

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ  
ШУМАРСКИ ФАКУЛТЕТ  
Број:03-3119/3  
Датум:19.05.2015.

На основу члана 130. Статута Шумарског факултета а у вези члана 30. и члана 21.Правилника о докторским студијама, Декан Шумарског факултета доноси следећу

### О Д Л У К У

Израђена докторска дисертација дипл.инж. Ивана Миленковића под насловом:

„Диверзитет врста рода *Phytophthora* и њихова улога у пропадању стабала у лишћарским шумама у Србији“

са Извештајем Комисије ставља се на увид јавности у Библиотеци и интернет страници Факултета са роком од **30 дана**.

Одлуку доставити: Библиотеци Факултета, истаћи на огласну таблу и сајт факултета, писарници, Служби за наставу и студентска питања.

ДЕКАН  
Проф.др МИЛАН МЕДАРЕВИЋ

Универзитет у Београду  
Шумарски факултет

## НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Предмет: Извештај Комисије о оцени израђене докторске дисертације дипл.инж.  
Ивана Миленковића

На основу Члана 154. Статута Универзитета у Београду Шумарског факултета, поднетог рукописа израђене докторске дисертације, дипл. инж. Ивана Миленковића, истраживача сарадника на Институту за шумарство у Београду, под насловом „Диверзитет врста рода *Phytophthora* и њихова улога у пропадању стабала у лишћарским шумама у Србији“ и одлуком Наставно-научног већа Универзитета у Београду-Шумарског факултета (број одлуке 01-3321/1 од 29.04.2015. године) као чланови Комисије, Наставно-научном већу Шумарског факултета Универзитета у Београду подносимо следећи **Извештај**.

## I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ

---

### 1. Орган који је именовao (изабрао) комисију и датум:

Одлуком Наставно-научног већа Шумарског факултета у Београду, број одлуке 01-3321/1, од 29.04.2015. године, образована је Комисија за оцену израђене докторске дисертације кандидата дипл.инж. Ивана Миленковића.

### 2. Састав комисије:

1. др **Ненад Кеча**, ванредни професор  
Универзитет у Београду – Шумарски факултет
2. Dr. **Tomasz Oszako**, associate professor  
Bialystok University of Technology, Faculty of Forestry in Hajnówka
3. др **Драган Караџић**, редовни професор  
Универзитет у Београду – Шумарски факултет
4. др **Слободан Милановић**, доцент  
Универзитет у Београду – Шумарски факултет
5. др **Весна Голубовић Ћургуз**, доцент  
Универзитет у Београду – Шумарски факултет

## II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ

---

1. Иван, Љубиша, Миленковић
2. 28. јун 1984., Крушевац, Република Србија
3. Датум одбране, место и назив магистарске тезе/мастер рада: –
4. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука/мастера: –

[На основу члана 86. став 2., члана 99. став 6. и члана 100. став 7. Статута Универзитета у Београду и члана 51., члана 92. став 2. и члана 154., Статута Универзитета у Београду - Шумарског факултета, Наставно-научно веће Факултета, на седници одржаној 17.01.2008. године, усвојило је Правилник о докторским студијама на основу члана 4., докторске студије може уписати лице које је завршило основне студије и стекло звање дипломираног инжењера (VII-1 степен) према прописима који су важили до ступања на снагу Закона о високом образовању (Сл. гласник РС 76/05), са најмање просечном оценом 8 (осам) и познавањем најмање једног светског језика у мери да се може користити страном литературом.]

## III НАСЛОВ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:

---

---

**„Диверзитет врста рода *Phytophthora* и њихова улога у пропадању стабала у лишћарским шумама у Србији“**

#### **IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

---

Докторска дисертација под насловом: „Диверзитет врста рода *Phytophthora* и њихова улога у пропадању стабала у лишћарским шумама у Србији“ обухвата 240 страна, од чега 226 страна текста и 14 страна прилога. Рад има девет (9) поглавља и литературу, 40 табела, 83 слике и 7 илустрација. Прилози се састоје од четири табеле. Списак релевантне стране и домаће литературе, везане за област истраживања обухвата 200 библиографских јединица. На почетку рада су дате информације о ментору, коментору и члановима комисије, резиме, основни подаци о докторској дисертацији на српском и енглеском језику и кључне речи. Поглавља су структурирана тако да представљају посебне и логички повезане целине:

- 1. Увод: 1-10. стр.**
  - 2. Досадашња истраживања: 11-13. стр.**
  - 3. Циљеви и хипотезе: 14-15. стр.**
  - 4. Сакупљање узорака, изолација и морфолошка идентификација: 16-65. стр.**
  - 5. Молекуларна идентификација: 66-93. стр.**
  - 6. Неке еколошке карактеристике изолованих *Phytophthora* врста: 94-132 стр.**
  - 7. Патогеност: 133-162 стр.**
  - 8. Дискусија: 163-195. стр.**
  - 9. Општи закључци: 196-204. стр.**
  - 10. Литература: 205-225. стр.**
- Прилози 226-240. стр.**

Иза поглавља које се односи на табеларне прилоге, дате су потребне изјаве кандидата о ауторству, истоветности штампане и дигиталне верзије рада, као и овлашћење о начину коришћења.

#### **V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

---

##### **1. УВОД (1-10)**

У уводном делу кандидат указује на значај врста рода *Phytophthora*, представља њихове главне морфолошке и молекуларне карактеристике и даје историјски приказ проучавања ових патогених организама. У потпоглављу 1.1. *Карактеристике врста из рода *Phytophthora**, прегледом релевантне литературе кандидат описује главне морфолошке карактеристике и животни циклус врста из рода *Phytophthora*. У потпоглављу 1.2. *Таксономија и филогенетика врста из рода *Phytophthora**, кандидат прегледом релевантне литературе указује на историјат и промене које су се десиле при сврставању ових организама у више и ниже систематске категорије. Обрадом најновијих радова, везаних за молекуларну таксономију врста из рода *Phytophthora*, кандидат истиче тренутну таксономску позицију *Phytophthora* врста и

њима блиских организама и приказује поделу овог рода на природне групе, добијену на основу мултилокус филогенетских анализа, до сада познатих врста из овог рода (MARTIN *et al.* 2014). У оквиру потпоглавља 1.3. *Историјат проучавања врста из рода Phytophthora*, приказан је историјат проучавања врста из овог рода, почевши од првоописане *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, па све до врста које су описане прошле године. Кандидат наводи тренутни број врста и износи претпоставке о трендовима пораста броја врста у последње две деценије, као и о потенцијаном броју врста у оквиру рода *Phytophthora*.

## 2. ДОСАДАШЊА ИСТРАЖИВАЊА (11-13)

Кандидат износи проблематику пропадања и сушења најважнијих лишћарских врста у Србији, укључујући букву, храст китњак и храст лужњак, као и хипотезе и ставове о узрочницима пропадања стабала у наведеним екосистемима. Такође, на основу литературних извора и досадашњих резултата истраживања улоге *Phytophthora* врста у пропадању лишћарских домаћина, кандидат указује на потенцијалну улогу и ризике које носи присуство *Phytophthora* врста у наведеним екосистемима у Србији, а самим тим и сврху ове докторске дисертације. Такође, кандидат даје приказ раније забележених *Phytophthora* врста (*P. castorum*, *P. cambivora* и др.) и указује на недовољну истраженост ових патогених организама у екосистемима у Србији.

## 3. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ (14-15)

Узимајући у обзир недостатак информација о присуству и распрострањењу *Phytophthora* врста у различитим екосистемима у Србији, кандидат као циљеве истраживања наводи да се:

- (i) утврди присуство *Phytophthora* врста у лишћарским шумама у Србији;
- (ii) изолују, морфолошки и молекуларно идентификују главне врсте;
- (iii) утврди веза између забележених симптома и изолације *Phytophthora* врста;
- (iv) одреде главни домаћини и распрострањење изолованих *Phytophthora* врста;
- (v) утврде сличности и разлике између парова домаћина и локалитета на којима су изоловане *Phytophthora* врсте;
- (vi) утврде сличности и разлике у заступљености *Phytophthora* врста између шумских састојина, плантажа и вештачких састојина, паркова и зелених површина;
- (vii) утврди присуство *Phytophthora* врста кроз земљишни профил на локалитетима са постављеним пиезометарским станицама;
- (viii) тестовима провери патогеност најчешће изолованих *Phytophthora* врста на садницама букве, китњака и лужњака.

На основу наведених циљева, кандидат је поставио следеће хипотезе:

- (i) Врсте из рода *Phytophthora* су присутне у различитим лишћарским, шумским екосистемима у Србији и могу се наћи на корену, у ризосфери, у некротичним ткивима различитих домаћина као и у водотоцима и влажним деловима шума;
- (ii) Присутно је више врста из рода *Phytophthora*, чија се појава и распрострањење разликују у односу на посматрану врсту овог рода, биљку домаћина и биљну заједницу у којој се јављају;

- (iii) Постоји јака веза између забележених симптома и изолације *Phytophthora* врста испод симптоматичних домаћина;
- (iv) Шуме храста лужњака (*Quercus robur* L.) са својим хигрофилним пратиоцима су станишта највећег броја различитих врста ових патогених организама;
- (v) Не постоји значајна разлика између букве и китњака у погледу броја добијених изолата и изолованих врста, узимајући у обзир да се већина типова шума ових домаћина преплиће и наслања једно на друго;
- (vi) *Phytophthora* врсте су поред површинског, присутне и у дубљим слојевима у земљишном профилу на одабраним локалитетима на подручју доњег Срема;
- (vii) Изолати *Phytophthora* врста из Србије могу да инфицирају изложена дрвна ткива живих биљака и избојака и да проузрокују некрозе различите дужине у зависности од тестиране врсте патогена и домаћина;
- (viii) Изолати *Phytophthora* врста из Србије могу да инфицирају корење и да проузрокују оштећења кореновог система на садницама инокулисаним преко земљишта, у контролисаним условима.

#### **4. САКУПЉАЊЕ УЗОРАКА, ИЗОЛАЦИЈА И МОРФОЛОШКА ИДЕНТИФИКАЦИЈА (16-65)**

У овом поглављу кандидат наводи методе које је користио, резултате до којих је дошао и закључке које је донео после рада на сакупљању узорака, изолацији и морфолошкој идентификацији. У потпоглављу **4.1. Материјал и методе**, кандидат на почетку наводи локалитете истраживања и истиче да су они случајно бирани са нагласком на узорковању различитих и најважнијих домаћина (буква, китњак, лужњак и др.) у лишћарским шумама у Србији (Срем, Вршачки брег, Фрушка гора, Јастребац, Авала, Стара планина, Јужни Кучај, Трстеник, и др). Шуме храста лужњака са хигрофилним пратиоцима су узорковане у Сремском шумском подручју, шуме храста китњака на подручју Н.П. „Фрушка гора“, Вршачког брега, и подручју централне, источне и јужне Србије. Шуме букве су узорковане идући од мешовитих са храстовима, чистих букових, до мешовитих буково-четинарских шума у централној Србији. Остали домаћини су узорковани у оквиру наведених комплекса типова шума. Кандидат је приложио и карту истраживаних локалитета у Србији. Такође, кандидат према пореклу све сакупљене узорке дели на четири групе, укључујући природне шуме, шумске културе и плантаже, расаднике и паркове и зелене површине. У потпоглављу, **4.1.2. Сакупљање узорака и изолација**, кандидат наводи методе које је користио приликом прикупљања узорака и изолације врста из рода *Phytophthora* у лишћарским шумама у Србији. У делу **4.1.2.1. Припремање подлоге за изолацију и чување култура и лабораторијске пробе метода за изолацију**, кандидат је за изолације, пречишћавање и чување култура користио пет хранљивих подлога (V8А, СА, МЕА, PDA и PJA) и методе директног постављања некротичних ткива на селективну подлогу односно мамака са младим лишћем (храста, букве и ловорвишње) (JUNG *et al.* 1996; JUNG 2009). У делу **4.1.2.2. Сакупљање, припрема узорака и изолација *Phytophthora* врста**, кандидат наводи начине на које је сакупљао узорке, укључујући узорке земље и финог корења, некротичних ткива и воде. Узорци ткива сакупљани су зумбом и секиром, и после испирања у дестилованој води директно постављани на селективну подлогу.

Узорци земље и финог корена сакупљао је у виду земљишних блокова (~25×25×25 cm) и то 3-4 блока по стаблу, из којих се после мешања вршила изолација методом мамака. Вода је узимана у чисте пластичне боце. *Развијање, посматрање и мерење полних и бесполних структура (4.1.3.1.)*—ооспора, антеридија, оогонија, бесполних хламидоспора, положаја, изгледа, задебљања и украса хифа, кандидат је извршио на три типа подлоге (СА, V8А и MEА), чија је инкубација била на 22-25°C у мраку, а исте су под микроскопом прегледане после 3-4 недеље. Полне и бесполне структуре проучаване су под светлосним микроскопом СЕТИ<sup>®</sup>MAGNUM-T/Trinocular Microscope, UK (×400) и мерене са камером Si3000<sup>®</sup> (UK) и софтвером XliCap<sup>®</sup> (UK) на Универзитету у Београду-Шумарском факултету. Део изолата је прегледан у Фитопатолошкој лабораторији Института за Шумарство (Forest Research Institute-IBL) у Пољској на микроскопу ZEISS Axioskop 2, са Nikon Ds-f11 камером и NIS Elements AR4<sup>®</sup> софтвером. Све статистичке анализе урађене су у STATISTICA<sup>®</sup> (ver. 8). Кандидат је затим забележене структуре поредио са познатим кључевима за идентификацију *Phytophthora* врста. У делу 4.1.3.2. *Одређивање карактеристика колонија*, извршено је на 5 наведених подлога на 20 и 25°C у мраку. Пораст изолата и кардиналне температуре (4.1.3.3.) проверени су на СА подлози и седам температура (5, 10, 15, 15, 20, 25, 30 и 35°C).

У потпоглављу 4.2. (**Резултати**) кандидат наводи резултате до којих је дошао. Врсте из рода *Phytophthora* изоловане су са 30 од 33 истраживана локалитета у Србији. Од 109 узоркованих шумских састојина *Phytophthora* врсте су изоловане из 81, односно 65 симптоматичних и 16 асимптоматичних састојина. Сакупљено је 432 узорка од чега је 240 било позитивно. Структура позитивних изолација била је следећа: 177 из шумских састојина (253 изолата), 36 узорака из плантажа и вештачки подигнутих састојина (78 изолата), 6 узорака из расадника (20 изолата) и 21 узорак из паркова и зелених површина (27 изолата). **Овим резултатима је потврђена прва постављена хипотеза.** Кандидат је изоловао и идентификовао 15 различитих врста из рода *Phytophthora* у Србији, од којих је најчешће изолована била *P. plurivora* (165 изолата), *P. lacustris* (32), *P. cactorum* (22), *P. gonapodyides* (19), *P. quercina* (19), *P. polonica* (16), *P. pini* (12), *P. cambivora* (8), *P. ×serendipita* (5), *P. cryptogea* (4), *P. europaea* (3), *P. syringae* (3), *P. citrophthora* (2), *P. taxon 'pg chlamydo'* (2) и *P. citricola* (1).

Једанаест врста су први пут констатоване на територији Србије, а од раније постоје извештаји за *P. plurivora*, *P. cactorum*, *P. quercina* и *P. cambivora*.

У трећем делу, 4.2.3. *Морфолошка идентификација*, кандидат описује главне структуре 14 изолованих врста (изолати *P. syringae* су у међувремену изгубљени), које је забележио током морфолошке идентификације. Врсте је разврстао према морфолошким групама, група 1 (*P. cactorum*, *P. quercina* и *P. ×serendipita*), група 2 (*P. citrophthora*), група 3 (*P. plurivora*, *P. pini* и *P. citricola*), група 5 (*P. europaea*, *P. polonica*), група 6 (*P. cambivora*, *P. cryptogea*) и прелазне, група 5/6 (*P. lacustris*, *P. gonapodyides*, *P. taxon 'pg chlamydo'*) описаним код WATERHOUSE (1963). Десет тестираних изолата *P. citrophthora* (A1), *P. cambivora* (A2) и *P. cryptogea* (A2) је било хетероталично, док је 38 изолата *P. gonapodyides*, *P. lacustris* и *P. taxon 'pg chlamydo'* било стерилно. У потпоглављу 4.3. *Закључци*, кандидат износи најважније закључке до којих је дошао на основу резултата сакупљања узорака, изолације и

морфолошке идентификације добијених изолата.

## **5. МОЛЕКУЛАРНА ИДЕНТИФИКАЦИЈА (66-93)**

У овом поглављу кандидат наводи методе, резултате и закључке до којих је дошао током молекуларне идентификације изолата. У потпоглављу **5.1. Материјал и методе**, кандидат наводи да је за потребе молекуларне идентификације одабрано 157 изолата. Из 47 изолата кандидат је екстраховао ДНК са којом је даље вршио PCR реакције и секвенцирање ITS региона, док је из 110 изолата PCR реакције вршио директним методом, узимањем фрагмената младих хифа из чистих култура, без предходне ДНК екстракције. У првом делу, **5.1.1. Екстракција и провера квалитета ДНК**, кандидат наводи да су изолати из којих је екстрахована ДНК развијани у пречишћеној, течној V8 подлози, а да је после 3-5 дана инкубације на 22°C у мраку екстрахована ДНК уз помоћ GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit комплета. У другом делу, **5.1.2. Извођење PCR реакција, пречишћавање продуката и провера квалитета PCR продуката**, кандидат наводи да је изводио PCR реакције уз помоћ ITS6 и ITS4 пара прајмера (WHITE *et al.* 1990; COOKE *et al.* 2000). Реакције су биле запремине 50 µl и садржале су 1 µl генске ДНК, а изведене су по методу (JUNG *et al.* 2011). У трећем делу, **5.1.3. Секвенцирање**, кандидат наводи да је секвенцирање 47 изолата изведено на SEQ™8000 9.0.25 аутоматском секвенатору, (Beckman Coulter®, Fullerton, USA), а затим је анализа секвенци урађена помоћу SEQ™8000 Genetic Analysis System software. „Consensus“ секвенце су добијене у Bioedit-у v 7.1.3 software, а затим су упоређиване са GenBank – NCBI колекцијом нуклеотида. **5.1.6. Филогенетске анализе**, кандидат је користио „Maximum parsimony“- метод максималне очуваности и „UPGMA“ метод у програму MEGA 6 (TAMURA *et al.* 2013), са вредношћу „Bootstrap“-а од 1000. Еволуционе дистанце је израчунао уз помоћ „Maximum Composite Likelihood“ метода.

У потпоглављу **5.2. Резултати**, у првом делу **5.2.1. Екстракција и провера квалитета ДНК**, кандидат наводи да се количина екстраховане генске ДНК кретала од 0,81 до 8,73 ng/µl. У другом делу, **5.2.2. Извођење PCR реакција и провера квалитета PCR продуката**, кандидат истиче да су коришћени ITS6 и ITS4 прајмери успешно амплификовали део ДНК, при чему су добијени PCR продукти приближне величине од 800bp, а количина пречишћених продуката се кретала од 10,68 до 32,95 ng/µl. У трећем делу, **5.2.3. Секвенцирање**, кандидат наводи да је анализама помоћу BLAST сервиса утврдио да је идентичност- „Identities“ (%) секвенци *Phytophthora* изолата из Србије и секвенци у бази података врло висока и за 146 секвенци износи 100%, а за 11 секвенци 99%, док су различитост- „Gaps“ (%) и вредности „Е“ за све тестиране изолате износили 0%. У случају хибридне *P. ×serendipita* констатоване су дупле базе на позицијама 74 (R), 100 (R), 101 (Y) и 686 (K), што је недвосмислено потврдило присуство овог хибрида у Србији. У четвртном делу, **5.2.4. Резултати филогенетских анализа**, кандидат наводи да је величина поравнатих секвенци износила 876 базних парова (bp), а да је број променљивих места износио 353 и то 281 у оквиру варијаблног региона, а 72 у оквиру очуваног. ITS1 регион је показао мању варијабилност и садржи 138 променљивих места, у односу на ITS2 регион који садржи 213 променљивих места. Код 5,8S гена, забележена су свега два



варијабилна места са високим степеном очуваности. Maximum parsimony за секвенце из Србије и секвенце из референтне литературе била је значајна за *P. ×serendipita* у 78% случајева, 89% у случају *P. cactorum* и 87% код *P. europaea*, док се у свим осталим случајевима вредност кретала између 93 и 100% (bootstrap - 1000 понављања). *Phytophthora* врсте из Србије су после „Maximum parsimony“ филогенетске анализе груписане у седам различитих ITS „clade“-ова, укључујући „clade“-ове 1, 2, 6, 7, 8, 9 и додатни „clade“ 11, описаних код MARTIN *et al.* (2014), а њихово раздвајање је било значајно са максималних 100%. Груписање и раздвајање појединих врста помоћу „UPGMA“ метода је било значајно и износило је минимално 67% у случају *P. ×serendipita* и 70% у случају *P. cactorum*, док се у свим осталим случајевима ова вредност кретала између 94 и 100%. У потпоглављу 5.3. **Закључци**, кандидат износи најважније закључке из молекуларних истраживања.

## **6. НЕКЕ ЕКОЛОШКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ИЗОЛОВАНИХ *Phytophthora* ВРСТА У СРБИЈИ (94-132)**

У **Материјалу и методу (6.1.)**, у делу, **6.1.1. Локалитети, домаћини и изолати *Phytophthora* врста у Србији**, кандидат наводи да је за потребе појединих анализа извршио груписање локалитета истраживања и узоркованих домаћина на родове, као и да је током еколошких анализа и статистичке обраде података, користио само број изолата са идентификованим *Phytophthora* врстама. У другом делу, **6.1.2. Регистровани симптоми**, кандидат наводи да је оцену симптома вршио према „ICP“ мониторинг методологији за оцену виталности и појаву симптома на стабалима и да је у случају појаве више различитих симптома на једном стаблу, одабран један главни симптом. У трећем делу, **6.1.3. Диверзитет врста**, кандидат наводи да је у овим истраживањима користио алфа ( $\alpha$ ) диверзитет (WHITTAKER 1972). За анализу бета ( $\beta$ ) диверзитета коришћен је Sorensen-ов индекс сличности, а за асоцираност парова врста (локалитет, објекат истраживања, тип симптома) Jaccard-ов индекс ( $S_j$ ) (KREBS 1989). У четвртм делу, **6.1.4. Квантитативна заступљеност**, изражена је преко броја изолата сваке врсте у оквиру различитих локалитета, тестираних домаћина и типова симптома на појединим домаћинима. За сваку идентификовану *Phytophthora* врсту, тестирао је и везаност (Fidelity-F), као облик сталности тј. структурних одлика биоценозе. Вредности индекса F, Sorensen-овог и Jaccard-овог рачунати су у „Microsoft Office Excel“ (ver. 2007). У делу, **6.1.5. Присуство *Phytophthora* врста кроз земљишни профил на одабраним локалитетима на подручју Доњег Срема**, истраживање спроведено у априлу, мају и јуну 2011. и мају 2012. године у Доњем Срему на подручју Ш. У. Кленак, на пет различитих локалитета. На истим локалитетима се 20 година прати осцилација нивоа подземних вода на пиезометарима (Летић *et al.* 2013). Узорци су узимани почевши од површине, на сваких 0,5 m дубине, до нивоа подземне воде, као и саме подземне воде. Из узетих узорака су вршене изолације и одређивање текстурних класа земљишта. У шестом делу, **6.1.6. Статистичка обрада података**, кандидат наводи да је квалитативне податке анализирао помоћу  $\chi^2$  - „goodness of fit“ анализе, која је примењена за анализу фреквенци у оквиру појединих категорија (тип симптома, домаћини, објекти истраживања, локалитети). Разлике су сматране статистички значајним уколико је вероватноћа била  $p \leq 0,05$ .

У потпоглављу **6.2. Резултати**, кандидат истиче најважније резултате до којих је дошао током овог дела истраживања. У првом делу резултата, **6.2.1. Распрострањење *Phytophthora* врста према истраживаним локалитетима**, кандидат наводи да је локалитет на коме је добијено највише изолата био Купиново са 77 изолата и то 71 изолат седам различитих *Phytophthora* врста и 6 *Phytophthora* spp. изолата, затим Н.П. „Фрушка гора“ са 52 изолата и то 42 изолата осам различитих врста и 10 *Phytophthora* spp. изолата, следе Кленак (40), Београд (37), Нови Пазар (32), Вишњићево (20), док је са осталих локалитета добијен мањи број изолата *Phytophthora* врста. Најчешће изолована врста на свим локалитетима је била *P. plurivora* са укупно 165 изолата (24 лок.). На картама распрострањења, кандидат је приказао просторни распоред локалитета и идентификованих *Phytophthora* врста у Србији. Најмању везаност за све груписане локалитете истраживања је показала *P. plurivora* ( $F=0,81$ ), изолована је са 13 груписаних локалитета и према овим резултатима једина спада у убиквисте у Србији. Према степену везаности, седам врста спада у преференцијалне врсте, укључујући *P. cryptogea*, *P. citricola*, *P. europaea*, *P. pini*, *P. polonica*, *P. syringae* и *P. taxon 'pg chlamydo'* ( $F=0,06$ ), док за све остале изоловане врсте у Србији кандидат наводи да спадају у случајне (акциденталне). Максималну сличност ( $S_s=1,00$ ), као и максималну асоцираност-преклапање ( $S_j=1,00$ ), кандидат је забележио између Куршумлије и Лознице и између Јастрепца и Вршачког брега. Малу сличност ( $S_s=0,20$ ) и малу асоцираност ( $S_j=0,11$ ), кандидат је забележио упоредном анализом Јастребца са Фрушком гором, Јужног Кучаја са доњим Сремом, Куршумлије са Београдом и Лознице са Београдом. У другом делу, **6.2.2. Регистровани симптоми**, кандидат наводи да је током ових истраживања забележио различите симптоме, укључујући одумирање стабала од врха („dieback“- тип пропадања), одумирање врхова крошњи и грана уз појаву водених избојака, повећану проређеност крошње, хлорозу и жутило лишћа, некрозе на деблима и у приданку стабала уз цурење тамног ексудата (stem cankers and collar rots), некрозе у вишим партијама стабла уз цурење тамног ексудата (aerial cankers), некрозе и озледе на матичном корењу уз губитак и трулеж финог корења, а *P. plurivora* је била врста која је најчешће изолована испод стабала са свим типовима симптома. Из категорије стабала без симптома, највише изолата је добијено у плантажама топола. Укупно 234 изолата 14 различитих врста изоловао са стабала са различитим симптомима, док је 79 изолата 9 различитих врста изоловао испод стабала без симптома, чиме је **потврђена трећа тестирана хипотеза**. Најмању везаност ( $F=1,00$ ) за поједине типове симптома су показале *P. lacustris* и *P. plurivora* и изоловане су како испод стабала без симптома, тако и испод стабала са свим наведеним типовима симптома. Највећу сличност ( $S_s=0,80$ ) и највећу асоцираност ( $S_j=0,67$ ), кандидат је забележио између жутила лишћа и проређености круне. Најмању сличност ( $S_s=0,31$ ) и најмању асоцираност ( $S_j=0,18$ ), кандидат је забележио између стабала без симптома и стабала са некрозом коре. Двадесет четири (24) домаћина је било позитивно на присуство различитих *Phytophthora* врста, а највише изолата добијено је са храста лужњака – 86 изолата осам *Phytophthora* врста, са китњака је изоловано исто осам врста, али од 50 изолата. Следи буква са 46 изолата и шест изолованих врста, тополе са 42 изолата и шест изолованих врста и пољски јасен са 36 изолата и пет изолованих врста

Максимална сличност ( $S_s=1$ ) и максимална асоцираност ( $S_j=1,00$ ) забележена је између црне јове и врста из рода *Acer*, као и између граба и брезе. Мала сличност ( $S_s=0,15$ ) и мала асоцираност ( $S_j=0,08$ ) забележена је при поређењу храстова са брезом, храстова са грабом и храстова са глогом. Неке од изолованих врста (*P. citricola*, *P. cryptogea*, *P. europaea* и *P. taxon 'pg chlamydo'*) су биле везане искључиво за поједине домаћине, док су друге изоловане са више различитих домаћина и родова, чиме је кандидат потврдио другу постављену хипотезу.

По први пут су у Србији забележене *P. cryptogea* и *P. syringae* на китњаку, *P. cambivora* на ловорвишњи, *P. citricola* на јасену, *P. europaea* на лужњаку, *P. plurivora*, *P. lacustris* и *P. gonapodyides* на више различитих домаћина и *P. taxon 'Pg Chlamydo'* у шумама букве.

Такође, према доступним литературним изворима, први пут је констатована *P. pini* на тополама у свету и на храсту лужњаку у Србији, први налази *P. polonica* на храсту лужњаку, пољском јасену и тополама у свету и Србији, *P. xserendipita* на китњаку, сладуну и дивљој крушци у свету и њен први налаз у Србији. У четвртном делу, 6.2.4. Појава *Phytophthora* врста у различитим објектима истраживања, највише изолата (108) и осам врста *Phytophthora* добијено је из заједница храста лужњака са различитим хигрофилним пратиоцима у плавном шумском подручју, где су главни узорковани пратиоци храста лужњака били пољски јасен, граб, жешља и у мањој мери клен – испуњена четврта постављена хипотеза. Друго по реду станиште са 41 добијеним изолатом шест различитих врста су биле вештачки подигнуте састојине топола. За њима долазе шуме букве са 37 изолата шест различитих врста и шуме китњака и шуме сладуна и цера са по 30 изолата од по шест различитих врста. Кандидат даље истиче да је најмању везаност ( $F=0,90$ ) у односу на све посматране објекте истраживања показала *P. plurivora*, која спада у убиквисте ( $F=0,50-1,00$ ). Добијени резултати показују да у групу убиквиста у Србији спадају *P. plurivora* ( $F=0,90$ ), *P. cactorum* и *P. gonapodyides* ( $F=0,70$ ), док је *P. lacustris* на граници ( $F=0,50$ ; распон  $F=0,50-1,00$ ). Највећу сличност ( $S_s=0,83$ ) и највећу асоцираност ( $S_j=0,71$ ), кандидат је забележио поређењем шума китњака са шумама сладуна и цера, затим шума китњака са шумама букве и шума сладуна и цера са шумама букве, што је оповргло пету постављену хипотезу. У потпоглављу 6.3. Присуство *Phytophthora* врста кроз земљишни профил на одабраним локалитетима на подручју Доњег Срема, Врста која је изолована из узорака из свих дубина, укључујући и 1 и 1,5 m дубине је била *P. plurivora*, док су *P. cactorum*, *P. gonapodyides*, *P. lacustris* и *P. quercina* изоловане из површинског слоја земљишта на 25 и 50 cm дубине, чиме је потврђена шеста постављена хипотеза. Најмања дубина подземне воде била је 1,5 m током априла, што је уједно и највећа дубина на којој су забележене *Phytophthora* врсте, тј. *P. plurivora*. *Phytophthora* врсте су забележене од 70 m у доњем Срему до надморске висине од 1200 метара, на подручју Јастрепаца. У потпоглављу 6.5. Закључци, кандидат наводи најважније закључке до којих је дошао у току овог дела истраживања.

## 7. ПАТОГЕНОСТ (133-162)

У делу *Материјал и метод (7.1.)* кандидат описује методе и наводи резултате до којих је дошао приликом провере патогености неких *Phytophthora* врста из Србије.

За проверу патогености коришћене су 3 методе:

1. провера патогености под кору на избојцима (по методу JUNG and NECHWATAL 2008) са шест врста (*P. cambivora*, *P. citricola*, *P. cryptogea*, *P. europaea*, *P. plurivora* и *P. taxon 'pg chlamydo'*) на избојцима китњака и букве. Оглед је трајао три недеље на 25°C, а затим је анализирано присуство некроза.
2. инокулацијом под кору на живим биљкама у контролисаним условима (по методу JUNG and BLASCHKE 1996; BALCI and HALMSCHLAGER 2003b; BALCI *et al.* 2008). Коришћено је пет изолата *P. plurivora* са различитих домаћина у Србији, плус изолати *P. europaea* и *P. polonica*. Биљке су гајене у саксијама од 1L, а њихова старост у време инокулације била је 13 месеци. Инкубација је вршена на 20-22°C у стакленој башти. Тест је трајао осам недеља, а затим је вршена анализа некроза.
3. инфекцијом кореновог система преко земљишта у условима контролисаног влажења (JUNG *et al.* 1996) извршене су на китњаку и лужњаку. Инокулум је припремао према методологији MIRCETICH and MATHERON (1985), а инкубација је трајала 4-6 недеља у мраку. Биљке су инокулисане са 20-25 cm<sup>3</sup> инокулума, а контролна група биљака је инокулисана стерилним супстратом од финог вермикулита, проса и V8 сока. Коришћен је инокулум пет врста: *P. cambivora*, *P. plurivora*, *P. polonica*, *P. quercina* и *P. xserendipita*. Саксије са инокулисаним биљкама су плављене водом до нивоа од око 2-4 cm изнад ивице саксије, а после 72 сата вода је испуштана. Процес плављења свих саксија понављан је на три до четири недеље све до завршетка експеримента.

Анализа губитка кореновог система помоћу софтвера WinRhizo<sup>®</sup> (ver. 2012b) и EPSON<sup>®</sup> Perfection V700 воденог скенера. Корење је подељено на фино (до 2 mm пречника), матично (=мало корење; 2-5 mm пречника) и крупно корење (преко 5 mm пречника). После скенирања, кандидат је прво селектовао коренове према наведеним класама, а затим ставио у сушницу на 65°C до постизања константне масе. Корење је затим мерио до на три децимале, после чега је приступио прерачунавању параметара за сваки појединачни корен. Статистичке анализе су урађене помоћу анализе варијансе ( $\alpha=0,05$ ), двофакторијалне анализа варијансе (two way ANOVA) ( $\alpha=0,05$ ), а разлике између група су контролисане Duncan тестом ( $\alpha=0,05$ ). Кандидат наводи да је одабрао 12 од 24 израчуната параметра корена, за које је извршио двофакторијалну анализу варијансе (two way ANOVA) ( $\alpha=0,05$ ). Све анализе кандидат је обавио у пакету STATISTICA<sup>®</sup> (ver. 12).

У потпоглављу **7.2. Резултати**, патогености на избојцима показали су статистички значајну разлику између *Phytophthora* врста ( $p<0,001$ ) на дужину некроза, док врста домаћина, као и интеракција између ова два фактора није била статистички значајна. На буковим избојцима најагресивнија врста била је *P. plurivora*, образујући 6,8 пута веће некрозе од *P. europaea* где су измерене најмање некрозе. Код китњака, најагресивнија врста је такође била *P. plurivora* и образовала је 6 пута веће некрозе од *P. taxon 'pg chlamydo'*. Резултати Duncan теста показују да су просечне некрозе код *P. plurivora* статистички значајно веће у односу на све остале *Phytophthora* врсте. Резултати теста патогености под кору на живим биљкама показују статистички значајну разлику између *Phytophthora* врста ( $p<0,001$ ), а да је најагресивнија врста била *P. plurivora* (изолат 11), са 7,6 пута већим некрозама од *P.*

*polonica*, која је изазвала најмање некрозе у овом тесту. Резултатима из овог и претходног дела, кандидат је **потврдио седму тестирану хипотезу**. Резултати теста патогености инфекцијом кореновог преко земљишта у условима контролисаног влажења показали су да је највећи проценат корења са некрозама примећен код *P. cambivora*, а затим следе *P. quercina*, *P. plurivora* и *P. ×serendipita*, док су најмање некрозе забележене код *P. polonica*. На основу резултата статистичких анализа, кандидат истиче да су на запремину корена, специфичну дужину финог корења, дужину финог корења по дужини матичног корења, дужину финог по сувој маси матичног корења и специфичну површину финог корења, значајно утицале врста храста и тестиране врсте *Phytophthora*, док интеракција између ова два фактора није утицала статистички значајно на ове параметре. На број врхова по дужини матичног корења, број врхова финог по дужини матичног корења и суву масу финог по дужини матичног корења, значајно су утицале тестиране врсте *Phytophthora*, док врста храста и интеракција између ова два фактора није утицала статистички значајно на ове параметре. На основу најважнијих параметара, који осликавају стање кореновог система, у случају храста лужњака најагресивније врсте биле *P. cambivora* и *P. quercina*, а затим следе *P. plurivora* и *P. ×serendipita*. Дужина финог корена храста лужњака, инфицираног са *P. cambivora* је износила  $340,4 \pm 31,36$  cm и била је 3,8 пута мања, а специфична дужина финог корена износила  $784 \pm 68,73$  cm/g и била 2,6 пута мања, обе вредности су статистички значајно различите од контроле. Укупна дужина корена лужњака, инфицираног са *P. cambivora* била је 3,6 пута мања и статистички значајна при  $p=0,05$ . За исте параметаре код китњака, најагресивније врсте биле су *P. quercina* и *P. ×serendipita*, а затим следе *P. cambivora* и *P. plurivora*, при чему су вредности тестираних параметара биле статистички значајне. Дужина финог корена храста китњака, инфицираног са *P. quercina* била је 3 пута мања у поређењу са контролном групом биљака, док је специфична дужина финог корена била 1,6 пута мања и статистички значајно различита у односу на контролу. Укупна дужина корена храста китњака, инфицираног са *P. quercina* је износила  $293,1 \pm 38,09$  cm и била је 2,9 пута мања и статистички значајно различита у односу на контролну групу биљака. Најмање агресивна према биљкама китњака и лужњака била је *P. polonica* и није се разликовала у више параметара у односу на контролне групе биљака. На основу добијених резултата **потврђена је осма тестирана хипотеза**. У потпоглављу 7.3. **Закључци**, кандидат је изнео најважније закључке до којих је дошао током извођења тестова патогености.

## 8. ДИСКУСИЈА (163-195)

У овом поглављу кандидат детаљно анализира резултате својих истраживања, пореди их са сличним резултатима, приказаним у референтној литератури и наглашава значај добијених резултата. Такође, кандидат је истакао нове домаћине за поједине *Phytophthora* врсте и комбинације домаћин – *Phytophthora* које су по први пут забележене у Србији и свету. Везу патогена и домаћина, поред изолације, доказао је и тестовима патогености. У првом реду можемо истаћи налаз агресивне, хибридна врсте *P. ×serendipita*, која је баш у овим истраживањима по први пут констатована на дрвенастим домаћинима. Кандидат је описао процес и начин на

који врсте из рода *Phytophthora* наносе штете шумским стаблима и указао на улогу врста из овог рода у комплексу фактора пропадања стабала у лишћарским састојинама у Србији, а у првом реду у шумама букве, храстова китњака и лужњака, као и пољског јасена и горског јавора. Такође, кандидат је направио и осврт на потенцијалне интеракције између *Phytophthora* врста и других организама и указао на значај даљег проучавања ових односа на различитим дрвенастим домаћинима у Србији. На крају дискусије, кандидат је указао и на смернице за будућа истраживања, а пре свега на истраживање улоге воде као преносника или извора инокулума за инфекције *Phytophthora* врстама. Указано је на неопходност истраживања присуства ових патогених организама у расадницима, као једним од најчешћих извора инокулума за инфекције у природним екосистемима и посебно, детерминисање њиховог преноса између расадника и плантажа. Даље, кандидат је нагласио да је потребно серијама тестова патогености испитати везе стресних, стимулишућих фактора (температура, степени дефолијације, садржај различитих елемената, влага) и инфекција *Phytophthora* врстама у Србији.

На крају, кандидат наглашава значај по питању информисаности и ширења знања, везаних за значај и улогу врста из рода *Phytophthora* у пропадању стабала у различитим екосистемима, као и на изналажењима адекватних мера борбе. Такође, кандидат указује и на потребу ажурирања листе штетних организама у Србији и њеног проширења са агресивним врстама, које су током ових истраживања идентификоване у природним екосистемима.

#### **9. ОПШТИ ЗАКЉУЧЦИ (196-204)**

У овом поглављу кандидат сумарно приказује све закључке до којих је дошао на основу резултата сакупљања узорака, изолације, морфолошке и молекуларне идентификације, истраживаних еколошких карактеристика идентификованих *Phytophthora* врста у Србији и спроведених тестова патогености.

#### **10. ЛИТЕРАТУРА (205-225)**

Наведено поглавље садржи 200 библиографских јединица. Коришћена литература је мултидисциплинарна, правилно одабрана како за теоријску основу ове докторске дисертације, тако и за поређење са резултатима истраживања сличне тематике. Увидом у коришћену литературу може се закључити да кандидат поседује шире познавање области, као и да је свеобухватно проучио проблематику истраживања.

#### **ПРИЛОЗИ (226-240)**

У оквиру овог поглавља кандидат приказује табеларне прилоге који су усклађени са структуром претходно наведених поглавља.

### **VI ЗАКЉУЧЦИ ОДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА**

---

Комисија констатује да је Иван Миленковић, дипл. инж., у потпуности испунио план предвиђен пријавом докторске дисертације. Добијени резултати истраживања су систематично и прегледно приказани, а дискусија заснована на добром познавању проучаване научне области и на најновијим научним сазнањима

---

приказаним у референтним радовима и књигама. Закључци прате структуру истраживања и прецизно и исправно су формулисани. Имајући у виду да се као услов за одбрану докторске дисертације поставља објављен рад у часопису међународног значаја, комисија констатује да је кандидат аутор једног рада у часопису категорије M23 и коаутор једног саопштења у часопису категорије M21.

## **VII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА**

---

Имајући у виду одабрани предмет истраживања, као и постављене циљеве и хипотезе од којих се у истраживању пошло, комисија сматра да је кандидат резултате базирао на добро утемељеној теоријској основи, до њих дошао квалитетном применом одговарајућих и предходно добро описаних метода, везаних за изолацију, морфолошку и молекуларну идентификацију, еколошке карактеристике и патогеност врста из рода *Phytophthora*, доказујући или оповргавајући дефинисане хипотезе и успешно остварујући постављене циљеве истраживања. Комисија констатује да су резултати истраживања јасно и прегледно изложени, методолошки исправно анализирани и тумачени, и илустровани релевантним табеларним, сликовним и илустративним приказима.

## **VIII КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

---

1. Комисија констатује да је докторска дисертација дипл. инж. Ивана Миленковића написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме за коју је, одлуком бр. 61206-2213/3-13 од 11.06.2013. године, Веће Научних области Биотехничких наука Универзитета у Београду дало сагласност.

2. Комисија такође констатује да дисертација садржи све непходне елементе: насловну страну на српском и енглеском језику, информације о ментору и члановима комисије, кључну информациону документацију, резиме на српском и abstract на енглеском језику, садржај, текст рада по поглављима, списак литературе, прилоге, изјаву о ауторству, изјаву о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и изјаву о коришћењу.

3. Докторска дисертација дипл.инж. Ивана Миленковића под насловом: „Диверзитет врста рода *Phytophthora* и њихова улога у пропадању стабала у лишћарским шумама у Србији“ представља оригиналан допринос науци. Оригиналноост докторске дисертације огледа се, пре свега, у идентификовању истраживачког проблема, приступу и његовој обради, од сакупљања и идентификације врста рода *Phytophthora* у природним и вештачким екосистемима у којима до сада нису спровођена слична истраживања, затим у проучавању еколошких карактеристика врста и испитивању патогености добијених врста, при чему је кандидат дошао до потпуно оригиналних и нових резултата. Један од

оригиналних резултата овог рада су нове домаћин-патоген комбинације, по први пут забележене у овим истраживањима у свету и Србији. Веома је битан налаз хибридне врсте *P. ×serendipita* која је по први пут регистрована на дрвенастим домаћинима у свету. Добијени резултати представљају веома значајне информације о распрострањењу и домаћинима појединих врста из рода *Phytophthora* у Србији и указују на неопходност посвећивања веће пажње улози ових организама у комплексу фактора пропадања стабала у различитим лишћарским екосистемима.

4. Комисија није уочила недостатке који би евентуално могли утицати на резултате истраживања у току израде докторске дисертације.

#### **IX ПРЕДЛОГ:**

---

На основу укупне оцене докторске дисертације, комисија предлаже Наставно-научном већу Универзитета у Београду-Шумарског факултета, да докторску дисертацију кандидата дипл.инж. Ивана Миленковића под насловом „Диверзитет врста рода *Phytophthora* и њихова улога у пропадању стабала у лишћарским шумама у Србији“ прихвати за јавну одбрану.

#### **ПОТПИСИ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ:**

---

ментор  
др **Ненад Кеча**, ванр. проф.  
Универзитет у Београду-Шумарски факултет

---

ментор  
Dr. **Tomasz Oszako**, assoc. prof.  
Bialystok University of Technology,  
Faculty of Forestry in Hajnówka

---

члан комисије  
др **Драган Караџић**, ред. проф.  
Универзитет у Београду-Шумарски факултет

---

члан комисије  
др **Слободан Милановић**, доцент.  
Универзитет у Београду-Шумарски факултет;

---

члан комисије  
др **Весна Голубовић Ђургуз**, доцент,  
Универзитет у Београду-Шумарски факултет