. gloeosporioides* GU994503.1) od svih ispitivanih *Fusarium* izolata. Isto tako, izolat TaB10² (*F. graminearum*) se veoma jasno razdvaja od svih izolata *F. avenaceum*. Nadalje, izolati koji

pripadaju vrsti *F. avenaceum* se dele u dva klastera. Jedan klaster čini izolat LjG/15/17 a drugi klaster svi ostali izolati i deli se na dve grupe. Jednu grupu čine izolati ThJ4¹, TaB6² i BV/4/17¹, druga grupa se deli na podgrupu u kojoj se nalaze izolati KA13, R2G11², JZ/13/17, HG3, HG8 i TAV18¹, dok se unutar grupe, kao posebne podgrupe izdvajaju izolati JGS3, JGS3², JGS3³, JGS3⁴ i JF1¹.

Nadalje, poređenjem sekvenci 15 izolata vrste *F. avenaceum* utvrđena je velika međusobna sličnost. Većina izolata *F. avenaceum* se ne razlikuje među sobom, za neke je utvrđena razlika od dva do pet nukleotida, dok se sekvenca LjG/15/17 razlikuje za sedam do osam nukleotida od ostalih ispitivanih sekvenci *F. avenaceum*. Sa druge strane, izolat TaB10² (*F. graminearum*) veoma se razlikuje od svih ispitivanih izolata *F. avenaceum*. Dobijena razlika od oko 300 nukleotida između ispitivanih izolata *F. graminearum* i *F. avenaceum* podržava razdvajanje ovih izolata u različite vrste (Tabela 18).

Tabela 18. Genetička udaljenost ispitivanih izolata na nivou nukleotida

Izolat	HG8	JGS3	JGS3 ²	JGS3 ⁴	KA13	HG3	TaB6 ²	TaB10 ²	ThJ4 ¹	BV/4/17 ¹	JF1 ¹	JGS3 ³	JZ/13/17	LjG15/17	R2G11 ²	TAV18 ¹
HG8																
JGS3	2															
JGS3 ²	2	0														
JGS3 ⁴	2	0	0													
KA13	0	2	2	2												
HG3	0	2	2	2	0											
TaB6 ²	5	5	5	5	5	5										
TaB10 ²	301	300	300	300	301	301	300									
ThJ4 ¹	5	5	5	5	5	5	0	300								
BV/4/17 ¹	5	5	5	5	5	5	0	300	0							
JF1 ¹	2	0	0	0	2	2	5	300	5	5						
JGS3 ³	2	0	0	0	2	2	5	300	5	5	0					
JZ/13/17	0	2	2	2	0	0	5	301	5	5	2	2				
LjG15/17	8	8	8	8	8	8	7	299	7	7	8	8	8			
R2G11 ²	0	2	2	2	0	0	5	301	5	5	2	2	0	8		
TAV18 ¹	0	2	2	2	0	0	5	301	5	5	2	2	0	8	0	

BLAST analiza devet sekvenci *F. avenaceum* (HG8, JGS3, JGS3³, KA13, HG3, JF1¹, JZ/13/17, R2G11², TAV18¹) pokazala je 100% nukleotidne identičnosti sa velikim brojem izolata *F. avenaceum* iz različitih delova sveta: Poljske (KP674214, KP400709), Finske (JX402176), Velike Britanije (EU744840, KP964905), Francuske (JF278604), Švedske (MG674555, MG674546), Brazila (MK572765). Tri ispitivana izolata (BV/4/17¹, ThJ4¹, TaB6²) pokazala su najviši stepen nukleotidne identičnosti od 100% sa sekvencama *F. avenaceum* iz Poljske (KP674208) i Španije (KX215059), dok su sekvence JGS3², JGS3⁴ pokazale najviši stepen idnetičnosti od 100% sa sekvencama iz Francuske (JF278602, JF278600, JF278605),

Nemačke (MG674560, MG674559) i Kanade (KC999490). Sekvenca izolata LjG/15/17 pokazala je identičnost pd 99,8% sa sekvencama *F. avenaceum* iz Španije (KR002051, KR002063), Novog Zelanda (JN595824, JX398938) i SAD (MH582385). Sa druge strane, BLAST analiza sekvence izolata *F. graminearum* TaB10² pokazala je nukleotidnu identičnost veću od 99% sa velikim brojem izolata *F. graminearum* poreklom iz Poljske (KM052641, KP674201, MH572259), Holandije (JX118850), SAD (JF740867) i Kine (KY466690, KY466699).

6.5. Potencijal za sintezu mikotoksina izolata *Fusarium* spp.

Potencijal za proizvodnju mikotoksina je urađen pomoću ELISA testa. Inkubacioni period za razvoj izolata na AA podlozi i na veštački inokulisanim plodovima jabuke sorte Zlatni delišes je iznosio 14 dana. Ekstrakcijom mikotoksina iz micelije izolata gajenih na AA podlozi kod oba izolata *F. graminearum* utvrđene su koncentracije mikotoksina koje su bile preko granice detekcije. Kod većine izolata *F. avenaceum* nije detektovan ni jedan od testiranih mikotoksina, osim u slučaju dva izolata, gde je u niskim koncentracijama detektovan zearalenon (7,005 µg/kg) kod izolata HG3 i deoksinivalenol (0,020 g/kg) kod izolata JvZ8/18. Prilikom utvrđivanja koncentracije mikotoksina u suvim uzorcima veštački inokulisanih plodova jabuke rezultati su bili značajno drugačiji. Naime, zearalenon je detektovan u gotovo svim uzorcima, osim kod izolata KA12 i HG3. Koncentracija se kretala od 38,922 µg/kg do preko 1000 µg/kg u zdravim delovima plodova, odnosno od 37,016 do 199,007 µg/kg u trulim delovima plodova. Deoksinivalenol je detektovan jedino u uzorku inokulisanom sa TaB10 i to u koncentraciji 0,022 µg/g u zdravom delu ploda i 0,011 µg/g u trulom delu ploda (Tabela 19). Veoma je značajno istaći da je koncentracija detektovanih mikotoksina vrlo visoka, ne samo u trulom delu ploda, već je i u zdravom delu detektovana visoka koncentracija. Uočeno je da je kod izolata TaB12 izmerena koncentracija ZEA viša u zdravom (132,962 µg/kg), nego u trulom delu ploda (97,309 µg/kg).

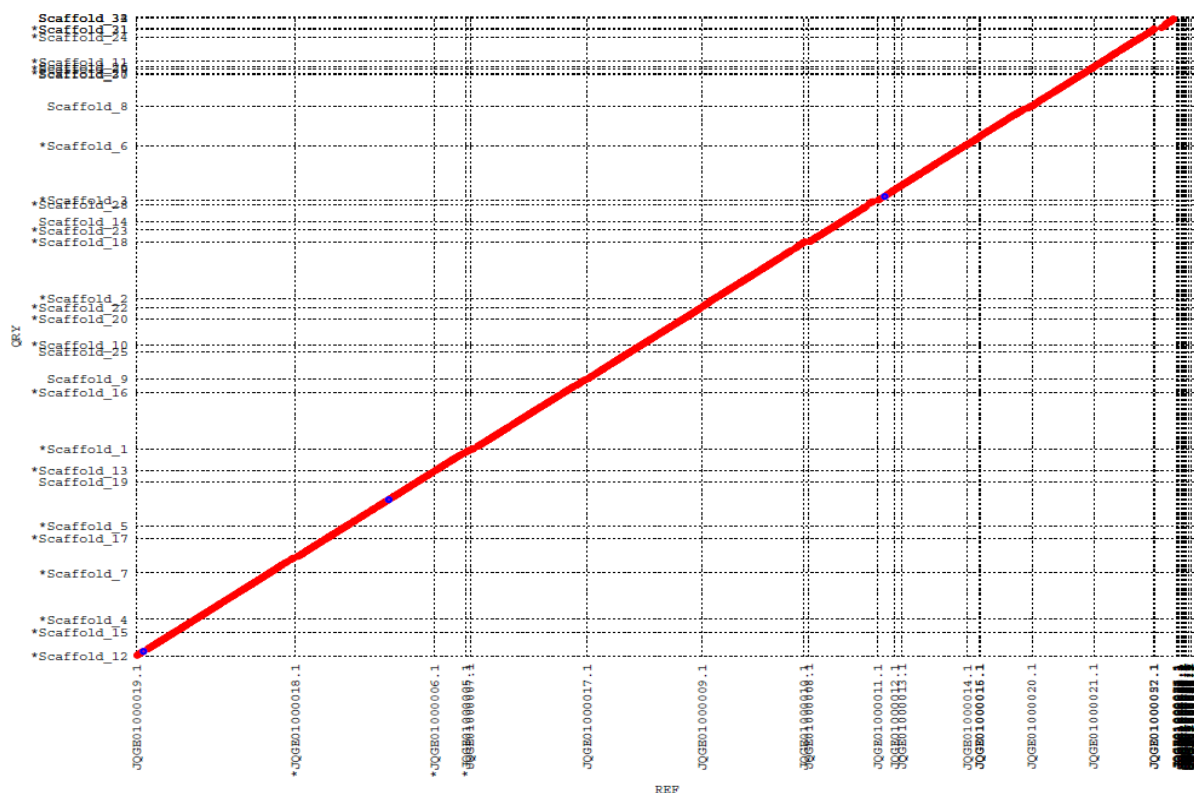
Tabela 19. Proizvodnja zearalenona (ZEA) i deoksinivalenola (DON) na podlozi od jabuke i na veštački inokulisanim plodovima

Ekstrakcija iz micelija na AA podlozi			Ekstrakcija iz ploda			
Izolat	Mikotoksin		Mikotoksin			
	ZEA (µg/kg)	DON (µg/g)	ZEA (µg/kg)		DON (µg/g)	
			Zdrav	Truo	Zdrav	Truo
TaB10	>1000	>1000	145,575	172,962	0,022	0,011
TaB10²	>1000	>1000	65,519	199,007	nije detektovano	nije detektovano
TaB6²	nije detektovano	nije detektovano	38,922	183,09	nije detektovano	nije detektovano
TaB12	nije detektovano	nije detektovano	132,962	97,309	nije detektovano	nije detektovano
LjG15/17	nije detektovano	nije detektovano	nije mereno			
TAV18¹	nije detektovano	nije detektovano	nije mereno			
JF1¹	nije detektovano	nije detektovano	nije mereno			
Bv4/17²	nije detektovano	nije detektovano	nije mereno			
JGS3²	nije mereno		39,685	99,448	nije detektovano	nije detektovano
JGS3³	nije detektovano	nije detektovano	97,384	nije detektovano	nije detektovano	nije detektovano
JZ13/17¹	nije detektovano	nije detektovano	nije mereno			
JvZ8/18	nije detektovano	0,020	nije mereno			
R2G11²	nije detektovano	nije detektovano	nije mereno			
KA12	nije mereno		nije detektovano	nije detektovano	nije detektovano	nije detektovano
KA13	nije detektovano	nije detektovano	46,991	67,658	nije detektovano	nije detektovano
HG8	nije detektovano	nije detektovano	189,649	37,016	nije detektovano	nije detektovano
HG3	7,005	nije detektovano	nije detektovano	nije detektovano	nije detektovano	nije detektovano
TvJ3	nije mereno		>1000	61,729	nije detektovano	nije detektovano
ThJ4¹	nije mereno		159,422	40,859	nije detektovano	nije detektovano

6.6. Procena potencijala za sintezu sekundarnih metabolita izolata *Fusarium* spp.

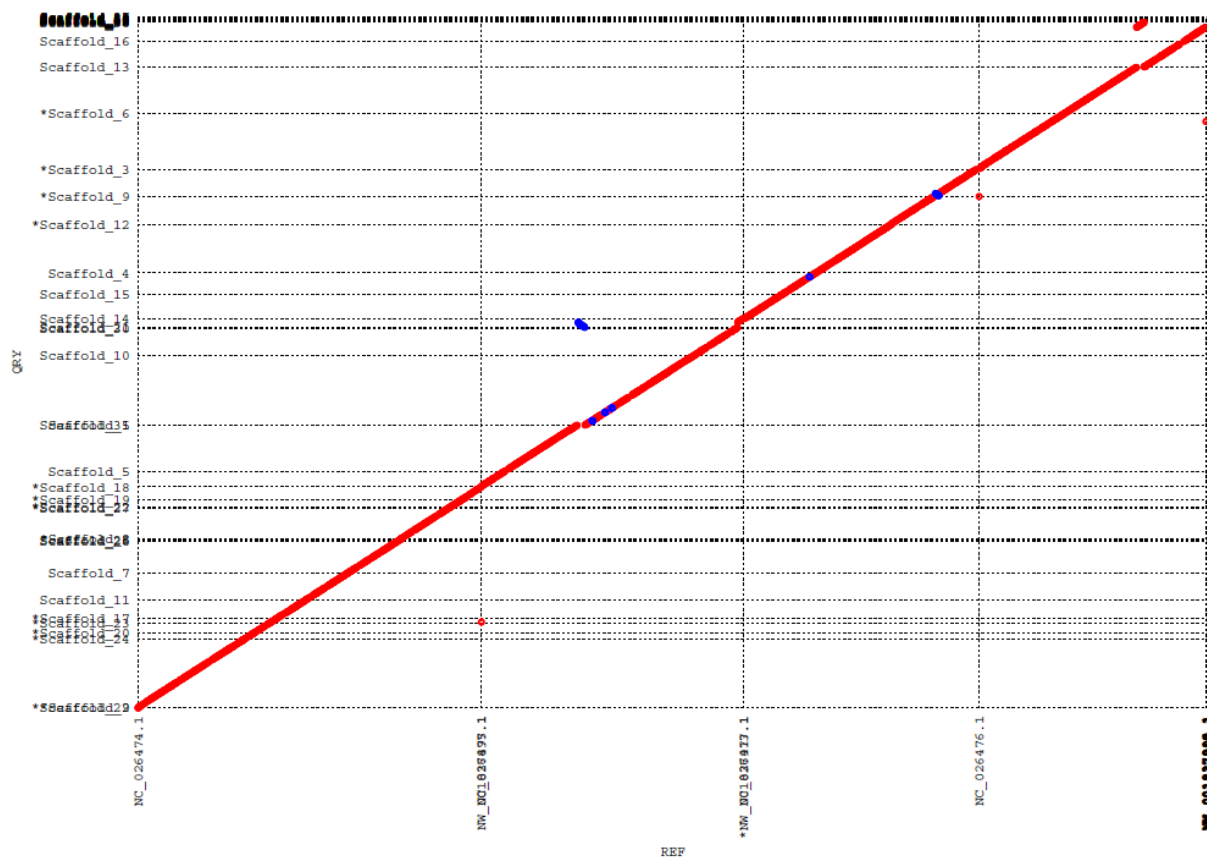
6.6.1. Sekvenciranje, sklapanje i anotacija celog genoma

Za sekvenciranje genoma je korišćen Illumina MiSeq sekvencer. Prosečan kvalitet po bazi za *F. avenaceum* je bio 35,56 sa dužinom čitanja od 35 do 301 bp, dok je u slučaju *F. graminearum* iznosio 35,61 sa istom dužinom čitanja. Pre započinjanja procesa sastavljanja genoma sekvence su trimovane kako bi se uklonili adapteri i poboljšao kvalitet. Kvalitet dobijenih genoma je nakon inicijalnog sklapanja nekoliko puta poboljšavan pre dobijanja konačnih verzija genoma. Konačna verzija genoma izolata KA13 (*F. avenaceum*) je bila dužine 41,7 Mb, sastavljena od 34 skafolda (N50 je iznosio 2,23 Mb, najveći skafold je bio dužine 3,71 Mb) sa GC sadržajem od 48,47% i pokrivenošću od 113x. Poravnanje genoma izolata KA13 sa genomom referentnog izolata FaLH27 prikazan je na Slici 11.



Slika 11. Grafički prikaz poravnanja genoma izolata KA13 (*Fusarium avenaceum*) sa genomom referentnog izolata FaLH27. Softver MUMmer 3.23 je korišćen za poravnavanje.

U slučaju genoma izolata TaB10 (*F. graminearum*), krajnja verzija je bila dužine 36,76 Mb (N50 je iznosio 1,67 Mb, najveći skafold je bio dužine 3,68 Mb), sastavljena od 54 skafolda sa GC sadržajem od 48,3% i pokrivenošću od 100x. Poravnanje genoma izolata TaB10 sa genomom referentnog izolata PH-1 prikazan je na Slici 12.



Slika 12. Grafički prikaz poravnanja genoma izolata TaB10 (*Fusarium graminearum*) sa genomom referentnog izolata PH-1. Softver MUMmer 3.23 je korišćen za poravnavanje.

Pomoću alata AUGUSTUS je urađena predikcija potencijalnog broja gena. Za genom *F. avenaceum* taj broj iznosio je 16067, dok je za genom *F. graminearum* iznosio 14327 gena. Sekvence celih genoma su deponovane u bazi podataka GenBank pod brojem JABCRA000000000 (*F. avenaceum*), odnosno JABCRB000000000 (*F. graminearum*). Illumina sekvence su deponovane u NCBI Sequence Read Archive (SRA) i dostupne su pod pristupnim brojem SRR11662100 za *F. avenaceum*, odnosno SRR11665916 za *F. graminearum*.

6.6.2. Predikcija potencijala za sintezu sekundarnih metabolita

S obzirom da dva softvera SMURF i antiSMASH, koji su korišćeni za predikciju klastera gena za sintezu sekundarnih metabolita, identifikuju različit broj i različite klase backbone gena, dobijeni su različiti rezultati. U slučaju *F. avenaceum* ukupan broj klastera gena otkriven pomoću softvera SMURF je 39, dok je taj broj otkriven pomoću antiSMASH 59 klastera. Kod *F. graminearum* taj broj je sledeći: 27 klastera gena je otkriveno pomoću softvera SMURF, a 44 pomoću antiSMASH softvera. Tipovi backbone enzima dati su u Tabeli 20.

Tabela 20. Predikcija backbone gena u genomima *Fusarium avenaceum* i *Fusarium graminearum* pomoću softvera SMURF i antiSMASH

<i>Fusarium avenaceum</i>			<i>Fusarium graminearum</i>		
Klasa backbone gena	Softver		Klasa backbone gena	Softver	
	SMURF	antiSMASH		SMURF	antiSMASH
DMAT	4	0	DMAT	0	0
PKS	19	18	PKS	15	14
PKS-like	2	0	PKS-like	1	0
NRPS	16	24	NRPS	11	14
NRPS-like	11	9	NRPS-like	12	9
Hybrid	2	5	Hybrid	0	1
Terpene	0	14	Terpene	0	13
Betalactone	0	2	Betalactone	0	1
Indole	0	4	Indole	0	0
Siderophore	0	0	Siderophore	0	1
CDPS	0	0	CDPS	0	1
UKUPNO	54	76	UKUPNO	39	54

Rezultati ukazuju na različitu predikciju broja i vrste ključnih gena u zavisnosti od toga koji softver je korišćen. Naime, analizom PKS (poliketid sintaze) gena, SMURF softverom je identifikovano 19 PKS, 2 PKS-like i 2 hibridna PKS-NPRS (hibrid poliketid sintaze i neribozomalne peptid sintaze) gena, dok je antiSMASH identifikovao 18 PKS i 5 hibridnih PKS-NPRS gena u genomu *F. avenaceum*. U slučaju genoma *F. graminearum* pomoću SMURF softvera je identifikovano 15 PKS gena i jedan PKS-like gen, dok je pomoću antiSMASH identifikovano 14 PKS gena i jedan hibridni PKS-NPRS gen. Oba programa su identifikovala jedinstvene gene koji nisu identifikovani pomoću drugog programa i to je zabeleženo kod oba genoma. U genomu *F. avenaceum* softverom SMURF je identifikovan gen g2993 kao PKS-like protein-kodirajući gen. Međutim, proverom konzerviranih domena otkriveno je da ovaj gen kodira protein tipa beta-ketoacil-ACP sintaza II. Softverom antiSMASH identifikovan je gen

g2594 kao jedinstveni PKS gen u genomu, dok softverom SMURF ovaj gen nije identifikovan. Proverom domena utvrđeno je da je ovo halkon i stilben sintaza (CHS) kodirajući gen. Nakon NCBI BLAST poravnanja utvrđena je podudarnost od 92,39% između gena g2594 i gena FAVG1_04458 koji je ranije opisan kao PKS kodirajući gen od strane nekoliko autora (Brown and Proctor, 2016; Lysøe et al., 2014). Nakon provere konzerviranih domena utvrđeno je da je i ovaj gen kodirajući za halkon i stilben sintazu (CHS). U genomu *F. graminearum* gen g4187 identifikovan je kao PKS-like samo pomoću softvera SMURF, međutim proverom konzerviranih domena utvrđeno je da je to beta-ketoacil-ACP sintaza II kodirajući gen. Softverom antiSMASH je gen g5573 identifikovan kao jedinstveni PKS gen, međutim, proverom domena utvrđeno je da je taj gen, slično kao i u genomu *F. avenaceum*, halkon i stilben sintaza (CHS) kodirajući gen. Gen g4900 je identifikovan softverom SMURF kao PKS kodirajući gen, dok je pomoću softvera antiSMASH identifikovan kao PKS-NRPS hibridni gen. Proverom domena utvrđeno je da taj gen jeste PKS-NRPS hibridni gen.

6.7. Biološke i fizičke mere zaštite plodova jabuke od *Fusarium* spp.

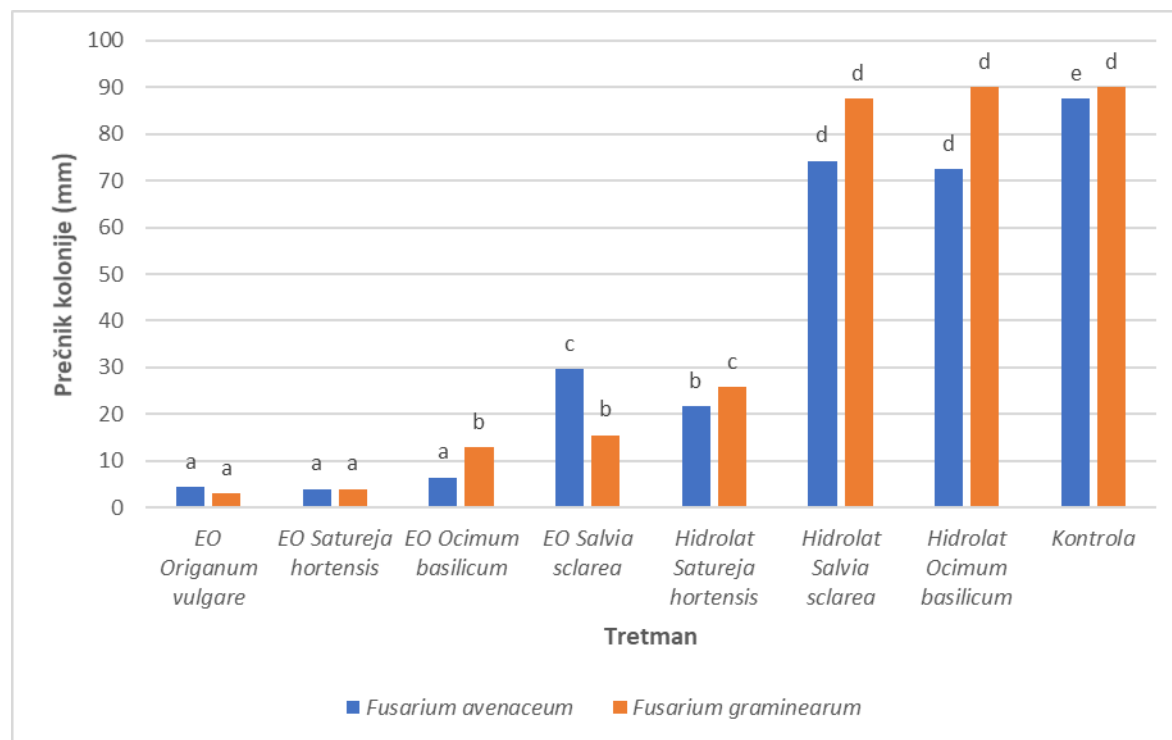
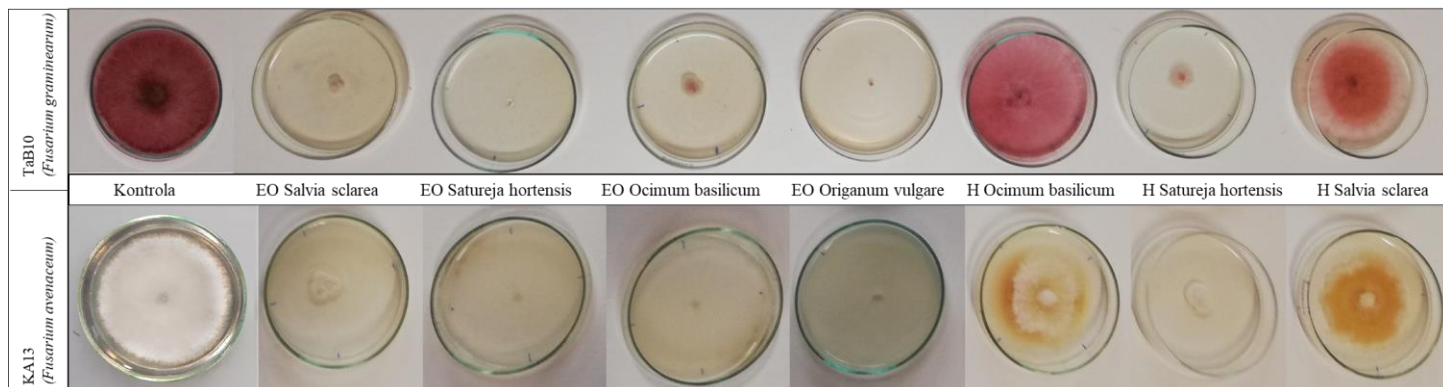
6.7.1. Uticaj etarskih ulja i hidrolata etarskih ulja različitih biljaka na fuzarioznu trulež ploda jabuke

6.7.1.1. Uticaj etarskih ulja i hidrolata etarskih ulja različitih biljaka na *Fusarium* spp. *in vitro*

Uticaj etarskih ulja i hidrolata etarskih ulja ispitan je u ogledu *in vitro* na hranljivoj PDA podlozi. Dobijeni rezultati (Grafikon 5) ukazuju na značajne razlike u inhibitornom dejstvu koje su ispoljila ispitivana etarska ulja i njihovi hidrolati. Kod oba izolata (KA13 i TaB10) zabeleženo je da su sva testirana etarska ulja (*O. vulgare*, *S. hortensis*, *O. basilicum* i *S. sclarea*) ispoljila veoma snažno inhibitorno dejstvo na izolate obe vrste u odnosu na kontrolu. Posmatrajući zbirno etarska ulja i hidrolate, inhibitorno dejstvo etarskih ulja je mnogo jače u odnosu na dejstvo hidrolata etarskih ulja, izuzev hidrolata etarskog ulja *S. hortensis*. Naime, iako je inhibitorno dejstvo hidrolata ovog etarskog ulja bilo na statističko značajno nižem nivou u poređenju sa dejstvom etarskih ulja, ono je ipak bilo značajno jače u odnosu na inhibitorno dejstvo preostala

dva hidrolata etarskih ulja. Hidrolati etarskih ulja *S. sclarea* i *O. basilicum* nisu ispoljili statistički značajnije inhibitorno dejstvo u odnosu na kontrolu u slučaju izolata TaB10, dok je u slučaju izolata KA13 inhibicija, iako statistički značajna u odnosu na kontrolu, bila daleko slabija u odnosu na etarska ulja i hidrolat etarskog ulja *S. hortensis* (Slika 13).

Slika 13. Uticaj etarskih ulja i njihovih hidrolata na razvoj kolonija izolata *Fusarium avenaceum* i *Fusarium graminearum* na hranljivoj podlozi



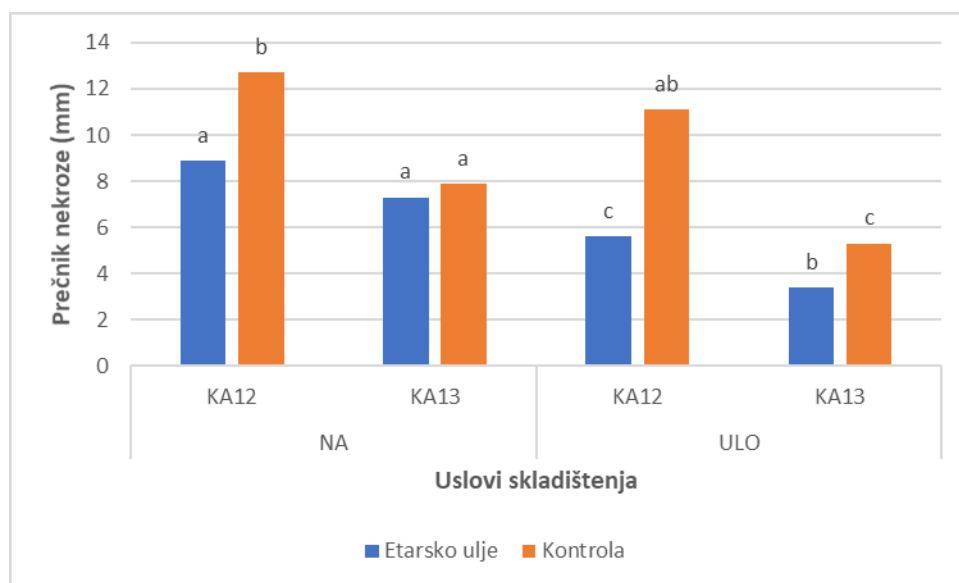
Grafikon 5. Uticaj etarskih ulja i njihovih hidrolata na razvoj kolonija izolata *Fusarium avenaceum* i *Fusarium graminearum* na hranljivoj podlozi

*Stubovi obeleženi različitim slovima se statistički značajno razlikuju

Kompletna inhibicija razvoja micelije je zabeležena u tretmanu sa etarskim uljem divljeg origana kod izolata obe vrste. Isečci micelije iz tih tretmana su prenesni na PDA podlogu u Petri kutije bez dodavanja etarskog ulja kako bi se utvrdilo da li je dejstvo fungistatično ili fungicidno. Nakon dodatna tri dana inkubacije nije zabeležen porast micelije izolata, te se može smatrati da je etarsko ulje divljeg origana ispoljilo fungicidino dejstvo.

6.7.1.2. Uticaj etarskog ulja divljeg origana (*Origanum vulgare*) na fuzarioznu trulež ploda jabuke pri različitim uslovima skladištenja

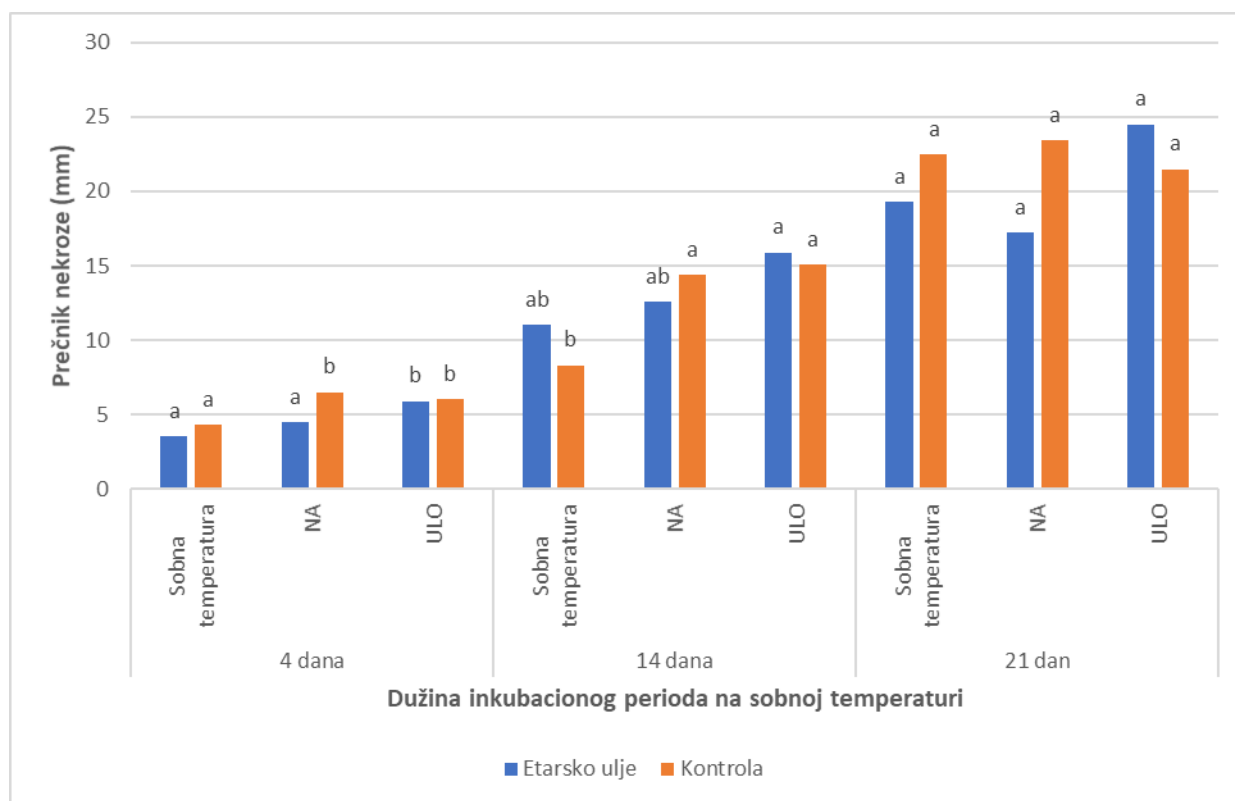
Tokom tromesečnog skladištenja u hladnjačama pri različitim uslovima izolati KA12 i KA13 (*F. avenaceum*) su prouzrokovali razvoj truleži na veštački inokulisanim plodovima bez obzira da li je tretman etarskim uljem primenjen ili ne. Kod izolata KA12 zabeležena je statistički značajna razlika između tretmana i netretirane kontrole nezavisno od tipa hladnjače, dok je u slučaju izolata KA13 razlika između tretmana i kontrole na statistički značajnom nivou bila samo u slučaju skladištenja u uslovima kontrolisane atmosfere (Grafikon 6).



Grafikon 6. Uticaj etarskog ulja divljeg origana na razvoj nekroze na veštački inokulisanim plodovima izolatima vrste *Fusarium avenaceum* nakon tromesečnog perioda čuvanja u hladnjači sa normalnom atmosferom (NA) i u hladnjači sa veoma niskim sadržajem kiseonika (ULO)

*Stubovi obeleženi različitim slovima se statistički značajno razlikuju

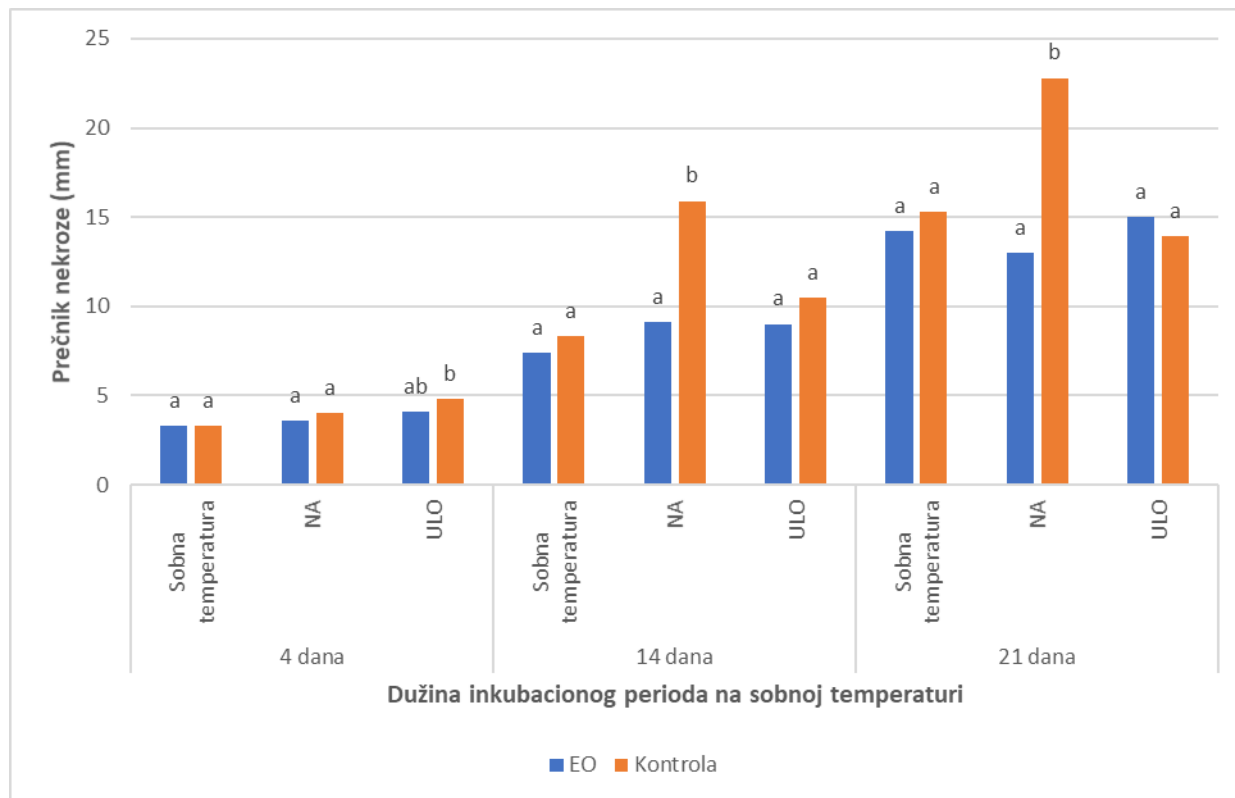
Nakon iskladištenja, plodovi su dodatno inkubirani na sobnoj temperaturi. U isto vreme postavljen je ogled sa inokulisanim plodovima jabuke koji su inkubirani na sobnoj temperaturi bez prethodnog čuvanja u hladnjači. Merenje prečnika razvijene nekroze je izvršeno nakon 4, 14 i 21 dan (Grafikon 7). U slučaju izolata KA12 samo je prilikom skladištenja u NA hladnjači razvijeni prečnik bio značajno manji u tretmanu u poređenju sa kontrolom nakon četiri dana inkubacije na sobnoj temperaturi. Nakon 14 dana inkubacije na sobnoj temperaturi samo je u slučaju NA hladnjače zabeležen manji prečnik razvijene nekroze kod tretiranih plodova, dok je u slučaju ULO hladnjače i plodova čuvanih na sobnoj temperaturi prečnik nekroze kod plodova u tretmanu bio veći u poređenju sa kontrolnom varijantom. Na kraju oglada, nakon 21 dan dodatne inkubacije kod plodova inkubiranih samo na sobnoj temperaturi i onih prethodno skladištenih u NA hladnjači zabeležen je manji prečnik u tretmanu, međutim, razlika nije bila statistički značajna.



Grafikon 7. Uticaj etarskog ulja divljeg origana na razvoj nekroze na veštački inokulisanim plodovima izolatom KA12 (*Fusarium avenaceum*) tokom dodatne inkubacije na sobnoj temperaturi

*Stubovi obeleženi različitim slovima se statistički značajno razlikuju

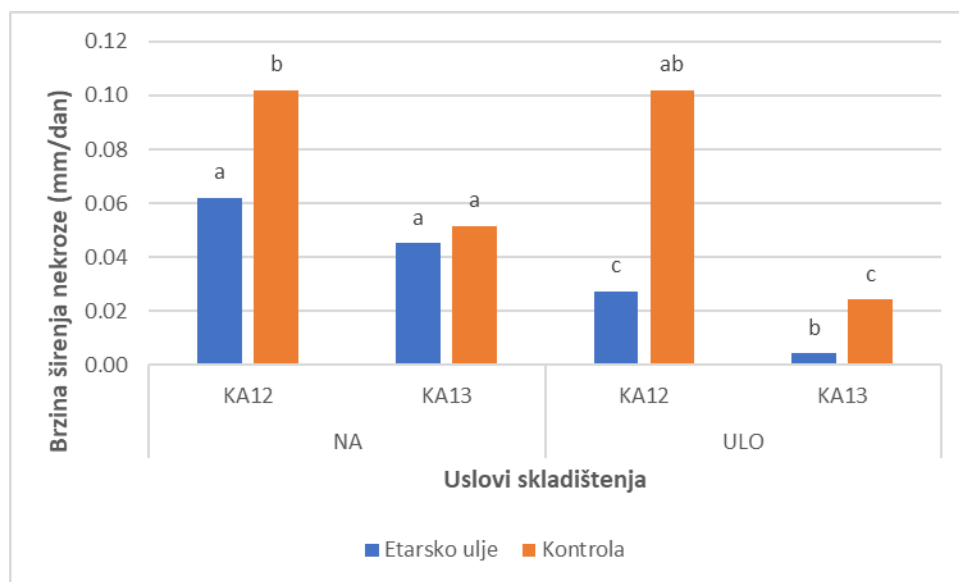
U slučaju izolata KA13 nakon četiri dana inkubacije na sobnoj temperaturi najveći prečnik nekroze zabeležen je na plodovima čuvanim u ULO hladnjači, dok u slučaju plodova čuvanih na sobnoj temperaturi i u NA hladnjači razlika između prečnika nekroze razvijene na tretiranim i netretiranim plodovima nije bila statistički značajna. Nakon 14 i 21 dan inkubacije prečnik nekroze koji se razvio na kontrolnim plodovima čuvanim u NA hladnjači bio je značajno veći u poređenju sa prečnikom na tretiranim plodovima, ali i u poređenju sa prečnicima nekroze razvijenim na plodovima čuvanim u ULO hladnjači, kao i onima na sobnoj temperaturi. Međutim, razlika između prečnika nekroze na tretiranim i netretiranim plodovima čuvanim u ULO hladnjači i na sobnoj temperaturi nije bila statistički značajna nakon 14 i 21 dan inkubacije (Grafikon 8).



Grafikon 8. Uticaj etarskog ulja divljeg origana na razvoj nekroze na veštački inokulisanim plodovima izolatom KA13 (*Fusarium avenaceum*) tokom dodatne inkubacije na sobnoj temperaturi

*Stubovi obeleženi različitim slovima se statistički značajno razlikuju

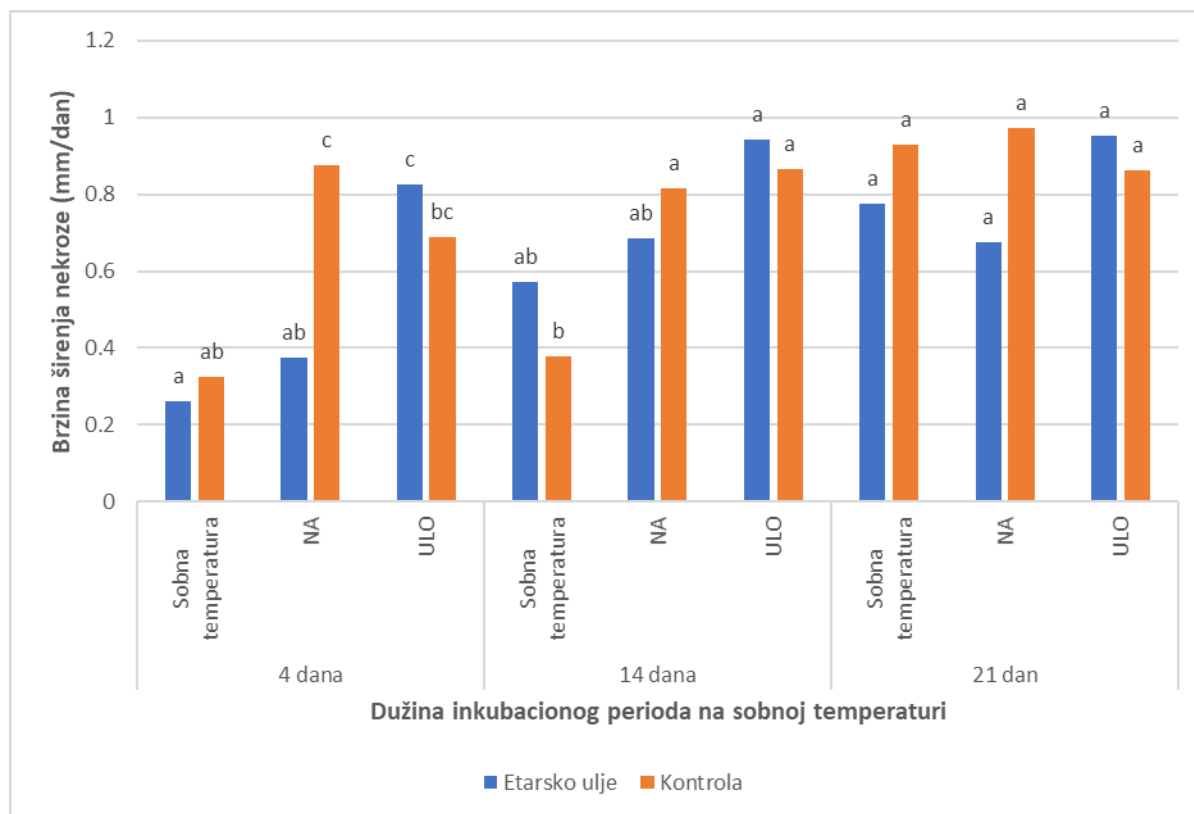
Tokom oglada je praćena i brzina razvoja nekroze. Nakon perioda skladištenja u hladnjaćama uočene su statistički značajne razlike u brzini razvoja nekroze kod plodova u varijanti sa etarskim uljem i u kontrolnoj varijanti u obe vrste hladnjaće kod izolata KA12, dok je u slučaju izolata KA13 ta razlika statistički značajna kod plodova čuvanih u ULO hladnjaći (Grafikon 9).



Grafikon 9. Brzina razvoja nekroze na veštački inokulisanim plodovima tokom tromesečnog perioda skladištenja pri različitim uslovima

*Stubovi obeleženi različitim slovima se statistički značajno razlikuju

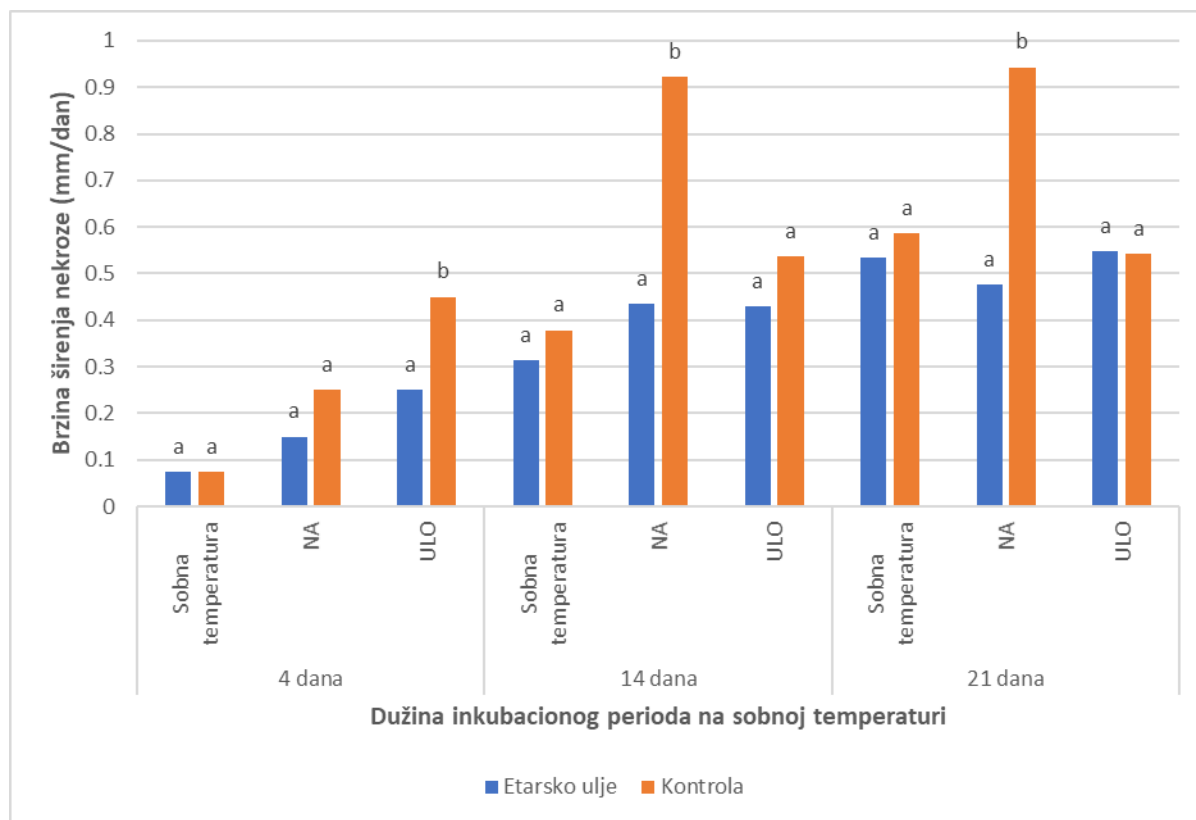
Nakon četiri dana dodatne inkubacije na sobnoj temperaturi u slučaju izolata KA12 inhibitorni uticaj etarskog ulja je bio značajan samo kod plodova čuvanih u NA hladnjaći. Nakon 14 dana inkubacije uočeno je da se brzina razvoja nekroze povećala u odnosu na prethodno merenje, pogotovo u varijanti sa etarskim uljem, te je samo u slučaju plodova čuvanih u NA hladnjaći zabeležena manja brzina razvoja nekroze u poređenju sa kontrolnom varijantom, premda razlika nije bila statistički značajna. Nakon 21 dana inkubacije na sobnoj temperaturi primećen je rast brzine razvoja u kontrolnoj varijanti bez obzira na prethodne uslove čuvanja, međutim, razlika između brzine razvoja nekroze u varijanti sa etarskim uljem i kontroli nije bila statistički značajna (Grafikon 10).



Grafikon 10. Uticaj etarskog ulja divljeg origana na brzinu razvoja nekroze na veštački inokulisanim plodovima izolatom KA12 (*Fusarium avenaceum*) tokom dodatne inkubacije na sobnoj temperaturi

*Stubovi obeleženi različitim slovima se statistički značajno razlikuju

U slučaju izolata KA13 nakon četiri dana inkubacije na sobnoj temperaturi zabeleženo je da statistički značajna razlika u brzini razvoja nekroze između kontrole i tretmana postoji samo kod plodova čuvanih u ULO hladnjači. Nakon 14 dana uočava se da brzina razvoja nekroze raste nezavisno od prethodnih uslova skladištenja i tretmana, sa tim da je primećeno da je brzina razvoja manja kod tretiranih plodova i da statistički značajna razlika između tretmana i kontrolne varijante postoji samo kod plodova čuvanih u NA hladnjači. Gotovo identična situacija je zabeležena i nakon 21 dan inkubacije na sobnoj temperaturi (Grafikon 11).



Grafikon 11. Uticaj etarskog ulja divljeg origana na brzinu razvoja nekroze na veštački inokulisanim plodovima izolatom KA13 (*Fusarium avenaceum*) tokom dodatne inkubacije na sobnoj temperaturi

*Stubovi obeleženi različitim slovima se statistički značajno razlikuju

6.7.2. Uticaj bioloških agenasa *Bacillus* spp. i *Streptomyces hygroscopicus* na *Fusarium* spp.

6.7.2.1. Uticaj bioloških agenasa *Bacillus* spp. i *Streptomyces hygroscopicus* na *Fusarium* spp. *in vitro*

Rezultati statističke obrade *in vitro* ogleda ukazuju da oba faktora, primenjeni tretmani i izolat, jesu značajan izvor variranja prečnika kolonije (Tabela 21).

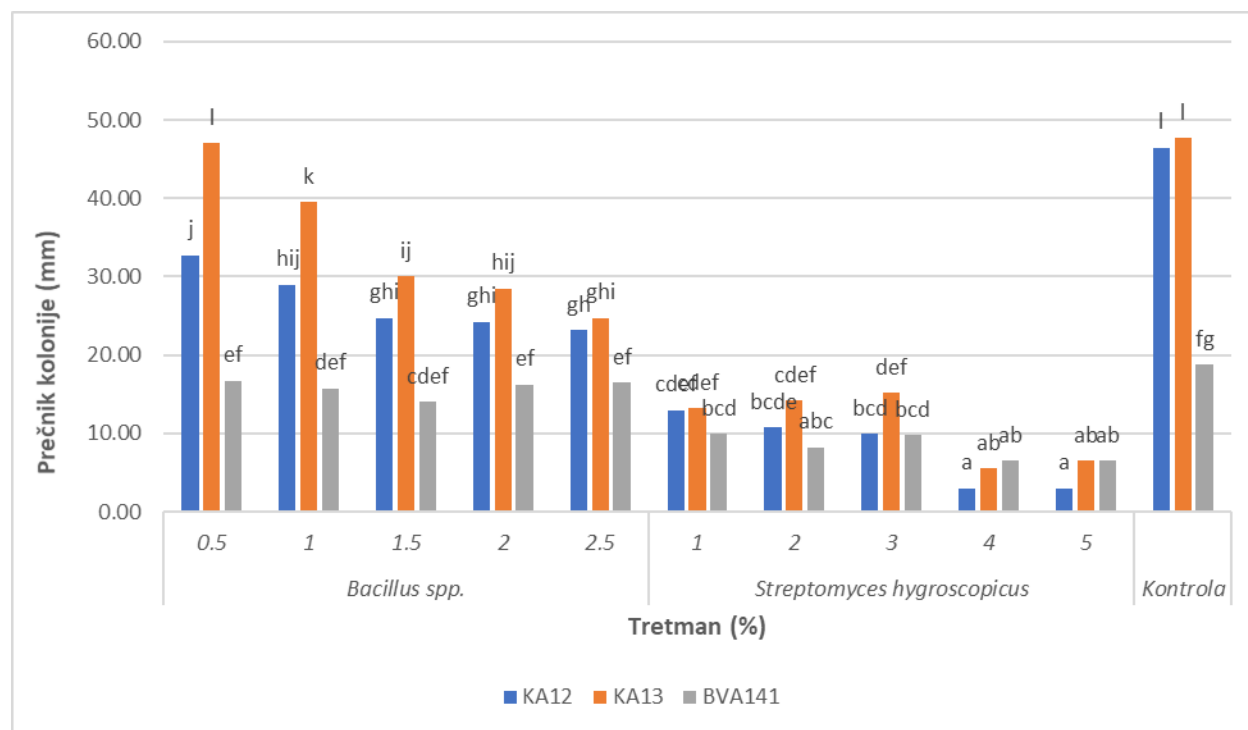
Tabela 21. Dvofaktorijalna analiza varijanse: Uticaj tretmana biološkim agensima *Bacillus* spp. i *Streptomyces hygroscopicus* i izolata na porast prečnika micelije *Fusarium avenaceum* nakon sedam dana

Izvori varijacije	Suma kvadrata	Stepeni slobode	Sredina kvadrata	F-odnos	Nivo značajnosti
	SS	Df	MS	F	p
Tretman	14265,21	10	1426,52	281,33	0,00
Izolat	3280,14	2	1640,07	323,44	0,00
Tretman*Izolat	3066,20	20	153,31	30,23	0,00
Greška	502,0	99	5,07		

Dobijeni rezultati ukazuju da preparat na bazi *Bacillus* spp. i metaboliti *S. hygroscopicus* statistički značajno inhibiraju porast *F. avenaceum* u odnosu na kontrolu, nezavisno od izolata. Primenom metabolita *S. hygroscopicus* pri koncentraciji 4 i 5% u slučaju izolata KA12 uočena je najjača inhibicija porasta micelije, dok razlike u ispoljenoj inhibiciji između ove dve koncentracije nisu bile značajne. Značajno slabija, ali, u odnosu na kontrolu, značajna inhibicija uočena je primenom metabolita *S. hygroscopicus* u koncentracijama 1, 2 i 3%. Razlike između primenjenih koncentracija nisu bile značajne. U slučaju primene preparata na bazi *Bacillus* spp. je uočena značajna inhibicija porasta micelije izolata KA12 u odnosu na netretiranu kontrolu, ali je ipak inhibicija bila statistički značajno slabija u poređenju sa primenom metabolita *S. hygroscopicus*, nezavisno od primenjene koncentracije. Primenom preparata na bazi *Bacillus* spp. u koncentracijama 1,5, 2 i 2,5% uočena je najjača inhibicija porasta kolonije izolata KA12, dok razlike između njih nisu bile statistički značajne.

Primena metabolita *S. hygroscopicus* u svim koncentracijama izazvala je značajnu inhibiciju porasta izolata KA13 u odnosu na kontrolu, pri čemu je najjača inhibicija uočena pri koncentracijama 4 i 5%. Inhibicija koja je uočena primenom metabolita u koncentraciji 1, 2 i 3%, iako slabija u odnosu na 4 i 5%, bila je statistički značajnija u poređenju sa inhibicijom koja je zabeležena primenom preparata na bazi *Bacillus* spp. Primenom ovog preparata najjača inhibicija je uočena pri primeni u koncentraciji 1,5, 2 i 2,5%, dok razlike između njih nisu bile statistički značajne. Takođe, primenom preparata u koncentraciji 0,5% nije zabeleženo inhibirajuće dejstvo na porast micelije, te razlike u odnosu na kontrolu nisu statistički značajne.

U slučaju izolata BVA14¹, primenom metabolita *S. hygrosopicus* ispoljena je značajna inhibicija u odnosu na kontrolu, dok razlike između primenjenih koncentracija nisu bile statistički značajne. Primenom preparata na bazi *Bacillus* spp., nezavisno od primenjene koncentracije, nije uočena statistički značajna inhibicija porasta micelije, u odnosu na kontrolu (Grafikon 12).



Grafikon 12. Prečnik kolonija (mm) izolata *Fusarium avenaceum* sedam dana nakon tretmana sa biološkim agensima *Bacillus* spp. i *Streptomyces hygrosopicus*

*Stubovi obeleženi različitim slovima se statistički značajno razlikuju

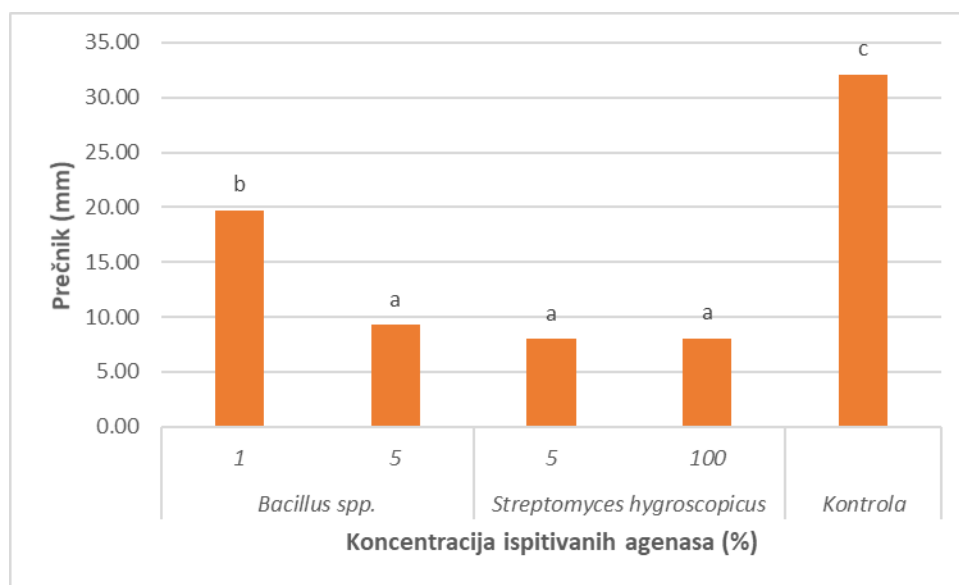
6.7.2.2. Uticaj bioloških agenasa *Bacillus* spp. i *Streptomyces hygrosopicus* na *Fusarium* spp. *in vivo*

U *in vivo* ogledu ispitan je uticaj bioloških agenasa na razvoj nekroze prouzrokovane izolatom JGS3³ (*F. avenaceum*) na plodovima sorte Zlatni delišes. Jednofaktorijalnom analizom varijanse utvrđeno je da biološki agensi predstavljaju značajan izvor variranja prečnika nekroze (Tabela 22).

Tabela 22. Jednofaktorijalna analiza varijanse: Uticaj *Bacillus* spp. i *Streptomyces hygroscopicus* na razvoj nekroze na plodovima jabuke sorte Zlatni delišes nakon 10 dana

Izvori varijacije	Suma kvadrata	Stepeni slobode	Sredina kvadrata	F-odnos	Nivo značajnosti
	SS	Df	MS	F	p
Tretman	5452.14	5	1090.43	46.97	0.00
Greška	1717.81	74	23.21		

Ispitivani agensi su nezavisno od koncentracije primene, značajno inhibirali razvoj nekroze na plodovima jabuke (Grafikon 13). Najjača inhibicija postignuta je primenom preparata na bazi *Bacillus* spp. u koncentraciji 5%, kao i obe testirane koncentracije metabolita *S. hygroscopicus*. Primenjen u koncentraciji 1%, preparat na bazi *Bacillus* spp. značajno je inhibirao razvoj nekroze u odnosu na kontrolu, međutim, ova inhibicija je bila značajno slabija u poređenju sa višom primenjenom koncentracijom ovog agensa, ali i u odnosu na obe koncentracije metabolita *S. hygroscopicus*. U negativnoj kontroli nije došlo do razvoja simptoma.

Grafikon 13. Prečnik nekroze (mm) razvijene na plodovima jabuke sorte Zlatni delišes deset dana nakon tretmana sa biološkim agensima *Bacillus* spp. i *Streptomyces hygroscopicus*

*Stubovi obeleženi različitim slovima se statistički značajno razlikuju

6.7.3. Uticaj biološkog agensa *Bacillus velezensis* na *Fusarium* spp.

6.7.3.1. Uticaj biološkog agensa *Bacillus velezensis* na *Fusarium* spp. *in vitro*

Na osnovu dobijenih rezultata u ogledu *in vitro* biološki agens *B. velezensis* je ispoljio značajno inhibitorno dejstvo na testirane izolate KA12, JF1¹, HG3 (*F. avenaceum*) i TaB10 (*F. graminearum*), nezavisno od koncentracije primene. Najjače inhibitorno dejstvo je zabeleženo pri primeni biološkog agensa u koncentraciji od 10% kod svih izolata. Značajna inhibicija, u poređenju sa kontrolom, ostvarena je primenom agensa u koncentraciji 1%, međutim ova inhibicija je bila značajno slabija u poređenju sa najvišom primenjenom koncentracijom od 10%. Primenom biološkog agensa *B. velezensis* u koncentracijama 2% i 5% razlika između inhibitornog efekta ovih koncentracija nije statistički značajna ili uopšte ne postoji. To je vrlo značajan podatak, s obzirom da je ostvaren isti efekat i sa značajno nižom koncentracijom (Tabela 23).

Tabela 23. Uticaj *Bacillus velezensis* na razvoj izolata *Fusarium avenaceum* i *Fusarium graminearum* na hranljivoj podlozi nakon sedam dana inkubacije

Tretman	Prečnik kolonije (mm) ± Sd			
	TAB10	KA12	JF1 ¹	HG3
B 1%	22,75 ± 2,22 hi	18,25 ± 0,50 def	19,50 ± 0,58 efh	20,75 ± 0,50 fh
B 2%	25,50 ± 2,38 i	15,75 ± 0,50 cde	14,00 ± 1,41 bcd	11,00 ± 6,68 ab
B 5%	25,00 ± 0,82 i	16,75 ± 2,75 def	14,50 ± 1,29 bcd	9,00 ± 1,83 a
B 10%	18,00 ± 0,82 def	12,25 ± 2,63 abc	9,25 ± 0,50 a	12,00 ± 2,45 ab
Kontrola	94,00 ± 0,00 l	81,50 ± 0,58 k	56,75 ± 7,18 j	90,75 ± 3,95 l

*Vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju; Sd – standardna devijacija

6.7.3.2. Uticaj biološkog agensa *Bacillus velezensis* na *Fusarium* spp. *in vivo*

U *in vivo* ogledu ispitan je uticaj biološkog agensa na razvoj nekroze prouzrokovane izolatom KA12 (*F. avenaceum*) u dve najviše koncentracije (5 i 10%) iz *in vitro* ogleda kod kojih je zabeležen najjači inhibitorni efekat. Rezultati ovog ogleda (Tabela 24) ukazuju da je ispitivani agens ispoljio značajan inhibitorni efekat na razvoj nekroze na plodovima jabuke, nezavisno od koncentracije primene. Takođe, zapažen je veoma značajan rezultat da je sa nižom

koncentracijom ostvaren jači inhibitorni efekat u poređenju sa višom, duplo većom koncentracijom ispitivanog agensa.

Tabela 24. Uticaj *Bacillus velezensis* na razvoj nekroze prouzrokovane izolatom KA12 (*Fusarium avenaceum*) na plodovima jabuke nakon 14 dana inkubacije

Tretman	Prečnik nekroze (mm) ± Sd
B 5%	9,75 ± 5,00 b
B 10%	13,50 ± 2,20 ab
Kontrola	19,37 ± 3,66 c

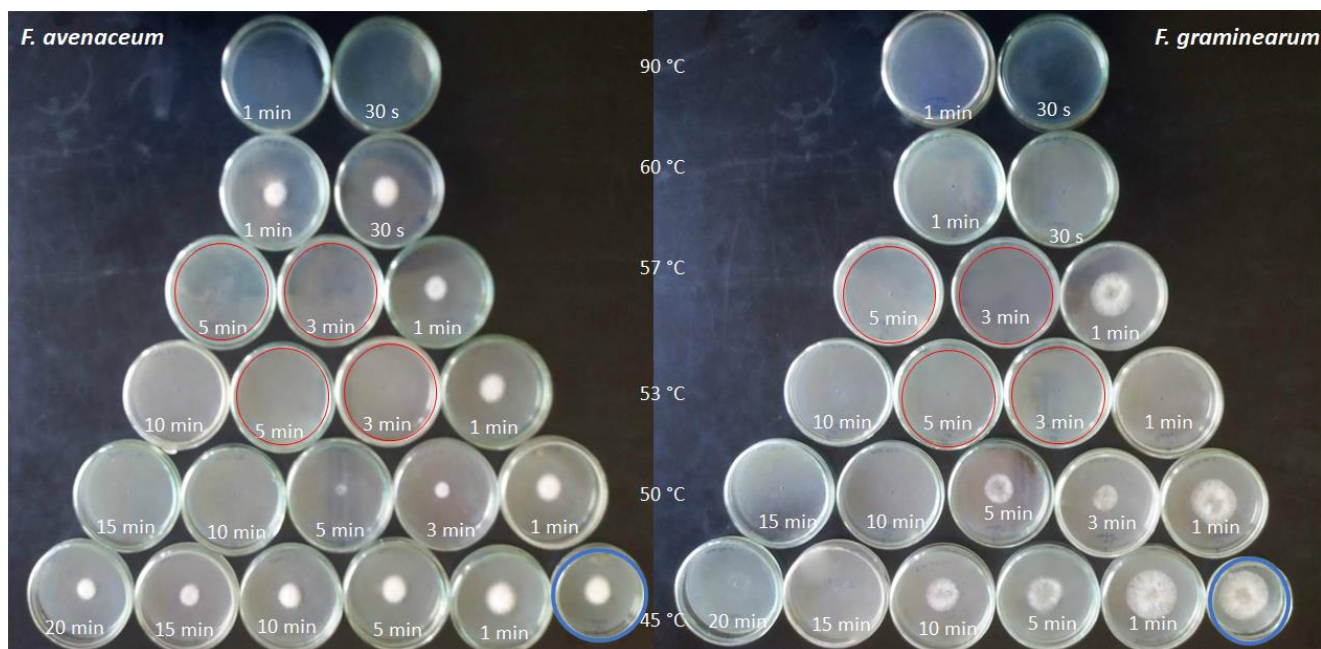
*Vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju;

Sd – standardna devijacija

6.7.4. Uticaj toplotnih tretmana na *Fusarium* spp.

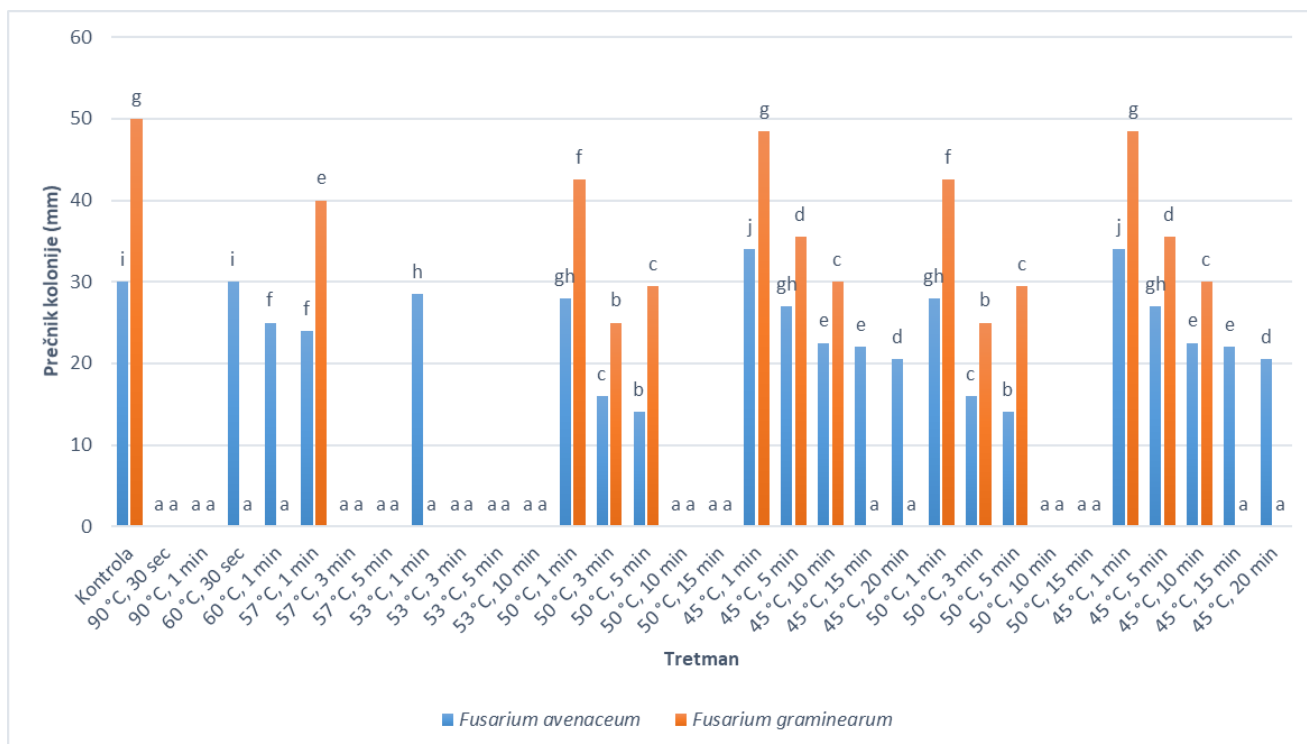
6.7.4.1. Uticaj toplotnih tretmana na klijavost spora i porast micelije *Fusarium* spp. *in vitro*

Na osnovu dobijenih rezultata (Grafikon 14) u *in vitro* ogledu vidi se da je inhibitorni efekat toplotnih tretmana značajno varirao u zavisnosti od temperature i dužine izlaganja. Potpuna inhibicija rasta micelije oba izolata je zabeležena kod sledećih tretmana: 50 °C u trajanju 10 i 15 minuta, 53 °C u trajanju 3, 5 i 10 minuta i 57 °C u trajanju od 3 i 5 minuta. Tretmani 45 °C u trajanju od 15 i 20 minuta, 53 °C u trajanju od 1 minut i 60 °C u trajanju od 1 minut i 30 sekundi potpuno su inhibirali porast micelije izolata TaB10² (*F. graminearum*), dok inhibicija nije bila potpuna u slučaju izolata KA12 (*F. avenaceum*). Iako razvoj micelije nije bio zaustavljen, ostali tretmani su ipak značajno inhibirali razvoj micelije obe vrste, uz izuzetak tretmana 60 °C u trajanju od 30 sekundi u slučaju *F. avenaceum* i 45 °C u trajanju od 1 minut u slučaju *F. graminearum*, gde je prečnik micelije bio na istom nivou značajnosti sa kontrolom. Isto tako, kod pomenutog tretmana (45 °C u trajanju 1 minut) zabeležen je značajan stimulativni efekat na porast micelije *F. avenaceum* u odnosu na kontrolu (Slika 14).



Slika 14. Uticaj toplotnih tretmana na porast micelije testiranih izolata u ogledu *in vitro*

*tretmani izabrani za *in vivo* ogled su zaokruženi crvenom bojom; kontrole su zaokružene plavom bojom

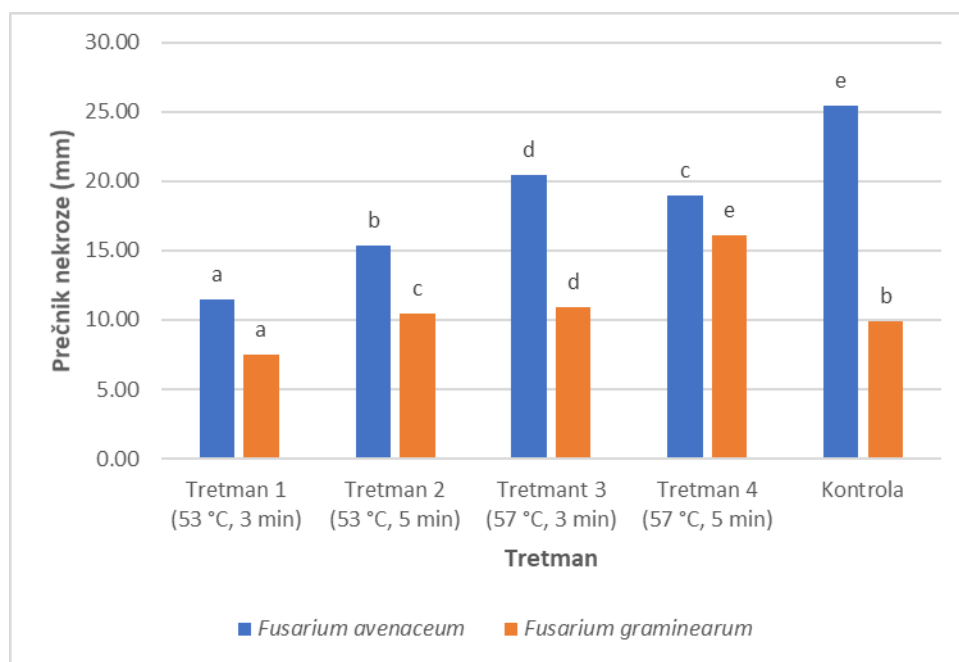


Grafikon 14. Uticaj toplotnih tretmana na porast micelije testiranih izolata u ogledu *in vitro*

*Stubovi obeleženi različitim slovima se statistički značajno razlikuju

6.7.4.2. Zaštita plodova jabuke od prouzrokovača fuzariozne truleži tretmanima toplom vodom

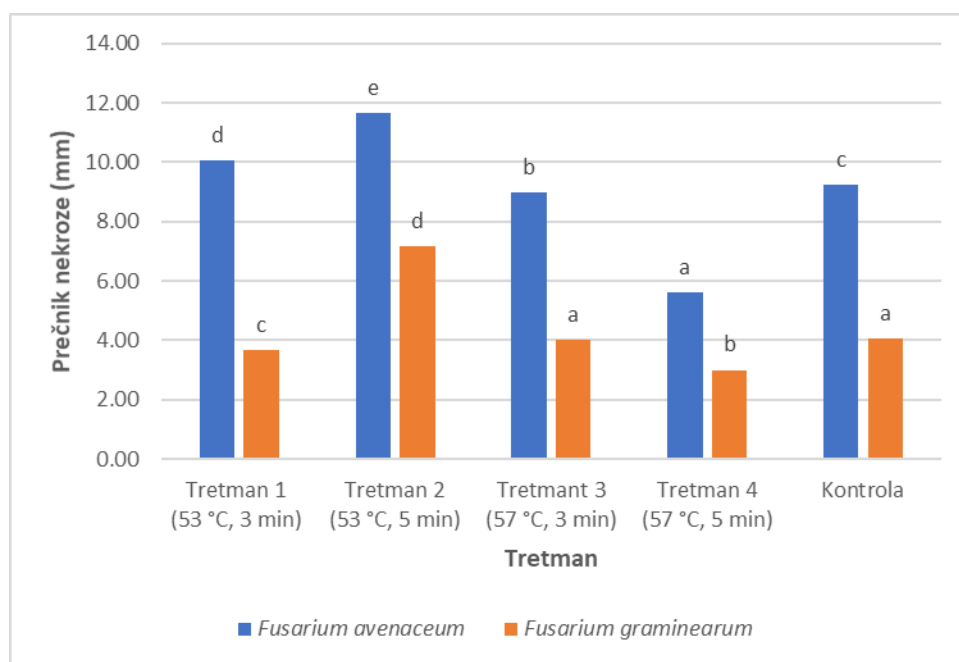
U ogledu *in vivo* testirani su sledeći tretmani: Tretman 1 (53 °C, 3 minuta), Tretman 2 (53 °C, 5 minuta), Tretman 3 (57 °C, 3 minuta) i Tretman 4 (57 °C, 5 minuta). Ovi tretmani su kombinacija najnižih temperatura i najkraćih vremena izlaganja kod kojih je zabeležena potpuna inhibicija rasta micelije u *in vitro* ogledu, a za koje se pretpostavilo da neće izazvati štetne efekte na plodovima. Nakon sedmodnevne inkubacije na sobnoj temperaturi u slučaju izolata KA12 (*F. avenaceum*) najjači inhibitorni efekat ispoljio je Tretman 1. Kod ostalih tretmana je takođe zabeleženo značajno inhibitorno dejstvo u poređenju sa kontrolom, međutim, ipak značajno slabije u poređenju sa Tretmanom 1. Isto tako, Tretman 1 je i kod izolata TaB10² (*F. graminearum*) ispoljio statistički značajan inhibitorni efekat u poređenju sa kontrolom. S druge strane, ostali tretmani su ispoljili stimulatívni efekat na porast nekroze plodova (Grafikon 15).



Grafikon 15. Uticaj različitih tretmana toplom vodom na razvoj nekroze na veštački inokulisanim plodovima jabuke izolatima KA12 (*Fusarium avenaceum*) i TaB10² (*Fusarium graminearum*) nakon sedam dana inkubacije na sobnoj temperaturi

*Stubovi obeleženi različitim slovima se statistički značajno razlikuju

Nakon 30 dana inkubacije u hladnjači sa normalnom atmosferom na 3 °C dobijeni rezultati ukazuju da je u slučaju *F. avenaceum* najjači inhibični efekat ostvario Tretman 4, dok je Tretman 3 takođe ostvario statistički značajnu inhibiciju porasta nekroze u poređenju sa kontrolom. Tretmani 1 i 2 su pojačali štetan efekat patogena na plodove. U slučaju *F. graminearum* najjača inhibicija je zabeležena u slučaju Tretmana 4, dok je Tretman 1 takođe ispoljio statistički značajno inhibično dejstvo u poređenju sa kontrolnom varijantom. Tretman 3 je ostvario izvesnu inhibiciju, međutim, ostvareni efekat je bio na istom nivou značajnosti sa kontrolom. Kod Tretmana 2 je zabeleženo stimulatívno dejstvo na porast nekroze (Grafikon 16).

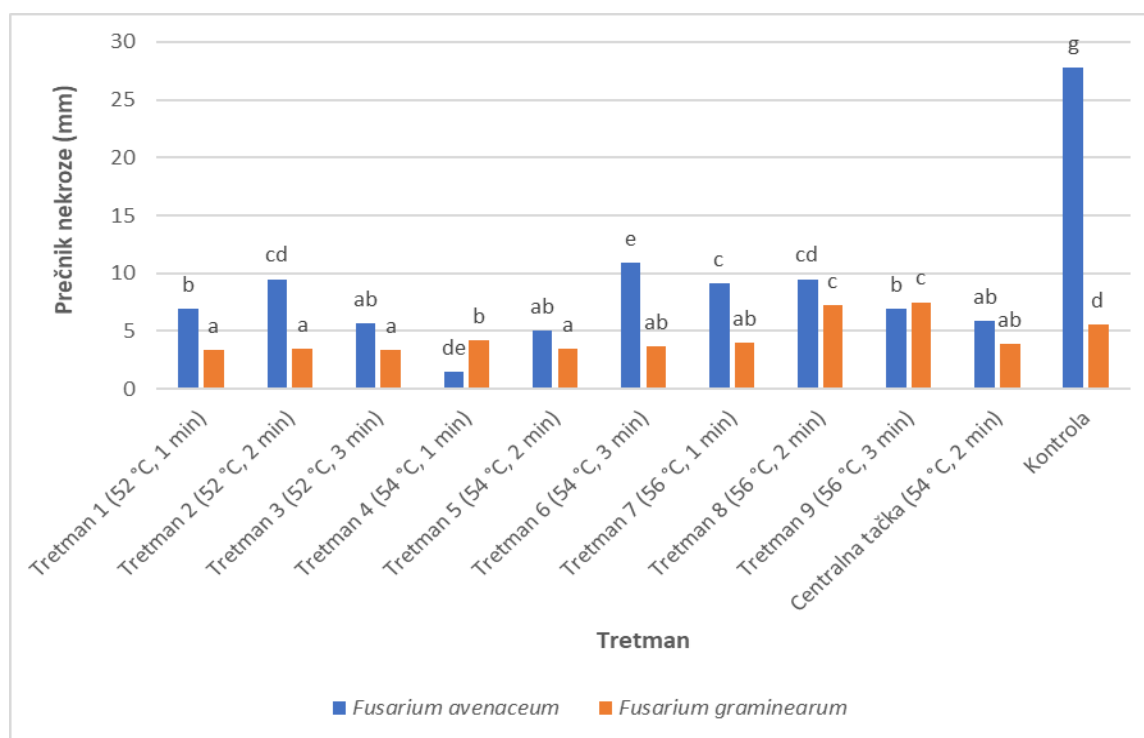


Grafikon 16. Uticaj različitih tretmana toplom vodom na razvoj nekroze na veštački inokulisanim plodovima jabuke izolatima KA12 (*Fusarium avenaceum*) i TaB10² (*Fusarium graminearum*) nakon 30 dana inkubacije u hladnjači sa normalnom atmosferom na 3 °C

*Stubovi obeleženi različitim slovima se statistički značajno razlikuju

U ponovljenom ogledu, pripremljenom prema Box-Behnken dizajnu ogleda, ispitano je dejstvo tretmana toplom vodom na izolate KA12 (*F. avenaceum*) i TaB10² (*F. graminearum*) na veštački inokulisanim plodovima sorti Zlatni delišes i Fuji. U ogledu sa plodovima sorte Zlatni delišes (Grafikon 17), u slučaju vrste *F. avenaceum*, rezultati ukazuju da svi primenjeni tretmani ispoljavaju značajnu inhibiciju razvoja truleži na plodovima jabuke, u poređenju sa netretiranom kontrolom. Najjača inhibicija zabeležena je u slučaju Tretmana 3 (52 °C, 3min) i Tretmana 5 (54

°C, 2 min), kao i u slučaju tretmana Centralna tačka (54 °C, 2 min). Nadalje, Tretman 1 (52 °C, 1 min) i Tretman 9 (56 °C, 3 min) ispoljili su slabije inhibitorno delovanje u poređenju sa prethodna dva tretmana, ali ipak statistički značajno u poređenju sa kontrolom. Preostali tretmani su ispoljili značajno slabiji inhibitorni efekat, iako statistički značajan ako se poredi sa kontrolnom varijantom. Kod plodova inokuliranih sa *F. graminearum* svi tretmani, osim Tretmana 8 (56 °C, 2 min) i Tretmana 9 (56 °C, 3 min), su ispoljili statistički značajan inhibitorni efekat u poređenju sa kontrolnom varijantom. Naime, pomenuti tretmani su delovali stimulatивно na razvoj nekroze. Najjača inhibicija je zabeležena u slučaju sledećih tretmana: Tretman 1 (52 °C, 1 min), Tretman 2 (52 °C, 2 min), Tretman 3 (52 °C, 3 min), Tretman 5 (54 °C, 2 min), dok je kod Tretmana 6 (54 °C, 3 min), Tretmana 7 (56 °C, 1 min) i tretmana Centralna tačka (54 °C, 2 min) zabeležena slabija, ali ipak statistički značajna inhibicija.

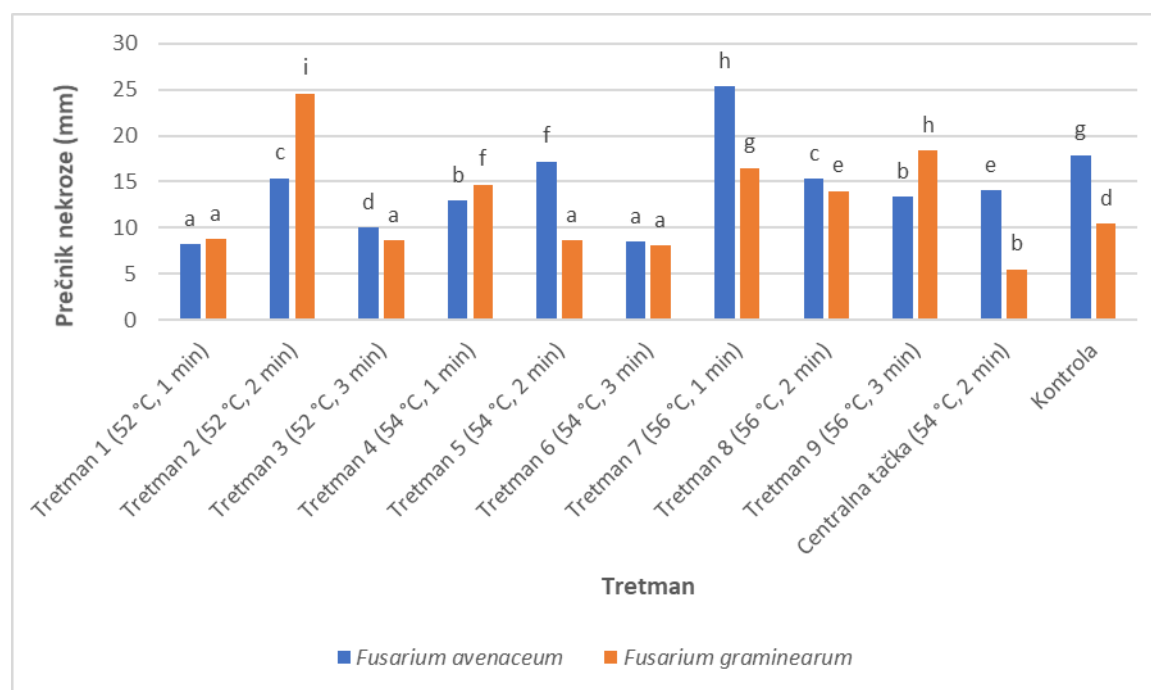


Grafikon 17. Uticaj različitih tretmana toplom vodom na razvoj nekroze na veštački inokuliranim plodovima jabuke sorte Zlatni delišes izolatima KA12 (*Fusarium avenaceum*) i TaB10² (*Fusarium graminearum*) nakon 10 dana inkubacije na sobnoj temperaturi

*Stubovi obeleženi različitim slovima se statistički značajno razlikuju

U ogledu sa plodovima sorte Fuji (Grafikon 18) inokuliranim sa izolatom *F. avenaceum*, svi tretmani su ispoljili inhibitorno delovanje na razvoj nekroze, izuzev Tretmana 7 (56 °C, 1

min), gde je zabeležen stimulatívni efekat na razvoj nekroze. Najjači inhibítorni efekat su ispoljili Tretman 1 (52 °C, 1 min) i Tretman 6 (54 °C, 3 min), dok je kod Tretmana 3 (52 °C, 3 min) zabeležena slabija, ali ipak statistički značajna inhibicija. U slučaju *F. graminearum* inhibítorno delovanje tretmana toplom vodom je zabeleženo kod četiri tretmana: Tretman 1 (52 °C, 1 min), Tretman 3 (52 °C, 3 min), Tretman 5 (54 °C, 2 min) i Tretman 6 (54 °C, 3 min), ali i kod tretmana Centralna tačka (54 °C, 2 min), koji je ujedno ispoljio najjaču inhibiciju od svih tretmana. Ostali tretmani nisu ispoljili inhibítorni efekat na razvoj fuzariozne truleži, već su, naprotiv, delovali stimulatívno, te je prečnik razvijene nekroze bio statistički značajno veći u poređenju sa kontrolnom varijantom.

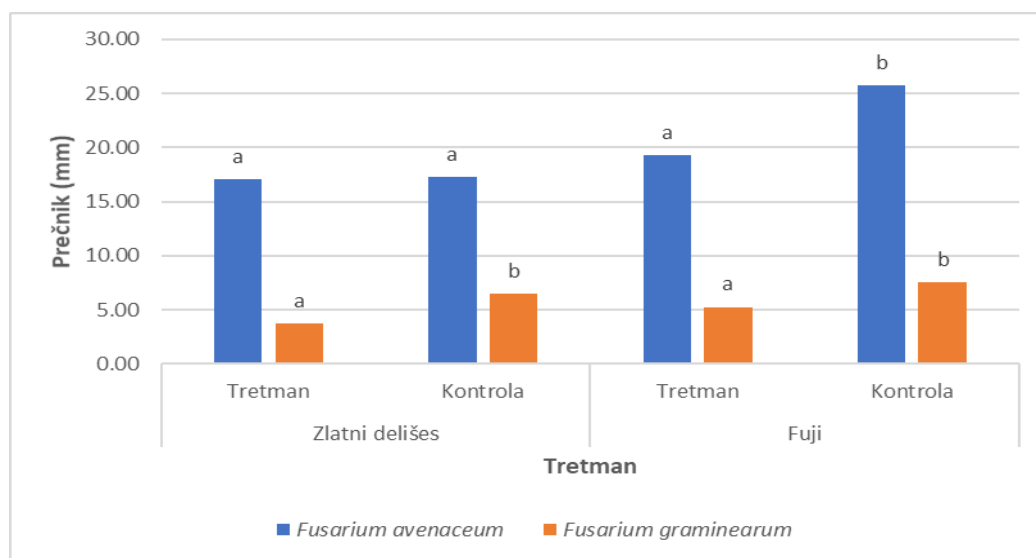


Grafikon 18. Uticaj različitih tretmana toplom vodom na razvoj nekroze na veštački inokulisanim plodovima jabuke sorte Fuji izolatima KA12 (*Fusarium avenaceum*) i TaB10² (*Fusarium graminearum*) nakon 10 dana inkubacije na sobnoj temperaturi

*Stubovi obeleženi različitim slovima se statistički značajno razlikuju

Dobijeni rezultati su obrađeni u softverskom paketu Design-Expert 7.1.5 metodom željene funkcije u cilju optimizacije faktora, odnosno da bi se definisali tretmani koji bi ispoljili najjaču inhibiciju razvoja truleži (za obe *Fusarium* vrste) na plodovima jabuke sorti Zlatni delišes i Fuji. U slučaju sorte Zlatni delišes metodom željene funkcije definisani su sledeći

tretmani: za vrstu *F. avenaceum* najjača inhibicija bi se postigla primenom tretmana sa temperaturom vode od 53,9 °C u trajanju od 2 minuta i 42 sekunde, a u slučaju vrste *F. graminearum* optimalan tretman bi bio sa temperaturom od 52 °C u trajanju od 2 minuta i 54 sekunde. Kod sorte Fuji metod željene funkcije je pokazao da bi za vrstu *F. avenaceum* tretman sa najjačom inhibicijom bio onaj sa temperaturom od 53,7 °C u trajanju od 3 minuta, dok je za vrstu *F. graminearum* ustanovljeno da bi toplotni tretman od 53,7 °C u trajanju od 1 minut i 6 sekundi ispoljio najbolji inhibitorski efekat. Ovako definisani tretmani su ispitani u *in vivo* ogledu i dobijeni rezultati ukazuju da u slučaju izolata KA12 tretman toplom vodom nije ispoljio inhibitorno dejstvo na sorti Zlatni delišes, dok na sorti Fuji u tretmanu je zabeleženo inhibitorno dejstvo, međutim, razvoj nekroze ipak nije zaustavljen. U slučaju izolata TaB10² kod obe sorte zabeležena je statistički značajna inhibicija razvoja nekroze u odnosu na kontrolne varijante, pogotovo kod sorte Zlatni delišes gde je razvoj nekroze gotovo potpuno inhibiran na tretiranim plodovima (Grafikon 19).



Grafikon 19. Uticaj tretmana toplom vodom definisanih metodom željene funkcije na razvoj nekroze na veštački inokulisanim plodovima jabuke sorti Zlatni delišes i Fuji izolatima KA12 (*Fusarium avenaceum*) i TaB10² (*Fusarium graminearum*) nakon 10 dana inkubacije na sobnoj temperaturi

*Stubovi obeleženi različitim slovima se statistički značajno razlikuju

6.7.5. Uticaj primene 1-MCP i dinamički kontrolisane atmosfere (DCA) u skladištu na razvoj fuzariozne truleži plodova jabuke

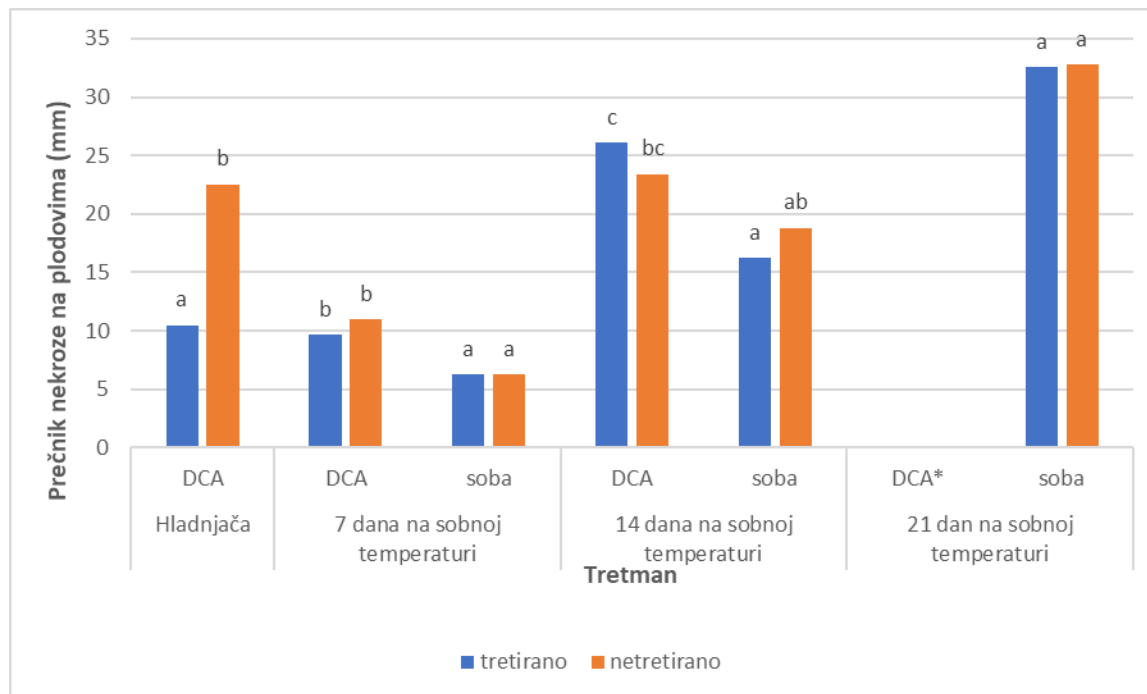
Tokom skladištenja u hladnjači sa dinamički kontrolisanom atmosferom (DCA) u trajanju od 143 dana na veštački inokulisanim plodovima jabuke izolatom KA12 (*F. avenaceum*) se razvila nekroza bez obzira na tretman sa 1-MCP (Slika 15).



Slika 15. Razvijena nekroza na tretiranim (levo) i netretiranim (desno) plodovima jabuke nakon 143 dana čuvanja u uslovima DCA hladnjače

Ipak, nakon iskladištenja merenjem prečnika razvijene nekroze, utvrđeno je da postoji značajna razlika između prečnika nekroze razvijene na tretiranim i netretiranim plodovima. Naime, nekroza koja se razvila na tretiranim plodovima bila je značajno manja nego na netretiranim plodovima. Plodovi su nakon toga inkubirani na sobnoj temperaturi, a razvoj nekroze je praćen merenjem prečnika nakon 7, 14 i 21 dan. Uporedo sa tim praćen je razvoj nekroze na veštački inokulisanim plodovima koji su inkubirani samo na sobnoj temperaturi. Nakon sedam dana poređenjem prečnika nekroze koja se razvila na plodovima uočeno je da se na plodovima čuvanim samo na sobnoj temperaturi razvila značajno manja nekroza, nezavisno od primenjenog tretmana. Međutim, razlike između nekroze razvijene na tretiranim i

netretiranim plodovima čuvanim pri istim uslovima nisu bile značajne. Značajne razlike između prečnika nekroze razvijene na plodovima čuvanim na sobnoj temperaturi i hladnjači javljaju se nakon 14 dana inkubacije. Naime, na tretiranim plodovima čuvanim samo na sobnoj temperaturi prečnik nekroze je bio najmanji, dok je tretman, u slučaju plodova čuvanih u hladnjači, stimulirao razvoj nekroze. Iako je prečnik nekroze na netretiranim plodovima čuvanim u hladnjači bio veći nego kod onih čuvanih na sobnoj temperaturi, razlike nisu bile statistički značajne. Nakon 21 dan inkubacije razlike između tretiranih i netretiranih plodova čuvanih na sobnoj temperaturi nisu bile statistički značajne. Plodovi čuvani u hladnjači su potpuno istrulili pre isteka inkubacionog perioda, te nije bilo moguće izmeriti prečnik. U kontrolnoj varijanti nije došlo do razvoja nekroze nezavisno od tretmana i uslova čuvanja (Grafikon 20).

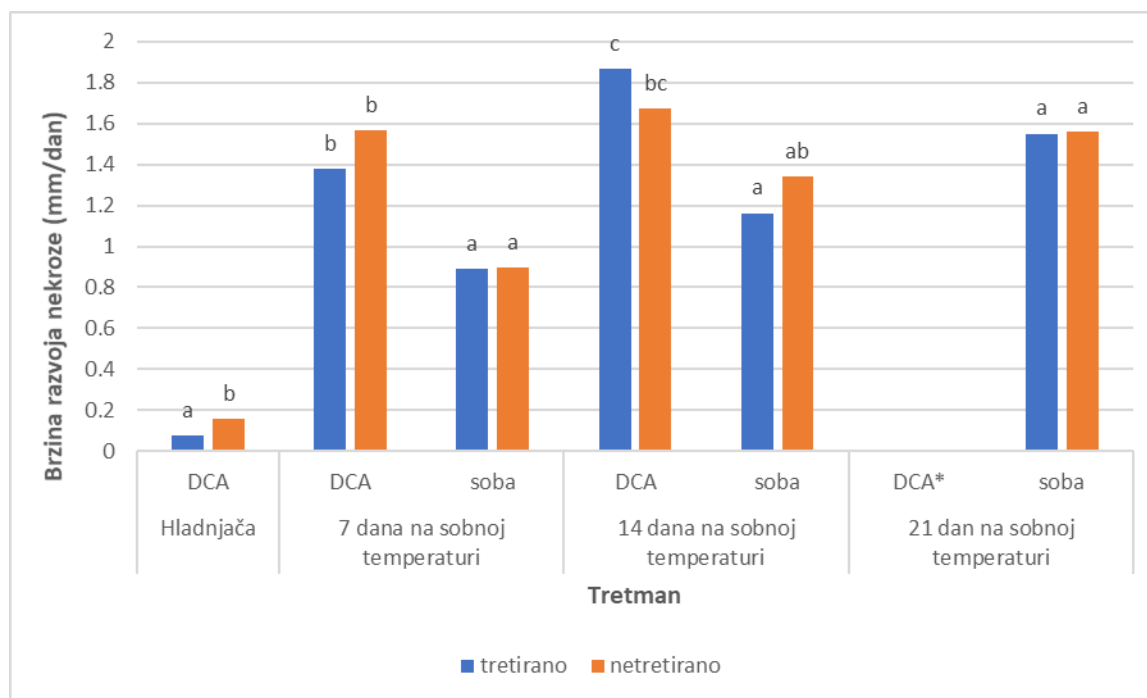


Grafikon 20. Prečnik nekroze na plodovima jabuke čuvanim u hladnjači i na sobnoj temperaturi nakon iznošenja iz hladnjače i nakon 7, 14 i 21 dan dodatne inkubacije na sobnoj temperaturi

*Stubovi obeleženi različitim slovima se statistički značajno razlikuju

Razlike između brzine razvoja nekroze (NDR) tokom skladištenja u hladnjači i na sobnoj temperaturi su bile značajne. Takođe, brzina razvoja nekroze je bila značajno manja kod tretiranih plodova u poređenju sa netretiranim tokom čuvanja u hladnjači. Nakon sedam dana inkubacije na sobnoj temperaturi brzina razvoja nekroze kod plodova čuvanih na sobnoj

temperaturi je bila značajno manja u poređenju sa plodovima prethodno čuvanih u hladnjači. Međutim, razlike između brzine razvoja nekroze nisu bile značajne između plodova čuvanih pri istim uslovima, nezavisno od primenjenog tretmana. Nakon 14 dana inkubacije brzina razvoja nekroze je bila najmanja na plodovima čuvanim na sobnoj temperaturi i tretiranih sa 1-MCP, dok je na tretiranim plodovima čuvanim u hladnjači brzina bila najveća. Nadalje, nakon 21 dan inkubacije nije bilo statistički značajnih razlika između brzina razvoja nekroze na tretiranim i netretiranim plodovima čuvanim na sobnoj temperaturi (Grafikon 21).



Grafikon 21. Brzina razvoja nekroze (NDR) na plodovima jabuke čuvanim u hladnjači i na sobnoj temperaturi nakon iznošenja iz hladnjače i nakon 7, 14 i 21 dan dodatne inkubacije na sobnoj temperaturi

*Stubovi obeleženi različitim slovima se statistički značajno razlikuju

7. DISKUSIJA

7.1. Rasprostranjenost i značaj *Fusarium* spp. na plodovima jabuke

U rezultatima je navedeno da su plodovi sa simptomima fuzariozne truleži, sa ili bez vidljive micelije, pronađeni na svih 10 lokaliteta tokom trogodišnjeg perioda uzorkovanja. Simptomi fuzariozne truleži su pronađeni nakon višemesečnog skladištenja plodova, osim u slučaju tri izolata koji su izolovani sa zaraženog ploda prikupljenog u proizvodnom voćnjaku. Na osnovu literaturnih izvora može se zaključiti da se fuzariozna trulež može detektovati na zaraženim plodovima nakon iskladištenja (Wenneker et al., 2016; Kou et al., 2014; Sever et al., 2012), ali i na plodovima u voćnjaku (Sørensen et al., 2009), što je u saglasnosti sa rezultatima ovog rada.

Zastupljenost *Fusarium* vrsta kao prouzrokovala truleži uskladištenih plodova jabuke se razlikovala od godine do godine. Tokom 2016. godine zabeležena je zastupljenost od 17,74%, tokom 2017. godine 7,94%, dok je tokom 2018. godine zabeležena zastupljenost *Fusarium* vrsta 11,21%. Takođe, i drugi istraživači su zabeležili sličnu učestalost pojave *Fusarium* spp. na plodovima jabuke. Tako je u Republici Hrvatskoj registrovana zastupljenost 9,4 – 33,2% (Sever et al., 2012), u Holandiji, prema Wenneker (2019), trulež prouzrokovana vrstom *F. avenaceum* iznosila je i do 25% na sorti Elstar. Krsmanović i sar. (2018) su ispitivali zastupljenosti prouzrokovala truleži uskladištenih plodova jabuke u Republici Srbiji i zabeležili da je zastupljenost *Fusarium* spp. 4 – 22%, što je saglasno sa rezultatima ovog rada.

7.2. Provera patogenosti izolata i zastupljenost vrsta roda *Fusarium*

Provera patogenosti izolata, reizolacija i ponovna provera patogenosti reizolata urađena je za ukupno 62 izolata koja su imala miceliju nalik na miceliju vrsta roda *Fusarium*. Simptomi koje su na plodovima sorte Zlatni delišes prouzrokovali prvi izolati i reizolati su bili očekivani i isti kao i simptomi plodova iz kojih su izolati izolovani, čime je potvrđena patogenost svih izolata. Uočeno je da se početni simptomi javljaju u vidu svetlo smeđih, sitnih i okruglih pega.

Kako je zaraza napredovala pege su se povećavale, a tkivo postajalo vodenasto i lako se odvajalo od zdravog tkiva, a na poprečnom preseku plodova uočeno je da se nekroza širila u mezokarp ka središtu ploda u obliku slova V. Sa napredovanjem nekroze na površini se javljala beličasta, ružičasta ili žućkasta micelija. Ovi rezultati su saglasni sa nalazima Sever et al. (2012) i Kou et al. (2014) koji su na uskladištenim plodovima jabuke uočili simptome koji odgovaraju gore opisanim i za koje je utvrđeno da ih prouzrokuje vrsta *F. avenaceum*. Ovu vrstu su na plodovima jabuke uočili Sørensen et al. (2009), Sanzani et al. (2013) i Wenneker et al. (2016), ali kao prouzrokovača vlažne truleži srži plodova jabuke, svetlo smeđe boje, koja se širi iz središta ploda zahvatajući okolni mezokarp, te često ostaje neprimećena sve dok se plod ne preseče. Takođe, kolonije polaznih izolata i kolonije reizolata su bile identične, a njihov izgled je potpuno odgovarao opisu Leslie i Summerell (2006), Lević (2008) i Sever et al. (2012) za vrste roda *Fusarium*.

Rezultati dobijeni u ovom radu pokazuju da postoji značajna razlika između izolata u prečniku razvijene nekroze, a posledično i brzine razvoja nekroze koja se kretala u rasponu 0,19 – 1,95 mm/dan. Slične rezultate su dobili Sever et al. (2012) koji su takođe, uočili statistički značajne razlike između brzina razvoja nekroze različitih izolata. Brzina razvoja nekroze u ovom ogledu se kretala od 0,17 do 2,8 mm/dan, dok je kod dva izolata izostao razvoj nekroze.

7.3. Morfološke i odgajivačke odlike izolata *Fusarium* spp.

7.3.1. Morfološke odlike izolata *Fusarium* spp.

Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja morfoloških odlika vegetativnih struktura izolata utvrđena je velika varijabilnost u izgledu kolonija ispitanih izolata na podlogama PDA, CA i CLA. Ipak, izolate je bilo moguće grupisati na osnovu svojstava i rasporediti ih u četiri morfološke grupe. Najveći broj izolata je svrstan u treću grupu (34 izolata, odnosno 54,84%), zatim u drugu (21 izolat, 33,87%) i četvrtu grupu (5 izolata, 8,06%), dok je samo dva izolata (3,23%) svrstano u prvu grupu. Razlike između izgleda kolonija izolata iz različitih grupa je bio očigledan, dok je izgled kolonija izolata unutar grupa bio prilično homogen. Na osnovu opisa kolonija *Fusarium* vrsta prema Leslie i Summerell (2006) i Lević (2008), utvrđeno je da izolati

iz prve grupe pripadaju vrsti koja je drugačija od izolata iz preostale tri grupe. Naime, na osnovu boje micelije, načina rasta i pigmenta koji se formira na hranljivim podlogama za izolate iz prve grupe je pretpostavljeno da pripadaju vrsti *F. graminearum*, dok su izolati iz druge, treće i četvrte grupe identifikovani kao pripadnici vrste *F. avenaceum*, iako postoje morfološke razlike u izgledu kolonija. Međutim, kako Leslie i Summerell (2006) navode izgled kolonija kod vrste *F. avenaceum* može značajno varirati. Takođe, uočeni izgled kolonija u ovom radu u slučaju *F. avenaceum* odgovara opisu koji su za ovu vrstu dali i drugi autori (Yli-Mattila et al., 2018; Wenneker et al., 2016; Kou et al., 2014). U slučaju izgleda kolonija izolata iz prve grupe (*F. graminearum*) isti odgovara opisu datom od strane Obradović (2017) za ovu vrstu.

Rezultati proučavanja morfoloških odlika reproduktivnih struktura pokazali su da gajenjem na CLA podlozi izolati formiraju sporodohije. Grupe izolata su se razdvojile i na osnovu ove osobine. Naime, boja sporodohija kod izolata iz druge, treće i četvrte grupe bila je svetlo narandžasta do narandžasta, dok je kod dva izolata prve morfološke grupe boja sporodohija bila crvenkasta. Ovi nalazi potpuno odgovaraju opisima Leslie i Summerell (2006) i Lević (2008) za *F. avenaceum* (druga, treća i četvrta morfološka grupa) i *F. graminearum* (prva morfološka grupa). Makrokonidije su uočene kod svih izolata, dok su kod izolata iz druge, treće i četvrte grupe uočene i mezokonidije, dok mikrokonidije nisu zabeležene. Prema Lević (2008) vrsta *F. avenaceum* formira mezokonidije, dok Leslie i Summerell (2006) ne prave razliku između mikrokonidija i mezokonidija, međutim, autori su saglasni da vrsta *F. graminearum* ne formira mikrokonidije niti mezokonidije. Nadalje, hlamidospore nisu uočene kod izolata druge, treće i četvrte morfološke grupe, za razliku od oba izolata iz prve grupe kod kojih su detektovane okruglaste, pojedinačne hlamidospore. Ovi rezultati su ponovo u saglasnosti sa podacima iz literature da vrsta *F. avenaceum*, za razliku od *F. graminearum*, ne formira hlamidospore (Yli-Mattila et al., 2018; Obradović, 2017; Kou et al., 2014; Lević, 2008; Leslie and Summerell, 2006), odnosno navode na zaključak da izolati iz druge, treće i četvrte morfološke grupe pripadaju vrsti *F. avenaceum*, dok izolati iz prve grupe pripadaju vrsti *F. graminearum*.

7.3.2. Odgajivačke odlike izolata *Fusarium* spp.

Ispitivanjem uticaja različitih podloga na rast kolonija *Fusarium* spp. zabeležene su veoma značajne razlike između izolata, odnosno na rast prečnika kolonije su uticale i osobine svakog izolata ponaosob, ali i osobine hranljive podloge. Međutim, na osnovu dobijenih rezultata može se reći da su gotovo svi izolati imali najbolji porast na PDA podlozi, kao i da su izolati iz prve morfološke grupe imali najbrži rast, nezavisno od podloge. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima drugih istraživača. Naime, Winder (1999) je ispitao uticaj više hranljivih podloga na porast izolata *F. avenaceum* (PDA, MEA, Czapek Dox agar, OA, NA, YA i YGA), a najjači porast izolati su ostvarili na PDA podlozi, kao što je zabeleženo i u ovom radu. U ovom radu prosečan dnevni porast micelije iznosio je 4,7 mm, dok Obradović (2017) navodi da je prosečan dnevni porast micelije vrste *F. graminearum* iznosio od 26,34 do 27,36 mm, što je značajno više nego kod *F. avenaceum*, što je opet saglasno sa rezultatima ovog rada.

Uticaj uslova sredine je od presudnog značaja za razvoj gljiva. Faktori sredine koji značajno deluju na rast i razvoj jeste temperatura, te može biti limitirajući faktor ukoliko nisu ispunjeni minimalni zahtevi organizma za ovaj faktor (Agrios, 2005). U ovom radu je potvrđeno da je temperatura izuzetno značajna za razvoj testiranih izolata. Izolati identifikovani kao *F. avenaceum* (druga, treća i četvrta morfološka grupa) su se najbolje razvijali na temperaturama od 20 i 25 °C, dok je na 0 i 35 °C rast izostao. Ovo je potpuno u saglasnosti sa rezultatima Oleskevich et al. (1998) i Winder (1999), gde je rast kolonija izostao na 0 i 35 °C, dok su kao optimalne temperature za rast ove vrste prepoznate 20 i 25 °C. Brennan et al. (2003) navode da je optimalna temperatura za razvoj *F. culmorum*, *F. graminearum* i *F. poae* bila 25 °C, dok je za *F. avenaceum* i *M. nivale* ta temperatura bila 20 °C, što je takođe u skladu sa rezultatima dobijenim u ovom radu.

Prema Agrios (2005), kiselost podloge je, takođe, jedan od faktora koji može biti ograničavajući za rast i razvoj izolata ukoliko nije odgovarajući. Najveći broj izolata se najbolje razvijao pri pH podloge u rasponu 6 – 8. Izolati prve grupe su iskazali visoku toleranciju na pH podloge i izuzev pH 2, kiselost podloge nije uticala na razvoj ovih izolata. Do sličnih rezultata su došli Panwar et al. (2016) koji su uočili da je *F. graminearum* ispoljio visoku tolerantnost na pH podloge, te da je razvoju ispitivanih izolata najviše odgovarala pH vrednost podloge u rasponu 5 – 8, dok je za vrste *F. pallidoroseum* i *F. oxysporum*, prema ovom istraživanju, najpogodnija pH

vrednost podloge bila 5, a porastom pH vrednosti brzina porasta kolonije je opadala. Forbes i Dickinson (1977) u svojim istraživanjima o uticaju pH zemljišta na razvoj *F. avenaceum* su došli do zaključka da razvoj ove vrste na zemljištima sa pH vrednosti od 4,7 i 7,3 je bio statistički značajno redukovan u poređenju sa rastom na zemljištu sa neizmenjenom pH vrednosti od 5,8. Ovo nije u potpunosti u skladu sa rezultatima dobijenim u ovom radu, jer kao što je gore navedeno, najveći broj izolata se najbolje razvijao na pH 6 – 8.

7.3.3. Obrazovanje polnog stadijuma

Formiranje peritecija, plodonosnih tela polnog stadijuma, je uočen samo kod izolata iz prve morfološke grupe, dok izolati iz preostale tri grupe nisu razvili polni stadijum. Protokol korišćen u ovom radu su koristili Cavinder et al. (2012) za obrazovanje polnog stadijuma kod vrste *F. graminearum*, te se stoga može zaključiti da *F. graminearum* može na ovaj način formirati polni stadijum, odnosno da izolati iz prve grupe pripadaju ovoj vrsti. Nasuprot tome, izolati iz ostalih grupa nisu razvili polni stadijum, te se stoga može pretpostaviti da pripadaju heterotalusnoj grupi, odnosno vrsti *F. avenaceum*, kao što je to i ranije pretpostavljeno.

Razvoj polnog stadijuma je regulisan pomoću jednog lokusa za polno razmnožavanje (*MAT1*). Homotalusne vrste u svom genomu sadrže obe alternativne forme gena *MAT1-1* i *MAT1-2*, koje se nazivaju idiomorfi, na lokusu *MAT1*, dok heterotalusne vrste poseduju samo jedan idiomorf, *MAT1-1* ili *MAT1-2* na lokusu *MAT1* (Ma et al., 2013; Lee et al., 2003). *F. graminearum* je homotalusna vrsta, te može formirati plodonosna telašca bez prisustva kompatibilnog partnera (Cavinder et al., 2012; Kerényi et al. 2004; Yun et al., 2000). Sa druge strane, *F. avenaceum* u svom genomu sadrži ili jedan ili drugi mating-type gen (Lysøe et al., 2014; Feng et al., 2010).

7.4. Molekularna identifikacija i karakterizacija izolata *Fusarium* spp.

Uspešnost ekstrakcije DNK i pogodnost za dalja ispitivanja su provereni u PCR reakciji upotrebom para univerzalnih prajmera ITS1/ITS4 opisanih od White et al. (1990). Nakon razdvajanja PCR produkata elektroforezom u agaroznom gelu sa etidijum-bromidom uočeni su jasno vidljivi bendovi, očekivane veličine oko 600 bp. Drugi istraživači su, takođe, koristili gore

opisane prajmere za identifikaciju i filogenetska istraživanja više *Fusarium* vrsta, kao na primer *F. proliferatum* (Zhou et al., 2021; Leyronas et al., 2018), *F. equiseti* (Ezrari et al., 2020), *F. avenaceum* (Mei et al., 2020) i takođe dobili amplikone približne veličine 600 bp. Na ovaj način je potvrđeno da je ekstrakcija uspela i da dobijena DNK može da se koristi za dalja ispitivanja.

S obzirom da je najveći broj izolata, osim izolata iz prve morfološke grupe, prethodno identifikovan kao vrsta *F. avenaceum* pristupilo se testiranju ove tvrdnje. Za molekularnu identifikaciju do nivoa vrste korišćeni su prajmeri specifični za vrstu *F. avenaceum* FA-ITSF/FA-ITSR opisani od Schilling et al. (1996), kao i prethodno pripremljena DNK čiji je kvalitet proveren u PCR reakciji. Kao što je i očekivano, razdvajanjem dobijenih produkata elektroforezom na agaroznom gelu je potvrđeno. Prilikom vizuelizacije produkata, kod svih izolata su uočeni jasni bendovi veličine 272 bp, kao što je bilo očekivano, izuzev kod dva izolata prve morfološke grupe (TaB10 i TaB10²). Dobijeni rezultati su saglasni sa navodima drugih autora koji su koristili iste prajmere za identifikaciju *F. avenaceum* (Sever et al., 2012; Akinsanmi et al., 2004). Kod izolata iz prve morfološke grupe nije došlo do umnožavanja specifičnog regiona, što je takođe bilo očekivano, jer su i ranije identifikovani kao *F. graminearum*.

Pomoću para prajmera EF1/EF2 (O'Donnell et al., 1998) uspešno je amplifikovan region *TEF-1α* kod svih testiranih izolata i dobijeni su amplikoni očekivane dužine od 700 bp, koji su, zatim, poslani na sekvenciranje, a dobijene sekvence su korišćene za ispitivanje filogenetskih odnosa. Na osnovu dostupnih literaturnih podataka može se videti da su i drugi istraživači koristeći ovaj par prajmera dobili amplikone koji su nakon sekvenciranja korišćeni za filogenetsku analizu *Fusarium* vrsta (da Silva et al., 2014; Holtz et al., 2011; Nitschke et al., 2009).

Analizom dendograma, konstruisanog metodom Maximum Likelihood i korišćenjem sekvenci *TEF-1α*, konstatovano je da se, bez obzira na primenjenu metodu, izolati *F. avenaceum* jasno odvajaju sa 100% bootstrap vrednosti od izolata *F. graminearum*, kao i od outgroup sekvence *C. gloeosporioides* (GU994503.1). Takođe, uočeno je i grupisanje izolata u klastere unutar vrste *F. avenaceum*. Na ovaj način se može zaključiti da se korišćenjem sekvenci *TEF-1α* u svrhu analiza filogenetskih odnosa, mogu dobiti pouzdani rezultati o razdvajanju različitih *Fusarium* vrsta između sebe. Ova tvrdnja je u saglasnosti sa navodima Barik i Tayung (2012) koji su filogenetskom analizom sekvenci *TEF-1α* dobili dobro izdvojene klastere, što nije bio

slučaj kada su za analize korišćene sekvence *ITS* regiona. Fernández-Ortuño et al. (2010) ispitali su pouzdanost sekvenci *CYP51C*, *ITS* regiona, β -*tubulin* i *TEF-1 α* u ispitivanju interspecifičnih odnosa vrsta roda *Fusarium* i zaključili da sekvence *CYP51C* i *TEF-1 α* ispoljavaju najveći nukleotidni diverzitet i topološki rezultat, te se mogu smatrati pouzdanim filogenetskim markerima, za razliku od regiona *ITS* koji je ispoljio nizak diverzitet i topološki rezultat, te se ne može smatrati pouzdanim markerom u ovim istraživanjima. Takođe, Obradović (2017), Starkey et al. (2007) i Geiser et al. (2004) navode da je *TEF-1 α* visoko informativan, te tako pogodan za ispitivanje filogenetskih odnosa vrste *F. graminearum*. Sa druge strane, Holtz et al. (2011) su u svojim istraživanjima došli do zaključka da *ITS* ima veću diskriminacionu moć od *TEF-1 α* u slučaju vrste *F. avenaceum*.

7.5. Potencijal za sintezu mikotoksina izolata *Fusarium* spp.

Rezultati dobijeni u ovom radu ukazuju da postoji značajan potencijal da plodovi jabuke, a posledično i produkti prerade plodova jabuke, budu kontaminirani zearalenonom i deoksinivalenolom. Naime, u *in vitro* ogledu na podlozi AA oba izolata *F. graminearum* su proizveli oba mikotoksina u značajnim količinama, dok je u slučaju *F. avenaceum* zabeleženo da je u slučaju izolata HG3 detektovan zearalenon, dok je u slučaju JvZ8/18 detektovan deoksinivalenol. Na veštački inokulisanim plodovima jabuke u *in vivo* ogledu gotovo svi testirani izolati *F. avenaceum* i oba izolata *F. graminearum* su proizveli detektibilne količine zearalenona, dok je kod izolata TaB10 detektovan i deoksinivalenol.

Osim vrsta roda *Fusarium* kao prouzrokovaca truleži plodova jabuke javlja se vrsta *Penicillium expansum* koja proizvodi nekoliko veoma značajnih mikotoksina, od kojih je najznačajniji patulin (Zhong et al., 2018; Sanzani et al., 2012). Nadalje, toksini koje proizvode vrste iz roda *Alternaria*, takođe veoma česti prouzrokovaci truleži plodova jabuke, su vrlo značajni zbog svoje toksičnosti, ali i kancerogenosti. U ovu grupu ubrajaju se alternariol, alternariol monometil etar (AME), altenuen, i dr. (Li et al., 2020; Fernández-Cruz et al., 2010). Sørensen et al. (2009) ispitali su potencijal *F. avenaceum* za sintezu mikotoksina na prirodno zaraženim i veštački inokulisanim plodovima jabuke i detektovali veći broj sekundarnih metabolita: moniliformin, eniatine (A, A1, B, B1, B2 i B3), fuzarin C, antibiotik Y, 2-amino-

14,16-dimetiloktadekan-3-ol (2-AOD-3-ol), hlamidosporol, aurofuzarin, fuzaristatin A i dr. Na osnovu ovog istraživanja može se zaključiti da vrsta *F. avenaceum* na plodovima jabuka, može da produkuje značajne količine mikotoksina, čija ingestija može biti rizična po konzumente plodova jabuka i prerađevina od jabuke. Na osnovu dostupnih literaturnih podataka uočeno je da do sada nisu vršena ispitivanja kontaminacije plodova jabuke mikotoksinima zearalenon i deoksinivalenol kao posledica infekcije plodova *Fusarium* vrstama. Premda je uobičajeno da se ovi mikotoksini i obe *Fusarium* vrste povezuju sa kontaminacijom kukuruza i žitarica (Ferrigo et al., 2016; Tančić et al., 2015; Logrieco et al., 2002), rezultati ovog istraživanja ukazuju na to da ovi mikotoksini potencijalno predstavljaju vrlo značajne kontaminante plodova jabuke, a posledično i njihovih prerađevina.

7.6. Procena potencijala za sintezu sekundarnih metabolita

Veličina genoma izolata KA13 (*F. avenaceum*) iznosi 41,7 Mb, što ukazuje na sličnost po veličini sa tri javno dostupna genoma *F. avenaceum* opisana od strane Lysøe et al. (2014) (Fa05001 41,6 Mb, FaLH03 42,7 Mb i FaLH27 43,1 Mb). Ukupan broj 16076 predviđenih gena u genomu KA13 pomoću softvera programa AUGUSTUS 3.3.2 (Stanke et al., 2004) veći je u poređenju sa brojem gena u genima Fa05001, FaLH03 i FaLH27 (13217, 13293 i 13445, respektivno).

Genom izolata TaB10 (*F. graminearum*) dobijen u ovom istraživanju je ukupne dužine 36,76 Mb, dok broj predviđenih gena iznosi 14327. Ukupna dužina referentnog genoma (*F. graminearum*, izolat PH-1) iznosi 36.1 Mb, dok broj predviđenih gena iznosi 13313 (Cuomo et al., 2007), odnosno 36,56 Mb sa brojem predviđenih gena od 14164 prema King et al. (2015), što ukazuje da je rezultirajući genom veći i sadrži više gena.

Iako kvalitet sastavljenog genoma i njegova dužina zavise od kvaliteta sekvenciranja i korišćenih softvera za sastavljanje, dobijeni rezultati ukazuju da je kod oba genoma dužina veća, kao i broj predviđenih gena. Ovo može ukazivati na veći potencijal za sintezu različitih metabolita.

Broj predviđenih klastera gena za sintezu sekundarnih metabolita u genomima izolata KA13 i TaB10 razlikovao se u zavisnosti od toga koji je softver korišćen. Ovo je bilo očekivano

jer je softver antiSMASH dizajniran tako da može da predvidi postojanje antibiotskih klastera gena pored ostalih klastera gena za sintezu sekundarnih metabolita (Medema et al., 2011; Blin et al., 2019). Ukupan broj backbone gena za sintezu sekundarnih metabolita identifikovanih pomoću softvera antiSMASH je 76 za izolat KA13 (*F. avenaceum*), odnosno 54 u slučaju izolata TaB10 (*F. graminearum*). Lysøe et al. (2014) su u svojim istraživanjima analizirali tri genoma *F. avenaceum* i dobili različite brojeve backbone gena za svaki izolat. Tako je u genomu izolata Fa05001 identifikovano 75, kod izolata FaLH03 77, dok je u slučaju izolata FaLH27 identifikovano čak 80 backbone gena, od čega ukupno 25 – 27 tip I PKS gena, 2 – 3 tip III PKS gena i 25 – 28 NRPS gena. Pomoću softvera antiSMASH u genomu KA13 analizom je identifikovano 18 PKS gena, 24 NRPS i 9 NRPS-like gena, kao i 5 hibridnih PKS-NRPS gena. Kao što je navedeno u rezultatima, pomoću antiSMASH softvera kao jedinstveni PKS gen u genomu izolata KA13 identifikovan je gen g2594, ali isti nije identifikovan softverom SMURF. Proverom domena utvrđeno je da je ovaj gen halkon i stilben sintaza kodirajući gen (CHS), a pomoću NCBI BLAST poravnanja utvrđena je podudarnost od 92,39% između gena g2594 i gena FAVG1_04458, koji je ranije opisan kao PKS kodirajući gen od strane Brown i Proctor (2016) i Lysøe et al. (2014). Proverom konzerviranih domena ustanovljeno je da i ovaj gen kodira halkon i stilben sintazu (CHS). Prema Yu et al. (2012), halkon sintaza (CHS) jeste enzim koji pripada tipu III PKS gena, pa se i ovaj gen može smatrati PKS kodirajućim genom. Nadalje, Sieber et al. (2014) navode da su u genomu *F. graminearum* identifikovali, između ostalih, 15 PKS i 23 NPS/NPS-like kodirajućih gena. U ovom istraživanju softverom antiSMASH identifikovano je 14 PKS, 14 NRPS i 9 NRPS-like gena u genomu izolata TaB10 (*F. graminearum*). Takođe, dimetilalil triptofan sintaze (DMATS) kodirajući geni nisu identifikovani, kao što je bio slučaj u istraživanju Sieber et al. (2014). Gen g5573 identifikovan kao jedinstveni PKS gen pomoću softvera antiSMASH, ali je proverom domena utvrđeno je da je taj gen halkon i stilben sintaza (CHS) kodirajući gen. Kao što je prethodno rečeno, halkon sintaza (CHS) je enzim koji pripada tipu III PKS enzima (Yu et al., 2012).

7.7. Biološke i fizičke mere zaštite plodova jabuke od *Fusarium* spp.

7.7.1. Uticaj etarskih ulja i hidrolata etarskih ulja različitih biljaka na fuzarioznu trulež ploda jabuke

Ispitivanjem dejstva etarskih ulja i njihovih hidrolata na razvoj *Fusarium* vrsta je zapaženo da su sva ispitivana etarska ulja (*O. vulgare*, *S. hortensis*, *O. basilicum* i *S. sclarea*) ispoljila jako antifungalno dejstvo. U slučaju ispitivanih hidrolata etarskih ulja, jedino je hidrolat etarskog ulja *S. hortensis* ispoljio značajno inhibitorno dejstvo, iako mnogo slabije u poređenju sa etarskim uljima. Perczak et al. (2019) navode da su etarska ulja biljnih vrsta *Cinnamomum zeylanicum*, *O. vulgare* i *Cymbopogon martini* ispoljili najjače inhibitorno dejstvo od svih ispitivanih ulja prema vrstama *F. graminearum* i *F. culmorum*. Nadalje, uočili su da je *F. graminearum* najosetljiviji prema etarskim uljima *O. vulgare* i *C. zeylanicum*. Ovo je saglasno sa rezultatima ovog rada, gde je uočeno da su etarska ulja *O. vulgare* i *S. hortensis* ispoljila najjače inhibitorno dejstvo prema obe ispitivane vrste roda *Fusarium*. Takođe, Harčárová et al. (2021) su ispitali uticaj više etarskih ulja na rast dva izolata *F. graminearum* i došli do zaključka da najjači efekat ispoljava etarsko ulje *O. vulgare*, što je saglasno sa rezultatima ovog rada. Prema Lahooji et al. (2010) minimalna koncentracija etarskog ulja *S. hortensis* koja potpuno inhibira rast kolonije *F. graminearum* na PDA podlozi iznosi 31,5 µl/100 ml, što je gotovo dvostruko više od koncentracije primenjene u ovom ogledu (0,16 µl/ml). Tabti et al. (2014) su ispitivali etarsko ulje i hidrolat *Thymus capitatus* i uočili da minimalna koncentracija za potpunu inhibiciju rasta *F. solani* iznosi 0,2 µl/ml.

Iako su objavljeni brojni rezultati istraživanja antifungalnih efekata etarskih ulja *in vitro* (Grahovac et al., 2012; De Billerbeck et al., 2001), mnogo je manje rezultata o mogućnosti primene etarskih ulja *in vivo*. Na osnovu rezultata ovog istraživanja može se reći da su etarska ulja ispoljila inhibitorni efekat na razvoj truleži prouzrokovane izolatima KA12 i KA13 (*F. avenaceum*) tokom skladištenja u hladnjačama, ali je nakon iskladištenja, tokom dodatne inkubacije na sobnoj temperaturi, njihov efekat postajao sve slabiji. Ovo je u saglasnosti sa Lopez-Reyes et al. (2010) koji su, takođe, došli do zaključka da efekat etarskih ulja opada tokom vremena, te predlažu da bi, nakon izvesnog perioda, tretmani trebali biti ponovljeni. Takođe, isti autori navode da različite sorte različito reaguju na etarska ulja, te je neophodno utvrditi

optimalnu koncentraciju primene za svaku voćnu vrstu i sortu. Banani et al. (2018) potvrđuju tvrdnju da efikasnost zavisi od dužine trajanja skladištenja, ali i sorte koja se tretira.

7.7.2. Uticaj bioloških agenasa *Bacillus* spp., *Bacillus velezensis* i *Streptomyces hygroscopicus* na *Fusarium* spp.

Literaturni podaci ukazuju na visok potencijal *S. hygroscopicus* protiv vrsta *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* i *F. avenaceum* (Grahovac et al., 2014), odnosno *A. alternata* i *F. avenaceum* (Mitrović et al., 2020). U ovom radu je potvrđena antifungalna aktivnost *S. hygroscopicus*. Međutim, u ovom istraživanju, korišćena je kultivaciona tečnost *S. hygroscopicus* razblažena do koncentracija 1 – 5 %, te je i u ovako niskim razblaženjima ispoljila antifungalnu aktivnost na izuzetno visokom nivou, što ukazuje na visok potencijal ovog agensa za praktičnu primenu.

U slučaju *Bacillus* spp. postoje brojni literaturni podaci koji ukazuju na visok potencijal ovog agensa u suzbijanju fitopatogenih mikroorganizama (Lastochkina et al., 2019; Ju et al., 2013; Jamalizadeh et al., 2010; Fu et al., 2010). U ovom istraživanju je potvrđen antifungalni potencijal ovog agensa. Ipak, efekat ovog agensa je bio slabiji u odnosu na *S. hygroscopicus*.

Osim toga, dobijeni rezultati govore da je agens *B. velezensis* značajno inhibirao porast vrsta roda *Fusarium* u *in vitro* uslovima bez obzira na primenjenu koncentraciju. Kao što je prethodno već spomenuto, postoje podaci istraživanja koji potvrđuju inhibitorno delovanje biološkog agensa na bazi *Bacillus* spp. prema *F. avenaceum*. Nadalje, rezultati Cheffi et al. (2019) ukazuju na visoku efektivnost *B. velezensis* protiv *F. avenaceum* i *F. sulphureum*, dok rezultati Cao et al. (2021) ukazuju na jako inhibitorno dejstvo protiv *F. oxysporum*, što je u skladu sa rezultatima dobijenim u ovom radu. Međutim, Hwang (1994) navodi da *B. subtilis* ne ispoljava zadovoljavajući inhibitorni efekat prema *F. avenaceum* sve do koncentracije 50 ml/l, odnosno 5%. U ovom ogledu dokazano je da *B. velezensis* već pri koncentraciji od 1% značajno inhibira porast micelije *Fusarium* vrsta. Ove razlike mogu da ukazuju na različiti antifungalni potencijal različitih vrsta iz roda *Bacillus*.

Podaci o ispitivanju *in vivo* efekata *Bacillus* spp. na rast i razvoj *F. avenaceum* postoje u literaturi i ukazuju da ispoljava snažno inhibitorno dejstvo (Petreš et al., 2019; Grahovac et al., 2017; Mardanova et al., 2017; Wachowska et al., 2013). Isto tako, u istraživanjima je dokazan

inhibitorni efekat ovog agensa i prema drugim prouzročivačima truleži plodova jabuke (Li et al., 2013; Jamalizadeh et al., 2009). Sve prethodno navedeno je potvrđeno u ovom radu gde je, takođe, zabeležena značajna inhibicija razvoja nekroze na plodovima jabuke u svim primenjenim koncentracijama.

Snažno antifungalno dejstvo agensa *S. hygroscopicus* zabeleženo je u istraživanjima drugih autora (Mitrović et al., 2020; Grahovac et al., 2014) koji ukazuju na visok antifungalni potencijal ovog agensa prema vrsti *F. avenaceum*. Ovim rezultatima je to potvrđeno i to u *in vivo* uslovima na plodovima jabuke. Takođe, veoma značajan rezultat predstavlja zabeleženi isti stepen inhibicije razvoja nekroze primenom dve veoma različite koncentracije metabolita *S. hygroscopicus*. Naime, primenjene koncentracije se veoma razlikuju, gde je prva koncentracija 20 puta niža od druge, a ostvareni efekat je isti, što, sa aspekta ekonomičnosti proizvodnje metabolita *S. hygroscopicus* kao biološkog agensa, ukazuje na potrebu ispitivanja efekata nižih koncentracija.

Ispitivani biološki agens *B. velezensis* je ispoljio značajan inhibitorni efekat na razvoj nekroze na plodovima jabuke, nezavisno od koncentracije primene. Veoma je značajan rezultat da je sa nižom koncentracijom zabeležen jači inhibitorni efekat u poređenju sa višom, dvostruko većom koncentracijom ispitivanog agensa. Međutim, drugi istraživači nisu dobili ovakve rezultate. Naime, Grahovac i sar. (2019) ispitali su uticaj *B. velezensis* na razvoj *C. acutatum* i došli do zaključka da, iako je snažno inhibitorno dejstvo agensa zabeleženo u *in vitro* ogledu, isto nije dokazano u *in vivo* ogledu na plodovima jabuke. Ipak, Kim et al. (2021) su svojim ogledima utvrdili da *B. velezensis* uspešno suzbija razvoj nekroze prouzrokovane od *C. gloeosporioides* u *in vivo* ogledu sa plodovima jabuke, ali i smanjuje incidencu pojave zaraze u toku vegetacije ukoliko se primeni u proizvodnom zasadu.

7.7.3. Uticaj tretmana toplom vodom na *Fusarium* spp.

Dobijeni rezultati u *in vitro* ogledu ukazuju da inhibitorni efekat toplotnih tretmana značajno varira u zavisnosti od temperature i dužine izlaganja određenoj temperaturi. Potpunu inhibiciju micelijskog rasta u slučaju oba izolata ispoljilo je nekoliko tretmana: 50 °C u trajanju 10 i 15 minuta, 53 °C u trajanju 3, 5 i 10 minuta i 57 °C u trajanju od 3 i 5 minuta. U slučaju vrste *F. graminearum*, tretmani 45 °C u trajanju od 15 i 20 minuta, 53 °C u trajanju od 1 minut i

60 °C u trajanju od 1 minut i 30 sekundi su u potpunosti inhibirali porast micelije, dok u slučaju vrste *F. avenaceum* inhibicija nije bila potpuna. Prema podacima Maxin et al. (2012) efektivna temperatura na kojoj inhibirano klijanje 50% spora nakon izlaganja u trajanju od 3 minuta se razlikuje kod različitih vrsta, pa je tako najosetljivija *N. alba*, zatim *N. galligena* i *B. cinerea*, dok je vrsta *P. expansum* ispoljila najveću toleranciju prema povišenoj temperaturi. Ovo je saglasno sa podacima u ovom radu, gde je uočeno da različite vrste istog roda različito reaguju na uticaj temperature. Tako je micelijski rast *F. graminearum* bio potpuno inhibiran primenom određenih temperatura i perioda izlaganja, dok u slučaju *F. avenaceum* isti tretmani nisu izazvali potpunu inhibiciju.

Rezultati *in vivo* oglada ukazuju da je Tretman 1 (53 °C, 3 min) ispoljio najjači inhibitorski efekat na razvoj nekroze na plodovima, što je u skladu sa rezultatima istraživanja Petreš i sar. (2018) gde je toplotni tretman 53 °C u trajanju 3 minuta na plodovima jabuke sorte Zlatni delišes ispoljio značajan potencijal za suzbijanje fuzarijone truleži. Ovo se svakako može objasniti antifungalnim dejstvom primenjene temperature. Međutim, Di Francesco et al. (2017) navode da se odbrambeni odgovor plodova jabuke protiv patogena može aktivirati tretmanima toplom vodom, pa se antifungalna aktivnost tretmana iz ovog oglada može vrlo verovatno objasniti i aktiviranjem odbrambenog odgovora u plodovima jabuke. Nadalje, Maxin et al. (2014) navode da temperature između 50 i 52 °C ispoljavaju visoku efikasnost protiv većine prouzrokovaca truleži plodova jabuke, osim *F. avenaceum*, što je dokazano i u *in vitro* i u *in vivo* ogledu. Takođe, isti autori navode da je primećeno da temperatura od 53 °C i viša utiče na pojačano propadanje plodova, jer se na tim temperaturama javljaju fiziološka oštećenja ploda jabuke. Iako u ovom ogledu nisu otkrivena vidljiva oštećenja na tretiranim plodovima, u istraživanju Petreš i sar. (2018) registrovana su značajna vidljiva oštećenja na 57 °C i periodu izlaganja od 3 min na tretiranim plodovima sorte Zlatni delišes. Ovo se može objasniti različitom tolerancijom različitih sorti na temperature. Takođe, Petreš et al. (2020) navode da veoma male razlike u temperaturi i trajanja perioda izlaganja mogu da dovedu do izostanka efekta tretmana ili do umanjenja kvaliteta, pa čak i do oštećenja tretiranih plodova. Nadalje, Trierweiler et al. (2003) utvrdili su da je na plodovima jabuka sorte Elstar, skladištenim u hladnjači na 1 °C, prethodno tretiranim toplotnim tretmanima (53 °C tokom 2 minuta) pojava truleži na plodovima prouzrokovane vrstom *Gloeosporium* bila značajno manja u poređenju sa netretiranim plodovima. Takođe, isti autor navodi da je tretiranjem plodova toplom vodom pri 57 °C tokom 2

minuta prouzrokovano smanjenje kvaliteta plodova. Ove tvrdnje su u suprotnosti sa rezultatima dobijenim u ovom ogledu, jer je Tretman 4 (57 °C, 5 minuta) ispoljio najjaču inhibiciju nekroze bez štetnih efekata na plodovima čuvanim u hladnjači, a takođe je visoka efikasnost zabeležena i u slučaju plodova skladištenim na sobnoj temperaturi. Karabulut et al. (2010) su utvrdili da je razvoj truleži na plodovima nektarine tretiranim toplom vodom pri temperaturi od 60 °C bio intenzivniji na plodovima čuvanim u hladnjači nego na plodovima skladištenim na 20 °C, zbog opstanka inokuluma gljive. Kako je Tretman 4 (57 °C, 5 min) ispoljio jaču inhibiciju u poređenju sa ostalim tretmanima tokom skladištenja u hladnjači, možemo pretpostaviti da je ovaj tretman ispoljio značajno jači dugoročan antimikrobni efekat.

U ponovljenom ogledu utvrđene su optimalne temperature i periodi izlaganja za obe vrste i za sorte jabuke Fuji i Zlatni delišes, međutim predviđene temperature nisu iskazale zadovoljavajući inhibitorni efekat u slučaju *F. avenaceum*, dok je kod *F. graminearum* zabeležena statistički značajna inhibicija. Ovaj rezultat je ponovo u skladu sa gore spomenutm tvrdnjom Maxin et al. (2014) da temperature između 50 i 52 °C ispoljavaju visoku efikasnost protiv većine prouzrokovala truleži plodova jabuke, međutim, nisu dovoljne za suzbijanje *F. avenaceum*.

7.7.4. Uticaj primene 1-MCP i dinamički kontrolisane atmosfere (DCA) u skladištu na razvoj fuzariozne truleži plodova jabuke

U ovom ogledu zabeleženo je da je tretman 1-MCP značajno uticao na razvoja nekroze na plodovima jabuke. Tokom čuvanja u hladnjači nekroza na plodovima jabuke tretiranim sa 1-MCP bila je znatno manja u poređenju sa netretiranim plodovima. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima koje su objavili Jeziorek et al. (2010) koji ukazuju da tretman sa 1-MCP smanjuje gubitke uzrokovane fitopatogenim gljivama, uglavnom *B. cinerea*, *N. perennans* i *P. expansum*. Sa druge strane, Kitemann et al. (2015) navode da je pojava truleži bila nešto veća na plodovima jabuke sorte Jonagold čuvanim u ULO uslovima na 5 °C tretiranim sa 1-MCP, dok je pojava truleži bila značajno smanjena na sorti Pinova. Sposobnost 1-MCP da smanji pojavu truleži plodova jabuke varira u zavisnosti od faze sazrevanja plodova, pa su tako efekti bili minimalni ili su izostali na kasno ubranim plodovima (Lafer, 2006). Prema Su i Gubler (2012) tretman 1-MCP

može smanjiti trulež plodova paradajza nakon berbe prouzrokovane gljivama *A. alternata*, *B. cinerea* i *Fusarium* spp. tokom određenog perioda skladištenja. Štaviše, McArtney et al. (2011) zabeležili su značajan efekat 1-MCP tretmana u smanjenju pojave truleži na plodovima jabuke uzrokovane fitopatogenim gljivama. Takođe, kvalitet plodova jabuke je čak poboljšan primenom 1-MCP, jer su, prema Moor et al. (2007), tretirani plodovi sadržavali više vitamina C, gubitak ukupnih kiselina je bio smanjen, dok je pojava truleži plodova smanjena za 30%. Li et al. (2017) utvrdili su da 1-MCP pojačava oksidativno oštećenje spora i micelija *P. expansum* i uništava integritet membrane spora i tako inhibira razvoj truleži na plodovima jabuke. Prema Gago et al. (2015), tokom čuvanja na sobnoj temperaturi tokom sedam dana, a nakon čuvanja u hladnjači, pojava truleži je bila manja kod plodova tretiranih sa 1-MCP nego u slučaju netretiranih plodova. Köpcke (2015) navodi da 1-MCP i DCA odlažu sazrevanje i produžavaju rok čuvanja plodova, međutim, uticaj 1-MCP se pokazao kao značajniji od DCA uslova čuvanja. Ove tvrdnje su delimično saglasne sa rezultatima dobijenim u ovom ogledu. Nakon što su plodovi iskladišteni, na plodovima tretiranim sa 1-MCP i čuvanim u DCA razvijeni prečnik nekroze posle sedam dana je bio nešto manji u poređenju sa netretiranim plodovima, ali posle 14 dana na plodovima tretiranim sa 1-MCP i čuvanim u DCA hladnjači se razvila veća nekroza nego na netretiranim plodovima čuvanim u DCA i onim čuvanim na sobnoj temperaturi. Zbog toga se može pretpostaviti da 1-MCP inhibira razvoj nekroze tokom skladištenja, ali po prestanku skladištenja, inhibitorni efekat 1-MCP prestaje. Ovo je u skladu sa rezultatima Fallik et al. (2001) koji navode da je brži razvoj nekroze započeo nakon iskladištenja. Međutim, nakon šest meseci čuvanja u hladnjači, Juhnevic-Radenkova et al. (2016) navode da nema značajnijih razlika u broju CFU (colony forming units) mikroorganizama prisutnih na plodovima tretiranim sa 1-MCP i čuvanim u hladnjačama u poređenju sa netretiranim plodovima. Grahovac et al. (2016) navode dugotrajni inhibitorni efekat čuvanja plodova u hladnjači na agresivnost *C. gleosporoides* i *C. acutatum*. Međutim, isti autori su primetili da, ukoliko inokulum nije u potpunosti inaktiviran, simptomi se javljaju nakon četiri dana inkubacije na sobnoj temperaturi.

Brzina razvoja nekroze (NDR) je varirala u zavisnosti od uslova skladištenja i primene tretmana sa 1-MCP. Najmanji NDR je zabeležen na tretiranim plodovima tokom 143 dana dugog perioda skladištenja u DCA hladnjači. Ovi rezultati su slični rezultatima Tarlanović et al. (2017) koji navode da je NDR bio veoma nizak tokom čuvanja na niskim temperaturama. Nadalje, utvrđeno je da se NDR brzo povećava tokom inkubacije na sobnoj temperaturi. Najveći NDR

zabeležen je nakon 14 dana inkubacije na sobnoj temperaturi na tretiranim plodovima čuvanim u DCA hladnjači, kao i nakon 21 dana i na tretiranim i na netretiranim plodovima čuvanim samo na sobnoj temperaturi. Rezultati ukazuju da i 1-MCP i DCA uslovi skladištenja imaju sposobnost da inhibiraju razvoj truleži na plodu jabuke, ali jačina inhibicije u velikoj meri zavisi od karakteristika samog patogena.

8. ZAKLJUČCI

Na osnovu sprovednih istraživanja mogu se doneti sledeći zaključci:

- Zastupljenost *Fusarium* vrsta na plodovima jabuke sa simptomima truleži na teritoriji AP Vojvodine se kretala od 17,74%, tokom 2016. godine, 7,94% tokom 2017. godine, do 11,21% tokom 2018. godine, dok prosečna zastupljenost za trogodišnji period iznosi 10,94%. Ovo ukazuje da, iako je prisustvo varijabilno, svake godine postoji značajna zastupljenost vrsta roda *Fusarium* na uskladištenim plodovima jabuke, a imajući u vidu njihov toksigeni kapacitet, prisutan je značajan rizik od kontaminacije plodova i proizvoda od plodova jabuke mikotoksinima.
- Ispitivani izolati ispoljavaju veliku varijabilnost u morfološkim karakteristikama na hranljivim podlogama. Izolati su grupisani na osnovu izgleda kolonije i raspoređeni u četiri morfološke grupe. Na osnovu karakteristika izolati prve grupe su identifikovani kao vrsta *F. graminearum* (vazдушna micelija, ružičaste boje koja starenjem požuti u centru, ravan obod kolonije, pigmentacija podloge je ružičasta, kolonija se zrakasto širi u podlozi), dok su izolati druge, treće i četvrte grupe identifikovani kao pripadnici vrste *F. avenaceum* (vazдушna micelija, boja se kreće od bele preko žute, blede ružičaste do ružičaste, obod ravan ili talasast, pigmentacija podloge od bele, žute, ružičaste do bordo boje sa mramorastim šarama, kolonija se zrakasto se širi u podlozi).
- Izolati vrste *F. graminearum* formiraju polni stadijum u laboratorijskim uslovima, odnosno homotalusni su, dok izolati iz ostalih grupa ne formiraju polni stadijum i pripadaju heterotalusnoj vrsti *F. avenaceum*.
- Univerzalnim prajmerima ITS1/ITS4 i EF1/EF2 sekvence ciljnih regiona se mogu uspešno amplifikovati i koristiti za filogenetsku analizu, dok se *F. avenaceum* može pouzdano detektovati prajmerima specifičnim za vrstu (FA-ITSF/FA-ITSR).
- Izolati *F. avenaceum* i *F. graminearum* izolovani iz plodova jabuke u AP Vojvodini tokom tri godine (2016 – 2018) ispoljavaju kapacitet za proizvodnju mikotoksina zearalenon i deoksinivalenol, kako na hranljivoj AA podlozi, tako i na plodovima jabuke,

što ukazuje na neophodnost daljeg proučavanja ovog problema, pronalaženja rešenja, kao i unapređenja kontrole i nadzora, s obzirom da su Pravilnikom o maksimalnim koncentracijama određenih kontaminanata u hrani („Sl. glasnik RS“ br. 81/2019, 126/2020, 90/2021) i Regulativom Evropske komisije (EC) broj 1881/2006 definisane samo maksimalno dozvoljene koncentracije patulina u proizvodima od jabuke.

- Analizom genoma bioinformatičkim alatima potvrđen je izuzetno veliki potencijal oba ispitivana izolata za proizvodnju različitih sekundarnih metabolita, uključujući i mikotoksine.
- Etarska ulja *Origanum vulgare*, *Satureja hortensis*, *Ocimum basilicum* i *Salvia sclarea*, kao i hidrolat etarskog ulja *Satureja hortensis* ispoljavaju snažno antifungalno dejstvo protiv prouzrokovaca fuzariozne truleži plodova jabuke, što ukazuje na njihov veliki potencijal za suzbijanje fuzariozne truleži uskladištenih plodova jabuke.
- Biološki agensi *Bacillus* spp. i *S. hygroscopicus* snažno inhibiraju razvoj izolata *Fusarium* spp. poreklom u sledećim koncentracijama: *Bacillus* spp. (1,5; 2 i 2,5%) i *S. hygroscopicus* (4 i 5%) *in vitro*. U *in vivo* ispitivanju viša ispitana koncentracija (5%) biološkog agensa *Bacillus* spp. je ispoljila snažno inhibitorno dejstvo na razvoj truleži, dok su u slučaju *S. hygroscopicus* obe koncentracije (5 i 100%) ispoljile snažno inhibitorno dejstvo na razvoj truleži. Utvrđeno je da razlike između testiranih koncentracija nisu statistički značajne što, sa aspekta ekonomičnosti proizvodnje metabolita *S. hygroscopicus* kao biološkog agensa, ukazuje na potrebu ispitivanja efekata nižih koncentracija;
- Biološki agens *B. velezensis* snažno inhibira rast kolonija testiranih izolata u *in vitro* ogledu u svim testiranim koncentracijama. Najjača inhibicija zabeležena je prilikom primene najviše koncentracije (10%), dok razlika između inhibitornog efekta primenjenih koncentracija 2% i 5% nije statistički značajna ili uopšte ne postoji, što je vrlo značajan podatak, s obzirom da je ostvareni efekat isti sa značajno nižom koncentracijom. U *in vivo* ogledu takođe je dobijen veoma značajan rezultat da se sa nižom koncentracijom (5%) ostvaruje jači inhibitorni efekat u poređenju sa dvostruko višom koncentracijom (10%) ispitivanog agensa;

- Tretmani toplom vodom poseduju visoki potencijal za suzbijanje oba prouzrokovaca fuzariozne truleži plodova jabuke, s time da je za inhibiciju vrste *F. avenaceum* neophodna viša temperatura i duži period izlaganja u odnosu na vrstu *F. graminearum*;
- Tretman jedinjenjem 1-MCP značajno utiče na razvoja nekroze na plodovima jabuke. Nekroza na plodovima tretiranim sa 1-MCP tokom čuvanja u hladnjači bila je znatno manja u poređenju sa netretiranim plodovima. Međutim, utvrđeno je da 1-MCP i DCA uslovi skladištenja inhibiraju razvoj nekroze tokom skladištenja, ali po prestanku skladištenja njihov inhibitorni efekat prestaje.

9. LITERATURA

1. Abd-El-Latif, F. M. (2016): Postharvest Application of Some Essential Oils for Controlling Gray and Blue Moulds of Apple Fruits. *Plant Pathology Journal*, 15 (1): 5 – 10.
2. Aćimović, M., Kiprovski, B., Rat, M., Sikora, V., Popović, V., Koren, A., Brdar-Jokanović, M. (2018): *Salvia sclarea*: chemical composition and biological activity. *Journal of Agronomy, Technology and Engineering Management*, 1 (1): 18 – 28.
3. Agrios, N. (2005): *Agrios, Plant Pathology*. Academic Press, San Diego, USA.
4. Akbudak, B., Ozer, M. H., Erturk, U., Cavusoglu, S. (2009): Response of 1-methylcyclopropene treated “Granny Smith” apple fruit to air and controlled atmosphere storage conditions. *Journal of Food Quality*, 32: 18 – 33.
5. Akinsanmi, O. A., Mitter, V., Simpfendorfer, S., Backhouse, D., Chakraborty, S. (2004): Identity and pathogenicity of *Fusarium* spp. isolated from wheat fields in Queensland and northern New South Wales. *Australian Journal of Agricultural Research*, 55 (1): 97 – 107.
6. Al-Maqtoufi, M., Thornton, C. R. (2016): Detection of human pathogenic *Fusarium* species in hospital and communal sink biofilms by using a highly specific monoclonal antibody. *Environmental Microbiology*, 18 (11): 3620 – 3634.
7. Anusha, B. G., Gopalakrishnan, S., Naik, M. K., Sharma, M. (2019): Evaluation of *Streptomyces* spp. and *Bacillus* spp. for biocontrol of Fusarium wilt in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 52 (5-6): 417 – 442.
8. Aoki, T., O'Donnell, K., Geiser, D. M. (2014): Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. *Journal of General Plant Pathology*, 80: 189 – 201.
9. Ayhan, D. H., López-Díaz, C., Di Pietro, A., Ma, L.-J. (2018): Improved Assembly of Reference Genome *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Strain Fol4287. *Microbiology Resource Announcements*, 7: e00910 – 18.

10. Babadoost, M. (2018): Fusarium: Historical and Continued Importance. In: Askun, T. (ed.): Fusarium - Plant Diseases, Pathogen Diversity, Genetic Diversity, Resistance and Molecular Markers. IntechOpen. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.74147>
11. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008): Biological effects of essential oils – A review. Food and Chemical Toxicology, 46 (2): 446 – 475.
12. Banani, H., Olivieri, L., Santoro, K., Garibaldi, A., Gullino, M. L., Spadaro, D. (2018): Thyme and Savory Essential Oil Efficacy and Induction of Resistance against *Botrytis cinerea* through Priming of Defense Responses in Apple. Foods, 7 (2): 11.
13. Bansal, Y., Singla, N., Kaistha, N., Sood, S., Chander, J. (2019): Molecular identification of *Fusarium* species complex isolated from clinical samples and its antifungal susceptibility patterns. Current Medical Mycology, 5 (4): 43 – 49.
14. Barik, B. P., Tayung, K. (2012): Molecular differentiation of *Fusarium* spp. with varied lifestyles based on TEF 1 alpha gene sequence analysis. Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences, 4 (3): 201 – 208.
15. Batista, B. G., Chaves, M. A., Reginatto, P., Saraiva, O. J., Fuentefria, A. M. (2020): Human fusariosis: An emerging infection that is difficult to treat. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 53: e20200013.
16. Blin, K., Shaw, S., Steinke, K., Villebro, R., Ziemert, N., Lee, S. Y., Medema, M. H., Weber, T. (2019): antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. Nucleic Acids Research, 47: W81 – W87.
17. Bogale, M., Wingfield, B. D., Wingfield, M. J., Steenkamp, E. T. (2007): Species-specific primers for *Fusarium redolens* and a PCR-RFLP technique to distinguish among three clades of *Fusarium oxysporum*. FEMS Microbiology Letters, 271 (1): 27 – 32.
18. Bolger, A. M., Lohse, M., Usadel, B. (2014): Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics, 30: 2114 – 2120.
19. Booth, C. (1971): The Genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, UK.
20. Brennan, J. M., Fagan, B., van Maanen, A., Cooke, B. M., Doohan, F. M. (2003): Studies on *in vitro* growth and pathogenicity of European *Fusarium* fungi. European Journal of Plant Pathology, 109: 577 – 587.

21. Brown, D. W., Proctor, R. H. (2016): Insights into natural products biosynthesis from analysis of 490 polyketide synthases from *Fusarium*. *Fungal Genetics and Biology*, 89: 37 – 51.
22. Burr, T. J., Schroth, N. M., Suslow, T. (1978): Increased potato yields by treatment of seedpieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *P. utida*. *Phytopathology*, 68: 1377 – 1383.
23. Busatto, N., Tadiello, A., Trainotti, L., Costa, F. (2017): Climacteric ripening of apple fruit is regulated by transcriptional circuits stimulated by cross-talks between ethylene and auxin. *Plant Signaling & Behavior*, 12 (1): e1268312.
24. Caffarra, A., Rinaldi, M., Eccel, E., Rossi, V., Pertot, I. (2012): Modelling the impact of climate change on the interaction between grapevine and its pests and pathogens: European grapevine moth and powdery mildew. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 148: 89 – 101.
25. Cameldi, I., Neri, F., Ventrucci, D., Ceredi, G., Muzzi, E., Mari, M. (2016): Influence of Harvest Date on Bull's Eye Rot of 'Cripps Pink' Apple and Control Chemical Strategies. *Plant Disease*, 100 (11): 2287 – 2293.
26. Cameron, D. L., Schröder, J., Penington, J. S., Do, H., Molania, R., Dobrovic, A., Speed, T. P., Papenfuss, A. T. (2017): GRIDSS: sensitive and specific genomic rearrangement detection using positional de Bruijn graph assembly. *Genome research*, 27 (12): 2050 – 2060.
27. Cao, Y., Ding, W., Liu, C. (2021): Unraveling the Metabolite Signature of Endophytic *Bacillus velezensis* Strain Showing Defense Response towards *Fusarium oxysporum*. *Agronomy*, 11 (4): 683.
28. Carmona-Hernandez, S., Reyes-Pérez, J. J., Chiquito-Contreras, R. G., Rincon-Enriquez, G., Cerdan-Cabrera, C. R., Hernandez-Montiel, L. G. (2019): Biocontrol of Postharvest Fruit Fungal Diseases by Bacterial Antagonists: A Review. *Agronomy*, 9 (3): 121.
29. Cavinder, B., Sikhakolli, U., Fellows, K. M., Trail, F. (2012): Sexual Development and Ascospore Discharge in *Fusarium graminearum*. *Journal of Visualized Experiments*, 61: e3895.
30. Cheffi, M., Bouket, A. C., Alenezi, F. N., Luptakova, L., Belka, M., Vallat, A., Rateb, M. E., Tounsi, S., Triki, M. A., Belbahri, L. (2019): *Olea europaea* L. Root Endophyte

- Bacillus velezensis* OEE1 Counteracts Oomycete and Fungal Harmful Pathogens and Harbours a Large Repertoire of Secreted and Volatile Metabolites and Beneficial Functional Genes. *Microorganisms*, 7 (9): 314.
31. Cuomo, C. A., Guldener, U., Xu, J.-R., Trail, F., Turgeon, B. G., Di Pietro, A., Walton, J. D., Ma, L. J., Baker, S. E., Rep, M., Adam, G., Antoniw, J., Baldwin, T., Calvo, S., Chang, Y. L., DeCaprio, D., Gale, L. R., Gnerre, S., Goswami, R. S., Hammond-Kosack, K., Harris, L. J., Hilburn, K., Kennell, J. C., Kroken, S., Magnuson, J. K., Mannhaupt, G., Mauceli, E., Mewes, H. W., Mitterbauer, R., Muehlbauer, G., Münsterkötter, M., Nelson, D., O'Donnell, K., Ouellet, T., Qi, W., Quesneville, H., Roncero, I. G., Seong, K. Y., Tetko, I. V., Urban, M., Waalwijk, C., Ward, T. J., Yao, J., Birren, B. W., Kistler, H. C. (2007): The *Fusarium graminearum* Genome Reveals a Link Between Localized Polymorphism and Pathogen Specialization. *Science*, 317 (5843): 1400 – 1402.
32. da Silva, F. P., Vechiato, M. H., Harakava, R. (2014): EF-1 α gene and IGS rDNA sequencing of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* and *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* reveals polyphyletic origin of strains. *Tropical Plant Pathology*, 39 (1): 64 – 73.
33. Daferera, D. J., Ziogas, B. N., Polission, M. G. (2003): The Effectiveness of Plant Essential Oils on the Growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Protection*, 22 (1): 39 – 44.
34. Dale, J., James, A., Paul, J.-Y., Khanna, H., Smith, M., Peraza-Echeverria, S., Garcia-Bastidas, F., Kema, G., Waterhouse, P., Mengersen, K., Harding, R. (2017): Transgenic Cavendish bananas with resistance to *Fusarium* wilt tropical race 4. *Nature Communications*, 8 (1): 1496.
35. De Billerbeck, V. G., Roques, C. G., Bessière, J.-M., Fonvieille, J.-L., Dargent, R. (2001): Effects of *Cymbopogon nardus* (L.) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. *Canadian Journal of Microbiology*, 47 (1): 9 – 17.
36. Degtyareva, E., Vinogradova, K., Aleksandrova, A., Filonenko, V., Kozhevin, P. (2009): Soil actinomycetes as potential biofungicides. *Moscow University Soil Science Bulletin*, 64 (2): 73 – 77.
37. Desjardins, A. E., Proctor, R. H. (2007): Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 47 – 50.

38. Di Francesco, A., Mari, M., Roberti, R. (2017): Defense response against postharvest pathogens in hot water treated apples. *Scientia Horticulturae*, 227: 181 – 186.
39. Dongzhen, F., Xilin, L., Xiaorong, C., Wenwu, Y., Yunlu, H., Yi, C., Jia, C., Zhimin, L., Litao, G., Tuhong, W., Xu, J., Chunsheng, G. (2020): *Fusarium* Species and *Fusarium oxysporum* Species Complex Genotypes Associated With Yam Wilt in South-Central China. *Frontiers in Microbiology*, 11: 1964.
40. Duduk, N., Obradović, A., Ivanović, M. (2010): Effects of Essential Oils from Thyme, Cinnamon and Clove on Mycelial Growth of *Colletotrichum acutatum*. *Pesticides and Phytomedicine*, 25 (2): 151 – 156.
41. Evans, J., Levesque, D., de Lahunta, A., Jensen, H. E. (2004): Intracranial Fusariosis: A Novel Cause of Fungal Meningoencephalitis in a Dog. *Veterinary Pathology*, 41 (5): 510 – 514.
42. Ewekeye, T. S., Oke, O. A., Quadri, A. I., Isikalu, A. O., Umenwaniri, M. O., Durosinni M. L. (2013): Studies on post harvest deterioration on some fruits and vegetables in selected markets in Lagos State, Nigeria. *American Journal of Research Communication*, 1 (10): 209 – 223.
43. Ezrari, S., Lahlali, R., Radouane, N., Tahiri, A., Lazraq, A. (2020): First report of *Fusarium equiseti* causing pre- and postharvest fruit rot on zucchini in Morocco. *Journal of Plant Pathology*, 102: 251.
44. Fallik, E., Tuvia-Alaklai, S., Copel, A., Wiseblum, A., Regev, R. (2001): A short hot water rinse and brushes: a technology to reduce postharvest losses – 4 years of research. *Proceedings of the 4th International Conference on Postharvest Science. Acta Horticulturae*, 553: 413 – 416.
45. FAOSTAT (2019): FAO statistical database. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
46. Feng, J., Hwang, R., Chang, K. F., Hwang, S. F., Strelkov, S. E. Gossen, B. D., Conner, R. L., Turnbull, G. D. (2010): Genetic variation in *Fusarium avenaceum* causing root rot on field pea. *Plant Pathology*, 59: 845 – 852.
47. Fernández-Cruz, M. L., Mansilla, M. L., Tadeo, J. L. (2010): Mycotoxins in fruits and their processed products: Analysis, occurrence and health implications. *Journal of Advanced Research*, 1 (2): 113 – 122.

48. Fernández-Ortuño, D., Loza-Reyes, E., Atkins, S. L., Fraaije, B. A. (2010): The CYP51C gene, a reliable marker to resolve interspecific phylogenetic relationships within the *Fusarium* species complex and a novel target for species-specific PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 144 (2): 301 – 309.
49. Ferrigo, D., Raiola, A., Causin, R. (2016): *Fusarium* Toxins in Cereals: Occurrence, Legislation, Factors Promoting the Appearance and Their Management. *Molecules*, 21: 627.
50. Forbes, R. S., Dickinson, C. H. (1977): Behaviour of *Fusarium avenaceum* in soil growth analysis plates. *Transactions of the British Mycological Society*, 69 (2): 197 – 205.
51. Fruk, G. (2014): Uloga toplinskih tretmana i sastava pektina u pojavi ozljeda plodova nektarine (*Prunus persica* var. *nectarina* Ait.) od niskih temperatura tijekom čuvanja. Doktorski rad. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet.
52. Fu, G., Huang, S., Ye, Y., Wu, Y., Cen, Z., Lin, S. (2010): Characterization of a bacterial biocontrol strain B106 and its efficacies on controlling banana leaf spot and post-harvest anthracnose diseases. *Biological Control*, 55 (1): 1 – 10.
53. Gago, C. M. L., Guerreiro, A. C., Miguel, G., Panagopoulos, T., Sánchez, C., Antunes M. D. C. (2015): Effect of harvest date and 1-MCP (SmartFresh™) treatment on ‘Golden Delicious’ apple cold storage physiological disorders. *Postharvest Biology and Technology*, 110: 77 – 85.
54. Gao, L. L., Zhang, Q., Sun, X. Y., Jiang, L., Zhang, R., Sun, G. Y., Zha, Y. L., Biggs, A. R. (2013): Etiology of Moldy Core, Core Browning, and Core Rot of Fuji Apple in China. *Plant Disease*, 97 (4): 510 – 516.
55. Gasser, F., Good, C., Naef, A. (2015): Hot water treatment of selected organic apple and pear cultivars. *Acta Horticulturae*, 1079: 391 – 396.
56. Geiser, D. M., Jiménez-Gasco, M. M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T. J., Zhang, N., Kuldau, G. A., O’Donnell, K. (2004): FUSARIUM-IDv.1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 473 – 479.
57. Geiser, D. M., Aoki, T., Bacon, C. W., Baker, S. E., Bhattacharyya, M. K., Brandt, M. E., Brown, D. W., Burgess, L. W., Chulze, S., Coleman, J. J., Correll, J. C., Covert, S. F., Crous, P. W., Cuomo, C. A., De Hoog, G. S., Di Pietro, A., Elmer, W. H., Epstein, L.,

- Frandsen, R. J. N., Freeman, S., Gagkaeva, T., Glenn, A. E., Gordon, T. R., Gregory, N. F., Hammond-Kosack, K. E., Hanson, L. E., del Mar Jiménez-Gasco, M., Kang, S., Kistler, H. C., Kuldau, G. A., Leslie, J. F., Logrieco, A., Lu, G., Lysøe, E., Ma, L. J., McCormick, S. P., Migheli, Q., Moretti, A., Munaut, F., O'Donnell, K., Pfenning, L., Ploetz, R. C., Proctor, R. H., Rehner, S. A., Robert, V. A. R. G., Rooney, A. P., bin Salleh, B., Scandiani, M. M., Scauflaire, J., Short, D. P. G., Steenkamp, E., Suga, H., Summerell, B. A., Sutton, D. A., Thrane, U., Trail, F., Van Diepeningen, A., VanEtten, H. D., Viljoen, A., Waalwijk, C., Ward, T. J., Wingfield, M. J., Xu, J. R., Yang, X. B., Yli-Mattila, T., Zhang, N. (2013): One fungus, one name: defining the genus *Fusarium* in a scientifically robust way that preserves longstanding use. *Phytopathology*, 103: 400 – 408.
58. Gleason, F. H., Allerstorfer, M., Lilje, O. (2019): Newly emerging diseases of marine turtles, especially sea turtle egg fusariosis (SEFT), caused by species in the *Fusarium solani* complex (FSSC). *Mycology*, 11 (3): 184 – 194.
59. Glenn, A. E., Zitomer, N. C., Zimeri, A. M., Williams, L. D., Riley, R. T., Proctor, R. H. (2008): Transformation-Mediated Complementation of a FUM Gene Cluster Deletion in *Fusarium verticillioides* Restores both Fumonisin Production and Pathogenicity on Maize Seedlings. *MPMI*, 21 (1): 87 – 97.
60. Grahovac, M., Inđić, D., Lazić, S., Vuković, S. (2009): Biofungicidi i mogućnosti primene u savremenoj poljoprivredi. *Pesticidi i fitomedicina*, 24 (4): 245 – 258.
61. Grahovac, M., Inđić, D., Tanović, B., Lazić, S., Vuković, S., Hrustić, J., Gvozdenović, S. (2011): Integralna zaštita jabuka od prouzrokovala truleži u skladištima. *Pesticidi i fitomedicina*, 26 (4): 289 – 299
62. Grahovac, M., Hrustić, J., Tanović, B., Inđić, D., Vuković, S., Mihajlović, M., Gvozdenac, S. (2012): *In Vitro* Effects of Essential Oils on *Colletotrichum* spp. *Agriculture & Forestry*, 57 (11): 7 – 15.
63. Grahovac, M. (2014): Biološko suzbijanje *Colletotrichum* spp. parazita uskladištenih plodova jabuke. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet.

64. Grahovac, M., Balaž, J., Grahovac, J., Dodić, J., Tanović, B., Hrustić, J., Tadijan, I. (2014): Screening of antagonistic activity of selected microorganisms against apple rot pathogens. *Romanian Biotechnological Letters*, 19 (1): 8959 – 8965.
65. Grahovac, M., Balaž, J., Tanović, B., Hrustić, J., Vučinić, N., Delibašić, G., Maširević, S. (2016): Effect of different storage conditions of apple fruits on *Colletotrichum* species virulence. *Romanian Biotechnological Letters*, 21 (1): 11225 – 11231.
66. Grahovac, M., Petreš, M., Grahovac, J., Hrustić, J., Mihajlović, M., Dodić, J., Budakov, D. (2017): Effect of *Bacillus* spp. and *Streptomyces hygroscopicus* metabolites on mycelial growth of *Fusarium avenaceum*. *Organic Agriculture for Agrobiodiversity Preservation*: 109.
67. Grahovac, M., Loc, M., Stojšin, V., Petreš, M., Tanović, B., Bagi, F., Budakov, D. (2019): Efficacy of *Bacillus subtilis* (strain BS10) in control of *Botrytis cinerea* in strawberry. *International IOBC/WPRS Workshop on Integrated Plant Protection of soft fruits*, 144: 101 – 106.
68. Grahovac, M., Panić, M., Petreš, M., Grahovac, J., Loc, M., Medić, J., Pajčin, I. (2019): Efekti *Bacillus velezensis* na *Colletotrichum acutatum* - prouzrokovala gorke truleži jabuke. *Biljni lekar*, 47 (4): 223 – 234.
69. Grantina-Ievina, L. (2015): Fungi Causing Storage Rot of Apple Fruit in Integrated Pest Management System and their Sensitivity to Fungicides. *Rural Sustainability Research*, 34 (329): 2 – 10.
70. Guarro, J. (2013): Fusariosis, a complex infection caused by a high diversity of fungal species refractory to treatment. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* volume, 32 (12): 1491 – 1500.
71. Harčárová, M., Čonková, E., Proškovcová, M., Váczi, P., Marcinčáková, D., Bujňák, L. (2021): Comparison of antifungal activity of selected essential oils against *Fusarium graminearum* *in vitro*. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, <https://doi.org/10.26444/aaem/137653>
72. Härtig, E., Jahn, D. (2012): Chapter Five - Regulation of the Anaerobic Metabolism in *Bacillus*, in *Advances in Bacterial Respiratory Physiology*, in Poole, R. K. (ed), *Advances in Microbial Physiology*, Academic Press, Volume 61: 195 – 216.
73. Hof, H. (2020): The Medical Relevance of *Fusarium* spp. *Journal of Fungi*, 6 (3): 117.

74. Holtz, M. D., Chang, K. F., Hwang, S. F., Gossen, B. D., Strelkov, S. E. (2011): Characterization of *Fusarium avenaceum* from lupin in central Alberta: genetic diversity, mating type and aggressiveness. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 33 (1): 61 – 76.
75. Hwang, S. F. (1994): Potential for integrated biological and chemical control of seedling rot and preemergence damping-off caused by *Fusarium avenaceum* in lentil with *Bacillus subtilis* and Vitaflo®-280. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz / Journal of Plant Diseases and Protection*, 101 (2): 188 – 199.
76. Jamalizadeh, M., Etebarian, H., Aminian, H., Alizadeh, A. (2009): Evaluation of *Bacillus* spp. as Potential Biocontrol Agent for Postharvest Gray Mold Control on Golden Delicious Apple in Iran. *Journal of Plant Protection Research*, 49 (4): 405 – 410.
77. Jamalizadeh, M., Etebarian, H. R., Aminian, H., Alizadeh, A. (2010): Biological control of *Botrytis mali* on apple fruit by use of *Bacillus* bacteria, isolated from the rhizosphere of wheat. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 43 (18): 1836 – 1845.
78. Jeziorek, K., Woźniak, M., Tomala, K. (2010): Response of ‘Golden Delicious’ apples to postharvest application of 1-methylcyclopropene (1-MCP) in conditions of normal and controlled atmosphere. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 18 (2): 223 – 237.
79. Jimenez-Garcia, S. N., Garcia-Mier, L., Garcia-Trejo, J. F., Ramirez-Gomez, X. S., Guevara-Gonzalez, R. G., Feregrino-Perez, A. A. (2018): *Fusarium* Mycotoxins and Metabolites that Modulate Their Production. In: Askun, T. (ed.): *Fusarium - Plant Diseases, Pathogen Diversity, Genetic Diversity, Resistance and Molecular Markers*. IntechOpen. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.72874>
80. Joshi, R. K. (2014): Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Ocimum basilicum* L. (sweet basil) from Western Ghats of North West Karnataka, India. *Ancient science of life*, 33 (3): 151 – 156.
81. Ju, R., Zhao, Y., Li, J., Jiang, H., Liu, P., Yang, T., Bao, Z., Zhou, B., Zhou, X., Liu, X. (2013): Identification and evaluation of a potential biocontrol agent, *Bacillus subtilis*, against *Fusarium* sp. in apple seedlings. *Annals of Microbiology*, 64 (1): 377 – 383.
82. Juhnevica-Radenkova, K., Radenkovs, V., Seglina, D. (2016): Influence of 1-MCP treatment and storage conditions on the development of microorganisms on the surface of apples grown in Latvia. *Zemdirbyste-Agriculture*, 103 (2): 215 – 220.

83. Karabulut, O. A., Smilanick, J. L., Crisosto, C. H., Palou, L. (2010): Control of brown rot of stone fruits by brief heated water immersion treatments. *Crop Protection*, 29: 903 – 906.
84. Kawabe, M., Katsube, K., Yoshida, T., Arie, T., Tsuchiya, K. (2007): Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae* in Japan based on phylogenetic analyses of rDNA-IGS and MAT1 sequences. *Journal of General Plant Pathology*, 73: 353 – 359.
85. Kerényi, Z., Moretti, A., Waalwijk, C., Oláh, B., Hornok, L. (2004): Mating Type Sequences in Asexually Reproducing *Fusarium* Species. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (8): 4419 – 4423.
86. Keserović, Z., Magazin, N., Injac, M., Totis, F., Milić, B., Dorić, M., Petrović, J. (2014): Integralna proizvodnja jabuke, drugo prošireno izdanje. Društvo voćara Vojvodine i Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet.
87. Khaldi, N., Seifuddin, F. T., Turner, G., Haft, D., Nierman, W. C., Wolfe, K. H., Fedorova, N. D. (2010): SMURF: Genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters. *Fungal Genetics and Biology*, 47: 736 – 741.
88. Kim, H. S., Lohmar, J. M., Busman, M., Brown, D. W., Naumann, T. A., Divon, H. H., Lysøe, E., Uhlig, S., Proctor, R. H. (2020): Identification and distribution of gene clusters required for synthesis of sphingolipid metabolism inhibitors in diverse species of the filamentous fungus *Fusarium*. *BMC Genomics*, 21: 510.
89. Kim, Y. S., Lee, Y., Cheon, W., Park, J., Kwon, H. T., Balaraju, K., Kim, J., Yoon, Y. J., Jeon, Y. (2021): Characterization of *Bacillus velezensis* AK-0 as a biocontrol agent against apple bitter rot caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Scientific Reports*, 11: 626.
90. King, R., Urban, M., Hammond-Kosack, M. C., Hassani-Pak, K., Hammond-Kosack, K. E. (2015): The completed genome sequence of the pathogenic ascomycete fungus *Fusarium graminearum*. *BMC genomics*, 16 (1): 544.
91. Kitemann, D., McCormick, R., Neuwald, D. A. (2015): Effect of high temperature and 1-MCP application or dynamic controlled atmosphere on energy savings during apple storage. *European Journal of Horticultural Science*, 80 (1): 33 – 38.
92. Konstantinou, S., Karaoglanidis, G. S., Bardas, G. A., Minas, I. S., Doukas, E., Markoglou A. N. (2011): Postharvest fruit rots of apple in Greece: Pathogen incidence

- and relationships between fruit quality parameters, cultivar susceptibility, and patulin production. *Plant Disease*, 95 (6): 666 – 672.
93. Köpcke, D. (2015): 1-Methylcyclopropene (1-MCP) and dynamic controlled atmosphere (DCA) applications under elevated storage temperatures: Effects on fruit quality of 'Elstar', 'Jonagold' and 'Gloster' apple (*Malus domestica* Borkh.). *European Journal of Horticultural Science*, 80 (1): 25 – 32.
94. Kou, L. P., Gaskins, V. L., Luo, Y. G., Jurick II, W. M. (2014): First Report of *Fusarium avenaceum* Causing Postharvest Decay of 'Gala' Apple Fruit in the United States. *Plant Disease*, 98 (5): 690.
95. Krsmanović, S., Grahovac, M., Medić, J., Stojšin, V., Petreš, M. (2018): Struktura populacije prouzrokovala truleži uskladištenih plodova jabuke. *Biljni lekar*, 46 (5): 563-569.
96. Kurtz, S., Phillippy, A., Delcher, A. L., Smoot, M., Shumway, M., Antonescu, C., Salzberg, S. L. (2004): Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome Biology*, 5: R12.
97. Kuźma, L., Kalemba, D., Rózalski, M., Rózalska, B., Wieckowska-Szakiel, M., Krajewska, U., Wysokińska, H. (2009): Chemical composition and biological activities of essential oil from *Salvia sclarea* plants regenerated *in vitro*. *Molecules*, 14 (4): 1438 – 1447.
98. Lafer, G. (2006): Storability and fruit quality of 'Golden Delicious' as affected by harvest date, AVG and 1-MCP treatments. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 14 (S2): 203 – 212.
99. Lahooji, A., Mirabolfathy, M., Karami-Osboo, R. (2010): Effect of *Zataria multiflora* and *Satureja hortensis* essential oils, thymol and carvacrol on growth of *Fusarium gramineum* isolates and deoxynivalenol production. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 46 (1): 11 – 13.
100. Lastochkina, O., Seifikalhor, M., Aliniaiefard, S., Baymiev, A., Pusenkova, L., Garipova, S., Kulabuhova, D., Maksimov, I. (2019): *Bacillus* Spp.: Efficient Biotic Strategy to Control Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables. *Plants*, 8: 97.

101. Lee, J., Lee, T., Lee, Y. W., Yun, S. H., Turgeon, B. G. (2003): Shifting fungal reproductive mode by manipulation of mating type genes: obligatory heterothallism of *Gibberella zeae*. *Molecular Microbiology*, 50 (1): 145 – 152.
102. Lee, S. Y., Park, S. J., Lee, J. J., Back, C. G., Ten, L. N., Kang, I. K., Jung, H. Y. (2017): First Report of Fruit Rot Caused by *Fusarium decemcellulare* in Apples in Korea. *The Korean Journal of Mycology*, 45 (1): 54 – 62.
103. Leslie, J. F., Summerell, B. A. (2006): *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing, Iowa, USA.
104. Lević, J. (2008): Vrste roda *Fusarium* u oblasti poljoprivrede, veterinarske i humane medicine. Institut za kukuruz „Zemun Polje“ i Društvo genetičara Srbije, Beograd.
105. Leyronas, C., Chrétien, P. L., Troulet, C., Duffaud, M., Villeneuve, F., Morris, C. E., Hunyadi, H. (2018): First Report of *Fusarium proliferatum* Causing Garlic Clove Rot in France. *Plant Disease*, 102 (12): 2658.
106. Li, H., Durbin, R. (2009): Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25: 1754 – 1760.
107. Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R. (2009): 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25: 2078 – 2079.
108. Li, J., Lei, H., Song, H., Lai, T., Xu, X., Shi, X. (2017): 1-methylcyclopropene (1-MCP) suppressed postharvest blue mold of apple fruit by inhibiting the growth of *Penicillium expansum*. *Postharvest Biology and Technology*, 125: 59 – 64.
109. Li, Y., Han, L. R., Zhang, Y., Fu, X., Chen, X., Zhang, L., Mei, R., Wang, Q. (2013): Biological Control of Apple Ring Rot on Fruit by *Bacillus amyloliquefaciens* 9001. *The Plant Pathology Journal*, 29 (2): 168 – 173.
110. Li, Y., Zhang, X., Nie, J., Shah Bacha, S. A., Yan, Z., Gao, G. (2020): Occurrence and co-occurrence of mycotoxins in apple and apple products from China. *Food Control*, 118: 107354.
111. Link, H. F. (1809): *Observationes in ordinibus plantarum naturalium*. *Dissertatio*. *Magazin der Gesellschaft Naturforschenden Freunde Berlin*, 3: 3 – 42.

112. Liuzzi, V. C., Mirabelli, V., Cimmarusti, M. T., Haidukowski, M., Leslie, J. F., Logrieco, A. F., Caliandro, R., Fanelli, F., Mulè, G. (2017): Enniatin and Beauvericin Biosynthesis in *Fusarium* Species: Production Profiles and Structural Determinant Prediction. *Toxins*, 9: 45.
113. Logrieco, A., Mulè, G., Morreti, A., Bottalico, A. (2002): Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 597 – 609.
114. Lopez-Reyes, J. G., Spadaro, D., Gullino, M. L., Garibaldi, A. (2010): Efficacy of plant essential oils on postharvest control of rot caused by fungi on four cultivars of apples *in vivo*. *Flavour and Fragrance Journal*, 25 (3): 171 – 177.
115. Lurie, S. (1998): Postharvest heat treatments. *Postharvest Biology and Technology*, 14: 257 – 269.
116. Lysøe, E., Harris, L. J., Walkowiak, S., Subramaniam, R., Divon, H. H., Riiser, E. S., Llorens, C., Gabaldón, T., Kistler, H. C., Jonkers, W., Kolseth, A. K., Nielsen, K. F., Thrane, U., Frandsen, R. J. N. (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.
117. Ma, L.-J., van der Does, H. C., Borkovich, K. A., Coleman, J. J., Daboussi, M. J., Di Pietro, A., Dufresne, M., Freitag, M., Grabherr, M., Henrissat, B., Houterman, P. M., Kang, S., Shim, W. B., Woloshuk, C., Xie, X., Xu, J. R., Antoniw, J., Baker, S. E., Bluhm, B. H., Breakspear, A., Brown, D. W., Butchko, R. A., Chapman, S., Coulson, R., Coutinho, P. M., Danchin, E. G., Diener, A., Gale, L. R., Gardiner, D. M., Goff, S., Hammond-Kosack, K. E., Hilburn, K., Hua-Van, A., Jonkers, W., Kazan, K., Kodira, C. D., Koehrsen, M., Kumar, L., Lee, Y. H., Li, L., Manners, J. M., Miranda-Saavedra, D., Mukherjee, M., Park, G., Park, J., Park, S. Y., Proctor, R. H., Regev, A., Ruiz-Roldan, M. C., Sain, D., Sakthikumar, S., Sykes, S., Schwartz, D. C., Turgeon, B. G., Wapinski, I., Yoder, O., Young, S., Zeng, Q., Zhou, S., Galagan, J., Cuomo, C. A., Kistler, H. C., Rep, M. (2010): Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature*, 464 (7287): 367 – 373.

118. Ma, L.-J., Geiser, D. M., Proctor, R. H., Rooney, A. P., O'Donnell, K., Trail, F., Gardiner, D. M., Manners, J. M., Kazan, K. (2013): *Fusarium* Pathogenomics. Annual Review of Microbiology, 67 (1): 399 – 416.
119. Magazin, N., Gvozdrenović, D., Keserović, Z., Milić, B. (2010): Fruit quality of Granny Smith apples picked at different harvest times and treated with 1-MCP. Fruits, 65 (3): 191 – 197.
120. Makkonen, J., Jussila, J., Koistinen, L., Paaver, T., Hurt, M., Kokko, H. (2013): *Fusarium avenaceum* causes burn spot disease syndrome in noble crayfish (*Astacus astacus*). Journal of Invertebrate Pathology 113: 184 – 190.
121. Manawasinghe, I. S., Phillips, A. J. L., Xu, J., Balasuriya, A., Hyde, K. D., Stępień, Ł., Harischandra, D. L., Karunarathna, A., Yan, J., Weerasinghe, J., Luo, M., Dong, Z., Cheewangkoon, R. (2021): Defining a species in fungal plant pathology: beyond the species level. Fungal Diversity. <https://doi.org/10.1007/s13225-021-00481-x>
122. Mao, L., Lu, F., Wang, G. (2007): Application of 1-methylcyclopropene reduces wound responses and maintains quality in fresh-cut apple. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, 16 (S1): 111 – 115.
123. Marasas, W. F. O., Nelson, P. E., Toussoun, T. A. (1984): Toxigenic *Fusarium* species. Identity and Mycotoxicology. The Pennsylvania State University Press University Park and London, 1 – 328.
124. Mardanova, A. M., Hadieva, G. F., Lutfullin, M. T., Khilyas, I. V., Minnullina, L. F., Gilyazeva, A. G., Bogomolnaya, L. M. Sharipova, M. R. (2017): *Bacillus subtilis* Strains with antifungal activity against the phytopathogenic fungi. Agricultural Sciences, 8: 1 – 20.
125. Maxin, P., Fieger-Metag, N., Benduhn, B., Kruse, P., Heyne, P. (2006): Hot water dipping in Northern Germany - on farm results after four years of scientific work. 12th international conference on cultivation technique and phytopathological problems in organic fruitgrowing, Weinsberg, Germany: 118 – 120.
126. Maxin, P. (2012): Improving apple quality by hot water treatments. PhD Thesis. Aarhus University, Department of Food Science.
127. Maxin, P., Weber, R. W. S., Lindhard Pedersen, H., Williams, M. (2012): Hot-Water Dipping of Apples to Control *Penicillium expansum*, *Neonectria galligena* and

- Botrytis cinerea*: Effects of Temperature on Spore Germination and Fruit Rots. *European Journal of Horticultural Science*, 77 (1): 1 – 9.
128. Maxin, P., Williams, M., Weber, R. (2014): Control of fungal storage rots of apples by hot-water treatments: a Northern European perspective. *Erwerbs-Obstbau*, 56 (1): 25 – 34.
129. McCartney, S., Parker, M., Obermiller, J., Hoyt, T. (2011): Effects of 1-methylcyclopropene on firmness loss and the development of rots in apple fruit kept in farm markets or at elevated temperatures. *HortTechnology*, 21 (4): 494 – 499.
130. McCormick, R., Neuwald, D.A., Streif, J. (2012): Commercial apple CA storage temperature regimes with 1-MCP (SmartFresh™): Benefits and risks. *Acta Horticulturae*, 934: 263 – 270.
131. Medema, M. H., Blin, K., Cimermancic, P., de Jager, V., Zakrzewski, P., Fischbach, M. A., Weber, T., Takano, E., Breitling, R. (2011): antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Research*, 39: 339 – 346.
132. Mei, P. Y., Song, X. H., Zhu, Z. Y., Li, L. Y. (2020): First Report of Root Rot Caused by *Fusarium avenaceum* on *Coptis chinensis* in Chongqing, China. *Plant Disease*, 105 (2): 496.
133. Mihajilov-Krstev, T., Radnović, D., Kitić, D., Zlatković, B., Ristić, M., Branković, S. (2009): Chemical composition and antimicrobial activity of *Satureja hortensis* L. essential oil. *Central European Journal of Biology*, 4 (3): 411 – 416.
134. Mitrović, I., Grahovac, J., Dodić, J., Grahovac, M., Dodić, S., Vučurović, D., Vlajkov, V. (2017): Effect of agitation rate on the production of antifungal metabolites by *Streptomyces hygroscopicus* in a lab-scale bioreactor. *Acta Periodica Technologica*, 48: 231 – 244.
135. Mitrović, I., Grahovac, J., Dodić, J., Jokić, A., Rončević, Z., Grahovac, M. (2020): Production of plant protection agents in medium containing waste glycerol by *Streptomyces hygroscopicus*: Bioprocess analysis. *Acta Alimentaria*, 49 (3): 270 – 277.
136. Moor, U., Karp, K., Pöldma, P., Starast, M. (2007): Effect of 1-MCP treatment on apple biochemical content and physiological disorders. *Acta Agronomica Hungarica*, 55 (1): 61 – 70.

137. Moretti, A. (2009): Taxonomy of *Fusarium* genus: A continuous fight between lumpers and splitters. Zbornik Matice srpske za prirodne nauke, 117: 7 – 13.
138. Myburg, R. B., Dutton, M. F., Chaturgoon, A. A. (2002): Cytotoxicity of Fumonisin B1, Diethylnitrosamine, and Catechol on the SNO Esophageal Cancer Cell Line. Environmental Health Perspectives, 110 (8): 813 – 815.
139. Nicholson, W. L. (2002): Roles of *Bacillus* endospores in the environment. Cellular and Molecular Life Sciences, 59: 410 – 416.
140. Nitschke, E., Nihlgard, M., Varrelmann, M. (2009): Differentiation of Eleven *Fusarium* spp. Isolated from Sugar Beet, Using Restriction Fragment Analysis of a Polymerase Chain Reaction-Amplified Translation Elongation Factor 1 α Gene Fragment. Phytopathology, 99 (8): 921 – 929.
141. Nucci, M., Anaissie, E. (2007): *Fusarium* Infections in Immunocompromised Patients. Clinical microbiology reviews, 20 (4): 695 – 704.
142. Nunes, C. A. (2012): Biological control of postharvest diseases of fruit. European Journal of Plant Pathology, 133: 181 – 196.
143. O'Donnell, K., Kistler, H. C., Cigelnik, E., Ploetz, R. C. (1998): Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95 (5): 2044 – 2049.
144. O'Donnell, K., Kistler, H. C., Tacke, B. K., Casper, H. H. (2000): Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97 (14): 7905 – 7910.
145. O'Donnell, K., Rooney, A. P., Proctor, R. C., Brown, D. W., McCormick, S. P., Ward, T. J., Frandsen, R. J. N., Lysøe, E., Rehner, S. A., Aoki, T., Robert, V. A. R. G., Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Kang, S., Geiser, D. M. (2013): Phylogenetic analyses of RPB1 and RPB2 support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria. Fungal Genetics and Biology, 52: 20 – 31.
146. Obradović, A. (2017): Diverzitet kompleksa vrste *Fusarium graminearum* patogena strnih žita i kukuruza u Srbiji. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet.

147. Oleskevich, C., Shamoun, S. F., Vesonder, R. F., Punja, Z. K. (1998): Evaluation of *Fusarium avenaceum* and other fungi for potential as biological control agents of invasive *Rubus* species in British Columbia. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 20: 12 – 18.
148. Ortoneda, M., Capilla, J., Pastor, F. J., Pujol, I., Guarro, J. (2002): Efficacy of Liposomal Amphotericin B in Treatment of Systemic Murine Fusariosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46 (7): 2273 – 2275.
149. Pajčin, I. (2019): Optimizacija uslova umnožavanja i primarnog izdvajanja biomase *Bacillus* sp. za primenu u fitomedicini. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet.
150. Pajčin, I., Vlajkov, V., Frohme, M., Grebinyk, S., Grahovac, M., Mojićević, M., Grahovac, J. (2020): Pepper Bacterial Spot Control by *Bacillus velezensis*: Bioprocess Solution. *Microorganisms*, 8 (10): 1463.
151. Panwar, V., Aggarwal, A., Paul, S., Singh, V., Singh, P. K., Sharma, D., Saharan, M. S. (2016): Effect of temperature and pH on the growth of *Fusarium* spp. causing Fusarium head blight (FHB) in wheat. *South Asian Journal of Experimental Biology*, 6 (5): 186 – 193.
152. Pavela, R. (2014): Acute, synergistic and antagonistic effects of some aromatic compounds on the *Spodoptera littoralis* Boisd. (Lep., Noctuidae) larvae. *Industrial Crops and Products*, 60: 247 – 258.
153. Perczak, A., Gwiazdowska, D., Gwiazdowski, R., Juś, K., Marchwińska, K., Waśkiewicz, A. (2019): The Inhibitory Potential of Selected Essential Oils on *Fusarium* spp. Growth and Mycotoxins Biosynthesis in Maize Seeds. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 9 (1): 23.
154. Petreš, M., Grahovac, M., Magazin, N., Budakov, D., Tarlanović, J., Milić, B. (2016): Zaštita plodova voća posle berbe primenom toplotnih tretmana. *Biljni lekar*, 44 (4): 318 – 325.
155. Petreš, M., Grahovac, M., Hrustić, J., Mihajlović, M., Đanić, S., Budakov, D., Tanović, B. (2017): Identifikacija *Fusarium* spp. – patogena uskladištenih plodova jabuke. *Zbornik rezimea radova XIV Savetovanja o zaštiti bilja*, Zlatibor: 31.

156. Petreš, M., Grahovac, M., Obradović, A., Stanković, S., Hrustić, J., Buljovčić, M., Mihajlović, M. (2018): *Fusarium avenaceum* and *Fusarium graminearum* – capacity for mycotoxin production in rotten apple fruits. IV International Congress on “Food Technology, Quality and Safety” (Foodtech), 23-25.10.2018., Novi Sad, Serbia, 161 – 162.
157. Petreš, M., Grahovac, M., Hrustić, J., Bagi, F., Mihajlović, M., Stojšin, V., Romić, M., Budakov, D. (2018): Uticaj toplotnih tretmana na *Fusarium* spp. - patogena uskladištenih plodova jabuke. Zbornik rezimea radova XV Savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor: 55.
158. Petreš, M., Loc, M., Grahovac, J., Hrustić, J., Mihajlović, M., Mitrović, I., Grahovac, M. (2019): Effects of biological agents on *Fusarium avenaceum*, the causal agent of apple fruit rot. VIII Congress on Plant Protection, 25-29.11.2019., Zlatibor, Serbia, 105 – 106.
159. Petreš, M., Kalajdžić, J., Milić, B., Magazin, N., Stankov, A., Vukotić, J., Grahovac, M. (2020): Effect of hot water treatments on apple fruit rot caused by *Fusarium* spp. Journal of Plant Diseases and Protection, 127: 651 – 655.
160. Petrović, M., Sekulić, J. (2021): Sredstva za zaštitu bilja u prometu u Srbiji. Biljni lekar, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
161. Pitt, J. I. (2000): Toxigenic fungi and mycotoxins. British Medical Bulletin, 56: 184 – 192.
162. Prange, R. K., Wright, A. H., DeLong, J. M., Zanella, A. (2013): History, current situation and future prospects for dynamic controlled atmosphere (DCA) storage of fruits and vegetables, using chlorophyll fluorescence. Acta Horticulturae, 1012: 905 – 915.
163. Prapagdee, B., Kuekulvong, C., Mongkolsuk, S. (2008): Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi. International Journal of Biological Sciences, 4 (5): 330 – 337.
164. Price, A. L., Jones, N. C., Pevzner, P. A. (2005): De novo identification of repeat families in large genomes. Bioinformatics, 21: i351 – i358.
165. Rizzoli, W., Acler, A. (2009): Versuche zur Bekämpfung der Gloeosporium Fruchtfäule bei Pinova. Obstbau Weinbau, 46: 267 – 271.

166. Sanzani, S. M., Reverberi, M., Punelli, M., Ippolito, A., Fanelli, C. (2012): Study on the role of patulin on pathogenicity and virulence of *Penicillium expansum*. *International Journal of Food Microbiology*, 153 (3): 323 – 331.
167. Sanzani, S. M., Cariddi, C., Roccotelli, A., Garganese, F., Fallanaj, F., Ippolito, A. (2013): First report of *Gibberella avenacea* causing wet apple core rot in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 95 (1): 217 – 218.
168. Schilling, A., Möller, E., Geiger, H. (1996): Polymerase Chain Reaction-Based Assays for Species-specific Detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, and *F. avenaceum*. *Molecular Plant Pathology*, 86 (5): 515 – 522.
169. Sever, Z., Ivić, D., Kos, T., Miličević, T. (2012): Identification of *Fusarium* species isolated from stored apple fruit in Croatia. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 63 (4): 463 – 470.
170. Sharma, L., Marques, G. (2018): *Fusarium*, an Entomopathogen – A Myth or Reality? *Pathogens*, 7 (4): 93.
171. Sieber, C. M. K., Lee, W., Wong, P., Münsterkötter, M., Mewes, H. W., Schmeitzl, C., Varga, E., Berthiller, F., Adam, G., Güldener, U. (2014): The *Fusarium graminearum* Genome Reveals More Secondary Metabolite Gene Clusters and Hints of Horizontal Gene Transfer. *PLoS ONE*, 9 (10): e110311.
172. Simpson, J. T., Wong, K., Jackman, S. D., Schein, J. E., Jones, S. J. M., Birol, I. (2009): ABySS: A parallel assembler for short read sequence data. *Genome Research*, 19: 1117 – 1123.
173. Snowdon, A. L. (1990): Pome fruits. In: *A colour atlas of post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables*. Vol. 1: General introduction and fruits. London: Wolfe Scientific Ltd., 170 – 218.
174. Snyder, W. C, Hansen, H. N. (1940): The species concept in *Fusarium*. *American Journal of Botany*, 27: 64 – 67.
175. Sobrova, P., Adam, V., Vasatkova, A., Beklova, M., Zeman, L., Kizek, R. (2010): Deoxynivalenol and its toxicity. *Interdisciplinary Toxicology*, 3 (3): 94 – 99.
176. Sørensen, J., Phipps, R., Nielsen, K., Schroers, H., Frank, J., Thrane, U. (2009): Analysis of *Fusarium avenaceum* metabolites produced during wet apple core rot. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (4): 1632 – 1639.

177. Sørensen, L., Lysoe, E., Larsen, J., Khorsand-Jamal, P., Nielsen, K., Frandsen, R. (2014): Genetic transformation of *Fusarium avenaceum* by *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and the development of a USER-Brick vector construction system. *BMC Molecular Biology*, 15: 15.
178. Spadoni, A., Guidarelli, M., Sanzani, S. M., Ippolito, A., Mari, M. (2014): Influence of hot water treatment on brown rot of peach and rapid fruit response to heat stress. *Postharvest Biology and Technology*, 94: 66 – 73.
179. Stakheev, A. A., Khairulina, D. R., Zavriev, S. K. (2016): Four-locus phylogeny of *Fusarium avenaceum* and related species and their species-specific identification based on partial phosphate permease gene sequences. *International Journal of Food Microbiology*, 225: 27 – 37.
180. Stanke, M., Steinkamp, R., Waack, S., Morgenstern, B. (2004): "AUGUSTUS: a web server for gene finding in eukaryotes". *Nucleic Acids Research*, 32: W309 – W312.
181. Starkey, D. E., Ward, T. J., Aoki, T., Gale, L. R., Kistler, H. C., Geiser, D. M., Suga, H., Toth, B., Varga, J., O'Donnell, K. (2007): Global molecular surveillance reveals novel *Fusarium* head blight species and trichotecene toxin diversity. *Fungal Genetics Biology*, 44 (11): 1191 – 1204.
182. Su, H., Gubler, W. D. (2012): Effect of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on reducing postharvest decay in tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.). *Postharvest Biology and Technology*, 64 (1): 133 – 137.
183. Summerell, B. (2019): Resolving *Fusarium*: Current Status of the Genus. *Annual Review of Phytopathology*, 57: 323 – 329.
184. Tabti, L., El Amine Dib, M., Djabou, N., Gaouar Benyelles, N., Paolini, J., Costa, J., Muselli, A. (2014): Control of fungal pathogens of *Citrus sinensis* L. by essential oil and hydrosol of *Thymus capitatus* L. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 87: 279 – 285.
185. Tadijan, I., Grahovac, J., Dodić, J., Grahovac, M., Dodić, S. (2016): Effect of Cultivation Time on Production of Antifungal Metabolite(s) by *Streptomyces hygroscopicus* in Laboratory-Scale Bioreactor. *Journal of Phytopathology*, 164: 310 – 317.

186. Tahvonen, R. (1982): Preliminary experiments into the use of *Streptomyces* spp. isolated from peat in the biological control of soil and seedborne disease in peat culture. *Agricultural and Food Science*, 54 (5): 357 – 369.
187. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. (2011): MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28 (10): 2731 – 2739.
188. Tančić, S., Stanković, S., Lević, J. (2009): Varijabilnost patogenih svojstava *Fusarium* spp. poreklom iz zrna kukuruza i pšenice. *Pesticidi i fitomedicina*, 24 (4): 259 – 269.
189. Tančić, S., Stanković, S., Lević, J., Krnjaja, V. (2015): Correlation of deoxynivalenol and zearalenone production by *Fusarium* species originating from wheat and maize grain. *Pesticides and phytomedicine*, 30 (2): 99 – 105.
190. Tanović, B., Hrustić, J., Mihajlović, M., Grahovac, M., Stevanović, M., Gašić, S. (2020): Effects of developed thyme and oregano essential oil formulations on *Monilinia laxa* and *Monilinia fructicola*. *Pesticides and phytomedicine*, 35 (1): 49 – 56.
191. Tarailo-Graovac, M., Chen, N. (2009): Using RepeatMasker to Identify Repetitive Elements in Genomic Sequences. *Current Protocols in Bioinformatics*, 5: 4.10.1 – 4.10.14.
192. Tarlanović, J., Grahovac, M., Milić, B., Keserović, Z., Magazin, N., Petreš, M., Miodragović, M. (2017): Effect of Storage Conditions on Virulence of *Fusarium avenaceum* and *Alternaria alternata* on Apple Fruits. *Journal of Phytopathology*, 165: 595 – 601.
193. Tarlanović, J., Petreš, M., Grahovac, M., Milić, B., Magazin, N., Hrustić, J., Mihajlović, M. (2018): Effects of 1-MCP and dynamic controlled atmosphere on apple fruit rot caused by *Fusarium avenaceum*. *Pesticides and phytomedicine*, 33 (2): 109 – 117.
194. Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Serrano, C., Matos, O., Neng, N. R., Nogueira, J. M. F., Saraiva, J. A., Nunes, M. L. (2013): Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93 (11): 2707 – 2714.

195. Theobald, S., Vesth, T. C., Rendsvig, J. K., Nielsen, K. F., Riley, R., de Abreu, L. M., Salamov, A., Frisvad, J. C., Larsen, T. O., Andersen, M. R., Hoof, J. B. (2018): Uncovering secondary metabolite evolution and biosynthesis using gene cluster networks and genetic dereplication. *Scientific Reports*, 8: 17957.
196. Thomas, B., Contet Audonneau, N., Machouart, M., Debourgogne, A. (2019): Molecular identification of *Fusarium* species complexes: Which gene and which database to choose in clinical practice? *Journal de Mycologie Médicale*, 29: 56 – 58.
197. Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. (1994): CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22 (22): 4673 – 4680.
198. Trierweiler, B., Schrimmer, H., Tauscher, B. (2003): Hot water treatment to control *Gloeosporium* disease on apple during long-term storage. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 77: 156 – 159.
199. Tripathi, A. K., Upadhyay, S., Bhuiyan, M., Bhattacharya, P. R. (2009): A review on prospects of essential oils as biopesticide in insect-pest management. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 1 (5): 52 – 63.
200. Trkulja, V. (2008): Zaštita uskladištenog voća od bolesti. U : Kljajić P., urednik. *Zaštita uskladištenih biljnih proizvoda od štetnih organizama*. Beograd: Institut za pesticide i zaštitu životne sredine, 193 – 213.
201. Turner, A. S., Lees, A. K., Rezanoor, H. N., Nicholson, P. (1998): Refinement of PCR-detection of *Fusarium avenaceum* and evidence from DNA marker studies for phenetic relatedness to *Fusarium tricinctum*. *Plant Pathology*, 47 (3): 278 – 288.
202. Uhlig, S., Petersen, D., Flåøyen, A., Wilkins, A. C. (2005): 2-Amino-14,16-dimethyloctadecan-3-ol, a new sphingosine analogue toxin in the fungal genus *Fusarium*. *Toxicon*, 46 (5): 513 – 522.
203. Uhlig, S., Jestoi, M., Parikka, P. (2007): *Fusarium avenaceum* - The North European situation. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 17 – 24.
204. van der Meij, A., Willemsse, J., Schneijderberg, M. A., Geurts, R., Raaijmakers, J. M., van Wezel, G. P. (2018): Inter- and intracellular colonization of *Arabidopsis* roots by

- endophytic actinobacteria and the impact of plant hormones on their antimicrobial activity. *Antonie van Leeuwenhoek*, 111: 679 – 690.
205. Vico, I., Duduk, N., Vasić, M., Nikolić, M. (2014): Identification of *Penicillium expansum* causing postharvest blue mold decay of apple fruit. *Pesticides and Phytomedicine*, 29 (4): 257 – 266.
206. Vignutelli, A., Hilber-Bodmer, M., Hilber, U. W. (2002): Genetic analysis of resistance to the phenylpyrrole fludioxonil and the dicarboximide vinclozolin in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Mycological Research*, 106: 329 – 335.
207. Vilaplana, R., Rosero, A., Valencia-Chamorro, S. (2019): Hot water treatments to control internal rot of “MD-2” pineapple fruit caused by *Fusarium verticillioides*. *Acta Horticulturae*, 1239: 85 – 90.
208. Wachowska, U., Kucharska, K., Jędryczka, M., Łobik, N. (2013): Microorganisms as Biological Control Agents against *Fusarium* Pathogens in Winter Wheat. *Polish Journal of Environmental Studies*, 22 (2): 591 – 597.
209. Walkowiak, S., Rowland, R., Rodrigue, N., Subramaniam, R. (2016): Whole genome sequencing and comparative genomics of closely related *Fusarium* Head Blight fungi: *Fusarium graminearum*, *F. meridionale* and *F. asiaticum*. *BMC Genomics*, 17: 1014.
210. Weber, A., Thewes, F. R., Anese, R. de O., Both, V., Pavanello, E. P., Brackmann, A. (2017): Dynamic controlled atmosphere (DCA): interaction between DCA methods and 1-methylcyclopropene on “Fuji Suprema” apple quality. *Food Chemistry*, 235: 136 – 144.
211. Wenneker, M., Pham, K. T. K., Lemmers, M. E. C., de Boer, F. A., van der Lans, A. M., van Leeuwen, P. J., Hollinger, T. C., Thomma, B. P. H. J (2016): First report of *Fusarium avenaceum* causing wet core rot of ‘Elstar’ apples in the Netherlands. *Plant Disease*, 100: 1501.
212. Wenneker, M. (2019): Fungal pathogens in pome fruit orchards and causal agents of postharvest decay. PhD Thesis. Wageningen University.
213. Werrie, P. Y., Burgeon, C., Le Goff, G. J., Hance, T., Fauconnier, M. L. (2021): Biopesticide Trunk Injection Into Apple Trees: A Proof of Concept for the Systemic Movement of Mint and Cinnamon Essential Oils. *Frontiers in Plant Science*, 12: 495.

214. White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J. (eds). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications Academic Press, San Diego, California, USA, 315 – 322.
215. Winder, R. S. (1999): The influence of substrate and temperature on the sporulation of *Fusarium avenaceum* and its virulence on marsh reed grass. Mycological Research, 103 (9): 1145 – 1151.
216. Wollenweber, H. W., Reinking, O. A. (1935): Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung. Verlag Paul Parey, Berlin, Germany.
217. Wright, A. H., DeLong, J. M., Gunawardena, A. H. L. A. N., Prange, R. K. (2012): Dynamic controlled atmosphere (DCA): Does fluorescence reflect physiology in storage? Postharvest Biology and Technology, 64 (1): 19 – 30.
218. Xu, X., Lei, H., Ma, X., Lai, T., Song, H., Shi, X., Li, J. (2017): Antifungal activity of 1-methylcyclopropene (1-MCP) against anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) in postharvest mango fruit and its possible mechanisms of action. International Journal of Food Microbiology, 241 (16): 1 – 6.
219. Yasser, M. M., Marzouk, M. M., Kamel, T. A., Naaffa, A. M. A. (2019): Effect of hot water treatment on postharvest fruit rots and quality of tomato fruits. Plant Archives, 19 (2): 2325 – 2334.
220. Yli-Mattila, T., Hussien, T., Gavrilova, O., Gagkaeva, T. (2018): Morphological and Molecular Variation Between *Fusarium avenaceum*, *Fusarium arthrosporioides* and *Fusarium anguioides* Strains. Pathogens, 7 (4): 94.
221. Yu, D., Xu, F., Zeng, J., Zhan, J. (2012): Type III polyketide synthases in natural product biosynthesis. IUBMB Life, 64 (4): 285 – 295.
222. Yun, S. H., Arie, T., Kaneko, I., Yoder, O. C., Turgeon, B. G. (2000): Molecular Organization of Mating Type Loci in Heterothallic, Homothallic, and Asexual *Gibberella/Fusarium* Species. Fungal Genetics and Biology, 31 (1): 7 – 20.
223. Zanella, A., Cazannelli, P., Rossi, O. (2008): Dynamic controlled atmosphere (DCA) storage by the means of chlorophyll fluorescence response for firmness retention in apple. Acta Horticulturae, 796: 77 – 82.

224. Zhang, Y., Yang, H., Turra, D., Zhou, S., Ayhan, D. H., DeJulio, G. A., Guo, L., Broz, K., Wiederhold, N., Coleman, J. J., Donnell, K. O., Youngster, I., McAdam, A. J., Savinov, S., Shea, T., Young, S., Zeng, Q., Rep, M., Pearlman, E., Schwartz, D. C., Di Pietro, A., Kistler, H. C., Ma, L.-J. (2020): The genome of opportunistic fungal pathogen *Fusarium oxysporum* carries a unique set of lineage-specific chromosomes. *Communications Biology*, 3 (1): 50.
225. Zhong, L., Carere, J., Lu, Z., Lu, F., Zhou, T. (2018): Patulin in Apples and Apple-Based Food Products: The Burdens and the Mitigation Strategies. *Toxins*, 10 (11): 475.
226. Zhou, X., Rao, B., Chen, Y., Cai, C. (2021): First report of leaf blight caused by *Fusarium proliferatum* on *Polygonatum cyrtonema* in China. *Journal of Plant Pathology*, 103: 369.
227. Zhu, Z., Zheng, L., Pan, L., Hsiang, T., Huang, J. (2014): Identification and Characterization of *Fusarium* Species Associated with Wilt of *Eleocharis dulcis* (Chinese water chestnut) in China. *Plant Disease*, 98 (7): 977 – 987.