

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Miljan M. Vasić

KARAKTERIZACIJA *Monilinia* spp.
PATOGENA PLODOVA JABUKE U SRBIJI I
RAZLIČITI ASPEKTI NJIHOVE KONTROLE

doktorska disertacija

Beograd, 2016.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE

Miljan M. Vasić

CHARACTERIZATION OF *Monilinia* spp.
PATHOGENS OF APPLE FRUIT IN SERBIA
AND DIFFERENT ASPECTS OF THEIR
CONTROL

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016.

Komisija za ocenu i odbranu:

Mentor: dr Nataša Duduk, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu – Poljoprivredni fakultet

Članovi komisije: dr Ivana Vico, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu – Poljoprivredni fakultet

dr Tatjana Marković, viši naučni saradnik
Institut za proučavanje lekovitog bilja „Josif Pančić” Beograd

dr Niko Radulović, vanredni profesor
Prirodno matematički fakultet Univerzitet u Nišu

dr Dragan Radivojević, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu – Poljoprivredni fakultet

Datum odbrane:_____

Zahvaljujem mentoru prof. dr Nataši Duduk na pomoći u izboru teme i izradi doktorske disertacije, kao i na pruženoj podršci, podstreku i najviše na razumevanju.

Zahvaljujem prof. dr Mirku Ivanoviću što mi je otvorio put za naučni rad i izradu ove disertacije.

Zahvalan sam prof. dr Ivani Vico za korisne savete i znanje koja mi je nesebično pružila.

Zahvaljujem dr Tatjani Marković i prof. dr Niku Raduloviću na pomoći i korisnim savetima u tumačenju rezultata hemijskih analiza i pisanju dobijenih rezultata.

Zahvaljujem prof. dr Draganu Radivojeviću na korisnim sugestijama.

Zahvaljujem doc. dr Dragani Rančić i Radenku Radoševiću, dipl. biol. za pomoć u histopatološkim ispitivanjima.

Zahvaljujem doc. dr Vesni Pajić i Jeleni Kozaderović dipl. mat. na pomoći u statističkim analizama rezultata.

Veliku pomoć su mi pružili prof. dr Marta Mari University of Bologna, Italija i dr Gerard van Leeuwen Plant Protection Service Wageningen, Holandija, ustupanjem izolata Monilinia vrsta, kao i prof. dr David Backhouse University of New England, Australija korisnim sugestijama.

Zahvaljujem Aleksandri Žebeljan na pomoći u laboratorijskom radu.

Najveću zahvalnost dugujem mojoj porodici, Dragani i prijateljima na podršci i strpljenju.

Disertacija je finansirana iz projekta III46008: „Razvoj integrisanih sistema upravljanja štetnim organizmima u biljnoj proizvodnji sa ciljem prevazilaženja rezistentnosti i unapređenja kvaliteta i bezbednosti hrane“ Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

KARAKTERIZACIJA *Monilinia* spp. PATOGENA PLODOVA JABUKE U SRBIJI I RAZLIČITI ASPEKTI NJIHOVE KONTROLE

REZIME

Iz plodova jabuke sa simptomima smeđe truleži i crnila sakupljenih u voćnjacima i skladištima u Srbiji, u periodu od 2010. do 2012. godine, dobijeno je 349 izolata *Monilinia* spp. Na osnovu morfoloških i molekularnih osobina izolati su identifikovani kao *M. fructigena*, *M. laxa* i po prvi put u našoj zemlji vrste *M. fructicola* i *Monilia polystroma*. U voćnjacima je utvrđeno dominantno prisustvo *M. fructigena* (76,98%), dok su manje zastupljene bile *M. polystroma* (14,78%), *M. laxa* (5,15%) i *M. fructicola* (3,09%). U skladištima je dominantno bila prisutna *M. fructigena* (77,58%), a manje zastupljene *M. polystroma* (8,62%), *M. fructicola* (6,9%) i *M. laxa* (6,9%).

Izolati sve četiri vrste su okarakterisani na osnovu morfoloških, patogenih, odgajivačkih, ekoloških i molekularnih osobina. Kolonije izolata *M. fructigena* su bile ravnog oboda beličaste do sivkaste boje, dok je kod pojedinih izolata uočena stromatizacija u kulturi. Izolati *M. polystroma* su obrazovali kolonije sivkaste boje, ravnog oboda, sa koncentrično raspoređenim stromatičnim tvorevinama, a kolonije izolata *M. laxa* bile su sivkaste boje, režnjevito oboda i izgleda rozete. Kolonije izolata *M. fructicola* su bile sivkaste, ravnog oboda, sa masom spora na površini vazdušne micelije. Prosečni dnevni porast kolonija na KDA podlozi je bio najbrži kod *M. fructicola*, dok je kod ostalih vrsta bio ujednačen. Konidije izolata *Monilinia* spp. su bile jednoćelijske, hijalinske, limunastog oblika, formirale su se u lancima i bile su veće na inokulisanim plodovima jabuke nego na V8 podlozi. Izolati *M. fructigena* su obrazovali najveće konidije, nešto manje *M. polystroma* i najmanje *M. fructicola* i *M. laxa*. Na osnovu broja obrazovanih inicijalnih hifa po konidiji utvrđena je razlika između vrsta. *M. polystroma* i *M. fructigena* su klijale u jednu ili dve inicijalne hife, a *M. laxa* i *M. fructicola* u jednu inicijalnu hifu. *M. fructigena* je obrazovala najduže inicijalne hife, a zatim *M. polystroma* i *M. fructicola* i najkraće *M. laxa*. Na inicijalnim hifama *M. fructicola* je formirala prve bočne grane na najvećoj udaljenosti od konidije, zatim *M. polystroma*, pa *M. fructigena* i na najmanjoj udaljenosti *M. laxa*. Izolati svih vrsta su

obrazovali mikrokonidije sličnog oblika i veličine. U ovom istraživanju je prvi put opisan mikrokonidijski stadijum *M. polystroma*.

Izolati sve četiri *Monilinia* vrste su dobro rasli u uslovima konstantne tame i uslovima 12 h svetlo / 12 h tama, na podlogama V8 i KDA i pri optimalnoj temperaturi od 25°C. Zahtevi prema pH podloge razlikovali su se u zavisnosti od vrste. Veštačkim inokulacijama plodova jabuke, *M. fructigena* je utvrđena kao najvirulentnija vrsta na plodovima jabuka sorti Ajdared, Zlatni Delišeš i Greni Smit. *M. polystroma* je na plodovima jabuke sorte Zlatni Delišeš bila jako virulentna, a na plodovima jabuke Ajdared jako i srednje virulentna. Histopatološka analiza inokulisanih plodova jabuke sorte Ajdared, posle jednog i četiri meseca inokubacije, je pokazala da *M. polystroma* intenzivnije stromatizuje biljno tkivo i obrazuje stromu složenije građe u odnosu na *M. fructigena*.

U ovom istraživanju je pokazano da primena Multiplex PCR metode omogućava pouzdanu molekularnu identifikaciju sve četiri *Monilinia* vrste. Sekvence ITS rDNK regiona 19 izolata *Monilinia* spp. pokazale su da nije bilo variranja izolata unutar vrste. Na osnovu ovog regiona razvijena je nova PCR-RFLP metoda u kojoj se digestijom ITS1 / ITS4 PCR produkata sa *HhaI* restikcionim enzimom omogućava specifična detekcija *M. polystroma*. Filogenetska analiza zasnovana na delu ITS rDNK regiona *Monilinia* spp. je jasno pokazala razdvajanje četiri vrste i filogenetsku bliskost između *M. polystroma* i *M. fructigena*.

Različiti aspekti kontrole *Monilinia* vrsta obuhvatili su ispitavanja antifungalnog dejstva etarskih ulja i isparljivih sastojaka biljaka porodice *Brassicaceae*. Etarska ulja pitome nane, geranijuma i timijana su kontaktom i fumigantnom fazom ispoljila jako inhibitorno delovanje na porast micelije, klijanje konidija i porast inicijalnih hifa *M. fructigena*. U *in vivo* ispitivanjima etarska ulja su ispoljila slabije inhibitorno delovanje nego u *in vitro* ispitivanjima. Najefikasnije delovanje u *in vivo* uslovima ispoljilo je etarsko ulje timijana primenjeno kontaktom u koncentraciji od 0,5% sa kurativnim i protektivnim dejstvom, kao i fumigantnom primenom u koncentraciji 0,1% sa kurativnim dejstvom. Primena etarskih ulja negativno se odrazila na organoleptičke osobine plodova jabuke, osim kod fumigantne primene etarskog ulja geranijuma. Analizom hemijskog sastava ulja pitome nane utvrđen je visok sadržaj mentola i

mentona, u etarskom ulju geranijuma, citronelola i geraniola i u etarskom ulju timijana, timola i *p*-cimenena.

Isparljivi sastojci sedam odomaćenih sorti familije *Brassicaceae* ispoljili su inhibitorno delovanje u *in vitro* uslovima. Najjače inhibitorno dejstvo na porast micelije ispoljili su proizvodi kupusa, karfiola i brokolija, na klijanje konidija proizvodi karfiola, slačice i kupusa, a na porast inicijalnih hifa sastojci slačice, kupusa, bele i crne rotkve. Isparljivi sastojci karfiola i kupusa su izazvali značajne promene u morfologiji hifa *M. fructigena* i *M. fructicola*. Hemijskom analizom sastava biljnog materijala utvrđeno je da su najzastupljeniji isparljivi sastojci bili produkti masnih kiselina. Utvrđeno je i prisustvo izotiocijanata, fenola i terpena. Na osnovu ispoljenog antifungalnog dejstva sastojci nastali hidrolizom biljnog tkiva *Brassicaceae* su izdvojeni u više grupa.

Iz plodova jabuke izolovana je i prvi put u Srbiji opisana i okarakterisana gljiva *Lambertella corni-marisi*, patogen plodova jabuke i antagonista *M. polystroma*, *M. fructigena*, *M. laxa* i *M. fructicola*.

Ključne reči: *Monilinia fructigena*, *M. laxa*, *M. fructicola*, *Monilinia polystroma* morfološke osobine, PCR-RFLP, testovi patogenosti, etarska ulja, *Brassicaceae*, *Lambertella corni-marisi*

Naučna oblast: Biotehničke nauke

Uža naučna oblast: Fitopatologija

UDK: 632.4:634.11:665.52(043.3)

CHARACTERIZATION OF *Monilinia* spp. PATHOGENS OF APPLE FRUIT IN SERBIA AND DIFFERENT ASPECTS OF THEIR CONTROL

ABSTRACT

During a three-year period, from 2010 to 2012, diseased apple fruit with brown rot and black apple symptoms were collected from orchards and storage facilities in Serbia. Upon isolations 349 isolates were obtained. Based on macroscopic morphological and molecular features *M. fructigena*, *M. laxa*, and for the first time in Serbia *M. fructicola* and *M. polystroma* were identified as apple fruit pathogens. The dominant causal agent of apple brown rot in orchards was *M. fructigena* (76.98%), and less distributed were *M. polystroma* (14.78%), *M. laxa* (5.15%), and *M. fructicola* (3.09%). Under storage conditions *M. fructigena* was the dominant species (77.58%), while less distributed were *M. polystroma* (8.62%), *M. fructicola* (6.9%) and *M. laxa* (6.9%).

Isolates of all four species were characterized based on morphological, cultural, ecological, pathogenic and molecular features. Colonies of *M. fructigena* were white to grayish, while several isolates exhibited stromatization in culture. *M. polystroma* formed a grayish colony with entire margins and black stromatal plates were formed in concentric rings. Colonies of *M. laxa* were grayish, with lobbed margins and rosette appearance, while colonies of *M. fructicola* were grayish, with entire margins and masses of spores on areal mycelium. *M. fructigena* exhibited fastest growth rate, while other species had similar growth rate pattern. Conidia of *Monilinia* spp. isolates were one-celled, hyaline, limoniform, formed in chains, larger on inoculated apple fruit compared to V8 medium. *M. fructigena* formed largest conidia, *M. polystroma* slightly smaller, and the smallest were conidia of *M. fructicola* and *M. laxa*. *M. fructigena* and *M. polystroma* formed one or two germ tube per conidia, while *M. fructicola* and *M. laxa* formed one germ tube per conidia. *M. fructigena* had the longest germ tubes, little shorter were germ tubes formed by *M. polystroma* and *M. fructicola*, and the shortest germ tubes were of *M. laxa*. Germ tubes of *M. fructicola* branched at the longest distance from conidium, at lesser distance in *M. polystroma*, then in *M. fructigena* and at shortest distance in *M. laxa*. Microconidial shape and size were similar in all species.

The existence of microconidial state of *M. polystroma* was described for the first time in this study. Colonies of isolates of all species grew fastest in dark and alternating 12 h light / 12 h dark regime, V8 and PDA media, and at 25°C. Optimal pH value for colony growth varied for tested species.

M. fructigena was the most virulent species on artificially inoculate apple fruit of cvs. Idared, Golden Delicious, and Granny Smith. *M. polystroma* was highly virulent on cv. Golden Delicious, while on cv. Idared this species exhibited high and medium virulence. On artificially inoculated apple fruit after one and four months of incubation, *M. polystroma*, unlike *M. fructigena*, stromatized fruit tissue more intensively and formed stromata with a more complex morphology.

Multiplex PCR were used as a reliable molecular tool for delineation between four *Monilinia* species. ITS rDNA sequences of 19 isolates of *Monilinia* revealed no nucleotide variations in this region between isolates of the same species. Based on this region new RFLP method was developed for specific detection of *M. polystroma* by digestion of ITS1 / ITS4 PCR products with *HhaI* restriction enzyme. Phylogenetic analysis of ITS region of *Monilinia* spp. clearly separated all four species and showed closely phylogenetic relationship between *M. polystroma* and *M. fructigena*.

Contact and fumigant phase of peppermint, geranium and thyme essential oils had inhibitory effect on mycelial growth, conidial germination and germ tube elongation of *M. fructigena*. Essential oils had weaker inhibitory effect *in vitro* compared to *in vivo*. *In vivo* thyme EO in concentration of 0.5% exhibited strongest antifungal effect by contact curative and contact protective activity, and by vapour phase (0.1%) applied as protectant. Geranium oil vapours did not change fruit sensory characteristics, while all other treatments had negative effect. Chemical analysis revealed that menthone and menthol were major compounds of peppermint essential oil, citronellol and geraniol of geranium, and thyme and *p*-cimene of thyme oil.

Volatiles of seven *Brassicaceae* cultivars had inhibitory effect *in vivo*. Cauliflower, cabbage and broccoli compounds exhibited strongest inhibitory effect on mycelial growth. Cauliflower, cabbage and white mustard had strongest inhibitory effect on conidial germination, while white mustard, cabbage, black and white radish on germ tube elongation. Cabbage and cauliflower volatiles caused significant alterations in hyphal morphology of *M. fructigena* and *M. fructicola*. Chemical analysis of plant

tissue revealed that fatty acids were the most distributed compounds. Isothiocyanates, phenols and terpenes were also detected. Based on their antifungal effect compounds produced by *Brassicaceae* tissue hydrolysis were divided in groups.

For the first time in Serbia, *L. corni-marisi* was characterized as apple fruit pathogen and antagonist of *M. polystroma*, *M. fructigena*, *M. laxa* and *M. fructicola*.

Key words: *Monilinia fructigena*, *M. laxa*, *M. fructicola*, *Monilinia polystroma*, morphological characteristics, PCR-RFLP, pathogenicity testing, essential oils, *Brassicaceae*, *Lambertella corni-marisi*.

Scientific field: Biotechnical Science

Scientific discipline: Phytopathology

UDC: 632.4:634.11:665.52(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE.....	3
2.1. Ekonomski značaj jabuke	3
2.2. Dosadašnja proučavanja prouzrokovaca bolesti plodova jabuke	4
2.2.1. Prouzrokovaci bolesti plodova jabuke u svetu	4
2.2.2. Prouzrokovaci bolesti plodova jabuke u Srbiji.....	6
2.3. Opšte osobine roda <i>Monilinia</i>	6
2.3.1. Domaćini <i>Monilinia</i> vrsta	7
2.3.2. Ekonomske štete na plodovima jabuke prouzrokovane <i>Monilinia</i> spp.	8
2.3.3. Geografska rasprostranjenost najznačajnijih vrsta roda <i>Monilinia</i>	8
2.3.4. Simptomi bolesti na plodovima jabuke prouzrokovani <i>Monilinia</i> spp.	9
2.3.5. Ciklus razvoja <i>M. fructigena</i>	10
2.4. Identifikacija <i>Monilinia</i> spp.....	11
2.4.1. Morfološke osobine i njihov značaj u identifikaciji vrsta roda <i>Monilinia</i>	11
2.4.2. Osobine genoma i njihov značaj u identifikaciji vrsta roda <i>Monilinia</i>	18
2.4.3. Stroma vrsta roda <i>Monilinia</i>	21
2.5. Kontrola vrsta roda <i>Monilinia</i>	24
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	30
4. MATERIJAL I METODE	31
4.1. Izolacija i identifikacija <i>Monilinia</i> spp.	31
4.1.1. Pregled terena i sakupljanje uzoraka simptomatičnih plodova jabuke	31
4.1.2. Izolacija gljiva i dobijanje čistih kultura	31
4.1.3. Provera patogenosti, reizolacija i dobijanje monosporijalnih kultura	31
4.1.4. Identifikacija izolata <i>Monilinia</i> spp. na osnovu morfoloških osobina	32
4.1.5. Molekularna detekcija izolata <i>Monilinia</i> spp.	33
4.2. Proučavanje morfoloških osobina izolata <i>Monilinia</i> spp.....	35

4.3. Proučavanje ekoloških i odgajivačkih osobina izolata <i>Monillinia</i> spp.....	37
4.4. Proučavanje patogenih osobina izolata <i>Monilinia</i> spp.	39
4.4.1. Proučavanje virulentosti izolata.....	39
4.4.2. Proučavanje intenziteta sporulacije ispitivanih izolata na inokulisanim plodovima jabuke	40
4.4.3. Proučavanje histopatologije plodova jabuke i morfologija stroma	40
4.5. Proučavanje molekularnih osobina <i>Monilinia</i> spp.....	41
4.5.1. Pogodnost upotrebe različitih prajmera za specifičnu detekciju <i>Monilinia</i> spp.	41
4.5.2. Ispitivanje sekvenci nukleotida ITS rDNK regiona izolata <i>Monilinia</i> spp.	43
4.5.3. Ispitivanje pogodnosti ITS rDNK regiona izolata <i>Monilinia</i> spp. za RFLP analizu	45
4.5.4. Ispitivanje filogenetskih međudnosa	45
4.6. Ispitivanje zastupljenosti <i>Monilinia</i> spp. u zasadima i skladištima	46
4.7. Ispitivanje antifungalnog delovanja etarskih ulja na <i>M. fructigena</i>	46
4.8. Ispitivanje antifungalnog delovanja isparljivih sastojaka tkiva biljaka familije <i>Brassicaceae</i> na <i>Monilinia</i> spp.	52
4.9. Antagonisti <i>Monilinia</i> spp.	56
4.9.1. Izolacija i identifikacija	56
4.9.2. Ispitivanje antagonističkog dejstva dobijenih izolata prema <i>Monilinia</i> spp.	57
4.9.3. Ispitivanje ekoloških, odgajivačkih i patogenih osobina dobijenih izolata	57
4.10. Statistička analiza	59
5. REZULTATI	61
5.1. Simptomi bolesti	61
5.1.1. Dobijeni izolati <i>Monilinia</i> spp. i provera patogenosti	64
5.1.2. Morfološka identifikacija	65
5.1.3. Molekularna detekcija izolata <i>Monilinia</i> spp.	69
5.1.4. Odabir izolata <i>Monilinia</i> spp. za dalja proučavanja	69
5.2. Morfološka karakterizacija izolata <i>Monilinia</i> spp.	70
5.2.1. Makroskopske osobine i brzina porasta kolonije <i>Monilinia</i> spp.	70
5.2.2. Mikroskopske osobine izolata <i>Monilinia</i> spp.	77

5.3. Ekološke i odgajivačke osobine izolata <i>Monilinia</i> spp.....	103
5.3.1. Uticaj svetlosnih režima na porast i sporulaciju izolata <i>Monilinia</i> spp.	103
5.3.2. Uticaj različitih temperatura na porast i sporulaciju izolata <i>Monilinia</i> spp.	106
5.3.3. Uticaj različitih hranljivih podloga na porast i sporulaciju izolata <i>Monilinia</i> spp.	112
5.3.4. Uticaj različitih pH vrednosti na porast i sporulaciju izolata <i>Monilinia</i> spp.	117
5.4. Patogene osobine izolata <i>Monilinia</i> spp.	123
5.4.1. Simptomi na inokulisanim plodovima jabuke	123
5.4.2. Promene u zaraženom tkivu plodova jabuke inokulisanim <i>M. fructigena</i> i <i>M. polystroma</i> posle jednog i četiri meseca inkubacije	127
5.4.3. Pogodnost različitih metoda bojenja za histopatološka ispitivanja plodova jabuke	129
5.4.4. Anatomijski preseki plodova jabuke inokulisani <i>M. fructigena</i> i <i>M. polystroma</i>	131
5.4.5. Virulentnost izolata <i>Monilinia</i> spp. na plodovima jabuke.....	135
5.4.6. Intenzitet sporulacije na inokulisanim plodovima jabuke	144
5.5. Molekularne osobine izolata <i>Monilinia</i> spp.....	147
5.5.1. Pogodnost upotrebe različitih prajmera za specifičnu detekciju <i>Monilinia</i> spp.	147
5.5.2. Analiza sekvenci ITS rDNA regiona <i>Monilinia</i> spp.	154
5.5.3. RFLP analiza ITS rDNA regiona <i>Monilinia</i> spp.	155
5.5.4. Filogenetska analiza ITS rDNA regiona <i>Monilinia</i> spp.	156
5.6. Zastupljenost vrsta roda <i>Monilinia</i> na plodovima jabuke u Srbiji.....	158
5.7. Antifungalno delovanje etarskih ulja na <i>M. fructigena</i>	162
5.7.1. <i>In vitro</i> fumigantno delovanje različitih etarskih ulja na porast micelije <i>M. fructigena</i>	162
5.7.2. <i>In vitro</i> delovanje etarskih ulja pitome nane, geranijuma i timijana na porast micelije <i>M. fructigena</i>	163
5.7.3. Delovanje etarskih ulja pitome nane, geranijuma i timijana na klijanje konidija i porast inicijalnih hifa <i>M. fructigena</i>	168

5.7.4. <i>In vivo</i> fumigantno protektivno i kurativno delovanje etarskih ulja na <i>M. fructigena</i>	171
5.7.5. <i>In vivo</i> kontaktno protektivno i kurativno delovanje etarskih ulja na <i>M. fructigena</i>	172
5.7.6. Efikasnost načina primene etarskih ulja u <i>in vivo</i> uslovima.....	177
5.7.7. Organoleptičke osobine tretiranih plodova jabuka.....	179
5.7.8. Hemijski sastav etarskih ulja	182
5.8. Antifungalno delovanje isparljivih sastojaka tkiva biljaka familije <i>Brassicaceae</i> na <i>Monilinia</i> spp.....	183
5.8.1. Delovanje isparljivih sastojaka tkiva biljaka familije <i>Brassicaceae</i> na porast micelije	183
5.8.2. Delovanje isparljivih sastojaka tkiva biljaka familije <i>Brassicaceae</i> na klijanje konidija i dužinu inicijalnih hifa	187
5.8.3. Delovanje isparljivih sastojaka tkiva biljaka familije <i>Brassicaceae</i> na morfologiju hifa i inicijalnih hifa.....	191
5.8.4. Hemijski sastav biljnog tkiva vrsta familije <i>Brassicaceae</i>	193
5.9. Antagonisti <i>Monilinia</i> spp.	195
5.9.1. Identifikacija	195
5.9.2. Antagonističko delovanje <i>L. corni-maris</i> na porast micelije <i>Monilinia</i> spp.	198
5.9.3. Ekološke, odgajivačke i patogene osobine dobijenih izolata <i>L. corni-maris</i>	205
6. DISKUSIJA	214
6.1. Simptomi bolesti	214
6.2. Identifikacija <i>Monilinia</i> spp.....	215
6.3. Morfološka karakterizacija <i>Monilinia</i> spp.....	216
6.4. Ekološke i odgajivačke osobine <i>Monilinia</i> spp.	220
6.5. Patogene osobine <i>Monilinia</i> spp.	222
6.6. Molekularne osobine <i>Monilinia</i> spp.	224
6.7. Zastupljenost <i>Monilinia</i> spp. u voćnjacima i skladištima jabuke u Srbiji	226
6.8. Antifungalno dejstvo etarskih ulja	228
6.9. Antifungalno delovanje isparljivih sastojaka tkiva biljaka familije <i>Brassicaceae</i>	231
6.10. <i>Lambertella corni-maris</i> patogen ploda jabuke i antagonista <i>Monilinia</i> spp.....	234

7. ZAKLJUČAK.....	238
8. LITERATURA	242
9. PRILOZI.....	272

1. UVOD

Jabuka (*Malus domestica* Borkh.) je jedna od najznačajnijih voćarskih kultura u Srbiji, koja se prema podacima iz 2014. godine gaji na površini od 23.737 ha (**Republički zavod za statistiku Srbije, 2014**). Veliki broj različitih vrsta fitopatogenih gljiva su opisane kao prouzrokovatori oboljenja plodova jabuke. Među njima, vrste roda *Monilinia* izazivaju smeđu trulež plodova jabuke tokom vegetacije i tokom čuvanja. Ekonomske štete koje *Monilinia* vrste izazivaju na jabuci kreću se od 7 do 25%, a u uslovima skladištenja jabuke od 0,6 do 8% (**Berrie and Holb, 2014; Leeuwen et al., 2000**). Posebno visoke štete zabeležene su u organskoj proizvodnji i do 46% (**Holb, 2004a**).

U Evropi je najznačajniji prouzrokovatelj propadanja plodova jabučastog voća *M. fructigena* (**van Leeuwen et al., 2000**). *M. fructicola* je karantinska vrsta za Evropu (**OEPP / EPPO, 2009**), ali je opisana na plodovima jabuke u Italiji, Nemačkoj i Češkoj (**Duchoslavova et al., 2007; Grabke et al., 2011; Martini et al., 2013; Peter et al., 2015**). U našoj zemlji ova vrsta se nalazi na IA listi deo I štetnih patogena (**Službeni glasnik Republike Srbije, br. 7/2010**). *M. polystroma*, koja je veoma slična *M. fructigena*, utvrđena je kao patogen plodova jabuke u Mađarskoj (**Petroczy and Palkovics, 2009**), Češkoj, (**OEPP / EPPO, 2011**), Poljskoj (**Poniatowska et al., 2013**) i Hrvatskoj (**Di Francesco et al., 2015**). Sporadično se na plodovima jabuke može javiti i *M. laxa* (**Wormald, 1954; Byrde and Willetts, 1977; Batra, 1991**).

U kontroli oboljenja prouzrokovanih *Monilinia* spp. primenjuje se više različitih mera, koje obuhvataju agrotehničke, hemijske, fizičke i biološke mere zaštite. Sve veći zahtevi prema hrani bez pesticida, kao i zaštiti životne sredine od ostataka pesticida pokrenuli su ispitivanja efikasnosti i moguće primene različiti nepesticidnih mera kontrole biljnih patogena. Jedan od pravaca je korišćenje različitih grupa sekundarnih metabolita biljaka. Među njima izdvajaju se etarska ulja za koje je poznato da pored drugih farmakoloških svojstava poseduju antimikrobno i fungicidno dejstvo (**Zambonelli et al., 1996; Oxenham et al., 2005**). Takođe, po svojoj antimikrobnoj efikasnosti izdvajaju se i izotiocijanati koji nastaju hidrolizom glukozinolata, sekundarnih metabolita biljaka familije *Brassicaceae*. Utvrđeno je više od 120

glukozinolata, njihov sadržaj je različit i zavisi od vrste, ekotipa, razvojnog stadijuma i fotoperioda (**Fahey et al., 2001; Mari et al., 2008; Wu et al., 2011**).

U našoj zemlji kao prouzrokovajući propadanja plodova jabuke utvrđene su *M. fructigena* i *M. laxa* (**Tošić i sar., 1994; Vučković i Babović, 1997; Ivanović i Ivanović, 2001**), kao i dve nove vrste *M. fructicola* (**Vasić et al., 2012**) i *M. polystroma* (**Vasić et al., 2013**).

Imajući u vidu značaj jabuke kao voćne vrste u Srbiji i učestalu pojavu oboljenja tokom vegetacije i čuvanja, kao i sve raširenije skladištenje plodova u kontrolisanim uslovima, ukazala se potreba za utvrđivanjem prisustva i rasprostranjenosti vrsta roda *Monilinia* na jabuci u našoj zemlji i ispitivanjem antifungalnog dejstva sekundarnih metabolita različitih biljnih vrsta, kao zdravstveno bezbednih aspekata njihove kontrole.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Ekonomski značaj jabuke

Jabuka (*Malus domestica* Borkh.) je jedna od najznačajnijih voćarskih kultura u svetu. Velika sposobnost prilagođavanja različitim prirodnim uslovima i visok kvalitet plodova osigurali su joj veoma značajno mesto u voćarstvu sveta, pa se po proizvodnji, prometu i potrošnji, nalazi na trećem mestu odmah iza citrusa i banana (**Mišić, 1994**). Njena godišnja proizvodnja u svetu raste i tokom poslednjih nekoliko godina bila je iznad 70 miliona tona. Najveći svetski proizvođač jabuke je Kina sa godišnjom proizvodnjom većom od 30 miliona tona. U Evropi vodeći proizvođači su Turska, Poljska i Italija sa proizvodnjom većom od 2 miliona tona (**Faostat, 2015**).

Veoma povoljni klimatsko-edafski uslovi u Srbiji omogućavaju uspešnu proizvodnju kvalitetnih sorti jabuke (**Mišić, 1994**). Prema podacima iz 2014. godine u Republici Srbiji pod višegodišnjim zasadima jabuke nalazi 23.737 ha (**Republički zavod za statistiku Srbije, 2014**). Godišnja proizvodnja jabuke u Srbiji u 2014. godini iznosila je 336.313 tona (**Republički zavod za statistiku Srbije, 2014**). Prosečan prinos jabuke u Srbiji od 2012. do 2014. godine iznosio je 14,6 tona. Agroekološki uslovi u Srbiji su optimalni za gajenje sorti jabuke kao što su Gala, Ajdared, Jonagold, Zlatni Delišeš, Crveni Delišeš, Breburn, Fudži i Greni Smit, kao i njihovih klonova (**Obradović i sar., 2015**).

Plodovi jabuke imaju dugu sezonu upotrebe u svežem stanju jer se posle berbe mogu čuvati do šest meseci u hladnjačama sa normalnom atmosferom (NA) gde su regulisani temperatura i vlažnost vazduha, do osam meseci u hladnjačama sa kontrolisanom atmosferom (KA) gde su regulisani temperatura, vlažnost vazduha, kao i koncentracije CO₂ i O₂, kao i do 10 meseci u hladnjačama sa ultraniskim sadržajem kiseonika (ULO) (sadržaj kiseonika najviše 2%) (**Pašalić, 2009**). Optimalni uslovi čuvanja plodova jabuke zavise od sortnih osobina i plodovi većine sorti jabuke najbolje se čuvaju pri vlažnosti vazduha od 90 do 95% i temperaturi od 0 do 4,5°C (**Vico i Jurick, 2012**).

Jabuka se kao stono voće koristi cele godine, ali se plodovi mogu upotrebiti za različite oblike prerade kao što su sok, koncentrat, sirup, kompot, džem, marmelada, pektin i jabučna kiselina (Mišić, 1994).

2.2. Dosadašnja proučavanja prouzrokovaca bolesti plodova jabuke

2.2.1. Prouzrokovaci bolesti plodova jabuke u svetu

Veliki broj različitih vrsta fitopatogenih gljiva su opisane kao prouzrokovaci oboljenja plodova jabuke. One mogu ostvariti infekciju u različitim fazama razvoja i zrelosti plodova, a simptomi oboljenja na plodovima jabuke mogu se ispoljiti u toku vegetacije ili tokom čuvanja (Sutton et al, 2014).

U svetu su kao prouzrokovaci bolesti plodova jabuke tokom vegetacije opisane sledeće vrste: *Venturia inaequalis* prouzrokovac čađave krastavosti plodova jabuka (Biggs and Stensvand, 2014), *Podosphaera leucotricha* prouzrokovac pepelnice jabuke (Hickey, 2014a), *Bothryosphaeria dothidea* prouzrokovac bele truleži (Sutton, 2014a), *D. seriata* prouzrokovac crne truleži (Sutton, 2014b), *Colletotrichum gloeosporoides* i *C. acutatum* prouzrokovaci gorke truleži (Jones et al., 1996; Sutton, 2014a), ali i *C. fragariae*, *C. fructicola*, *C. theobromicola*, *C. melonis*, *C. nymphaeae*, *C. karstii*, *C. godetiae* (Alaniz et al., 2012; Munda et al., 2014; Baroncelli et al., 2014; Velho et al., 2015) i *Alternaria* spp. (Harteveld et al., 2013).

U toku vegetacije prouzrokovaci bolesti plodova jabuke mogu biti gljive iz roda *Phytophthora* (Covey and Harris, 2014), *Phyllosticta solitaria* (Yoder 2014a), zatim *Ellisembia asterinum* (Yoder and Sutton, 2014), *Nigrospora oryzae* (Yoder, 2014b), *Sclerotinia sclerotiorum* (Hickey, 2014b) i gljive prouzrokovaci čađave mrljavosti i crnotačkaste zonalne pegavosti (Sooty blotch and Flyspeck, SBFS): *Scleroramularia* spp., *Peltaster* spp., *Dissoconium* spp., *Ramichloridium* spp., *Houjia pomigena*, *Phaethecoidiella* spp., *Sporidesmajora pennsylvaniensis*, *Stomiopeltis* spp., *Collegloeopsis* spp, *Ramichloridium* spp., *Ramularia* spp., *Mycrocyclosporella* spp., *Pseudocercospora* spp., *Schizothyrium pomi*, *Zigophiala* spp., *Mycrocyclopora* spp., *Gaestrumia polystigmatis*, *Phialophora sessilis*, *Streliatziana mali*, *Leptodontium elatius* i *Wallemia sebi* (Gleason et al., 2011).

Kao prouzrokovajući propadanja plodova jabuke u toku čuvanja u skladištima u svetu su opisane vrste roda *Penicillium*, prouzrokovajući plave truleži: *P. expansum* (Rosenberger, 2014a; Pianzzola et al., 2004; Amiri and Bompeix, 2005; van der Walt et al., 2010), *P. solitum* (Pitt et al., 1991; Sanderson and Spotts, 1995; Pianzzola et al., 2004), *P. viridicatum*, *P. brevicopactum* (Pianzzola et al., 2004), *P. commune*, *P. verrucosum*, *P. rugulosum*, *P. digitatum* (Amiri and Bompeix, 2005), *P. crustosum*, *P. polonicum* (Anderson and Thrane, 2006), *P. ramulosum*, *P. chermisinum*, *P. glabrum*, *P. dendriticum*, *P. funiculosum* (van der Walt et al., 2010), *P. carneum* (Anderson and Thrane, 2006; Peter et al., 2012), *P. chrysogenum* (Anderson and Thrane, 2006; Alwakeel, 2013), *P. adometzii* i *P. steckii* (Alwakeel, 2013). Siva trulež plodova jabuke prouzrokovana gljivom *Botrytis cinerea* je takođe značajno oboljenje (Xiao, 2014). Propadanje jabučastog voća tokom čuvanja prouzrokuju i *Neofabrea alba*, *N. malicorticis*, *N. perennans* i *Cryptosporiopsis kienholzii* prouzrokovajući bolesti volovsko oko (Spotts et al, 2009), *Fusarium solani*, *F. equiseti* (Pitt and Hocking, 2009), *F. avenaceum*, *F. proliferatum* (Konstantinou et al., 2011), *Alternaria alternata*, *A. tenuissima* (Vinas et al., 1992), *A. arborescens*, *A. infectoria*, *A. tenuissima* (Serdani et al., 2002), *A. mali*, *A. pomicola* (Pitt and Hocking, 2009), *Mucor piriformis*, *M. mucedo*, *M. racemosus*, *M. strictus* (Spotts, 2014a), *Sphaeropsis pyriputrescens* (Xiao et al., 2004), *Phacidiopycnis washingtonensis* (Xiao et al., 2005; Weber, 2011), *B. dothidea*, *D. seriata*, *Neofusicoccum parvum* (Rosenberger, 2014b; Jurick et al., 2013a; Jurick et al., 2013b), *C. acutatum*, *C. gloeosporioides*, *C. fioriniae*, *C. clavatum* (Ivić et al., 2013; Onofre and Antoniazzi, 2014), *Cladosporium herbarum* (Sugar, 2014), *Coprinus psychromorbidus* (Spotts, 2014b), *Butlerella eustacei* (Rosenberger and Xiao, 2014), *Trihotecium roseum* (Rosenberger and Xiao, 2014), *Rhizopus* sp. (Rosenberger and Xiao, 2014), *Stemphylium herbarum* (Rosenberger and Xiao, 2014), *Phytophthora* sp., *V. inequalis* (Snowdon, 1990; Pitt and Hocking, 2009) i *Lambertella corni-maris* (Wiseman et al., 2015).

Gljive iz roda *Monilinia* su prouzrokovajući smeđe truleži plodova jabuke. One izazivaju propadanje plodova tokom vegetacije, ali i kasnije tokom čuvanja. Među njima najznačajnije su *M. fructigena*, *M. laxa*, *M. fructicola* i *M. polystroma* (Wormald, 1954; Byrde and Willetts, 1977; Berrie and Holb, 2014; Batra, 1991;

van Leeuwen et al., 2000; Xu et al., 2001; van Leeuwen et al., 2002; Holb, 2004; Petroczy and Palkovics, 2009).

2.2.2. Prouzrokovaci bolesti plodova jabuke u Srbiji

U našoj zemlji su kao značajni prouzrokovaci bolesti jabuke tokom vegetacije opisane *V. inaequalis* i *P. leucitricha* (Aleksić, 2006; Ivanović i Ivanović, 2001). Kao patogeni plodova jabuke u Srbiji se navode i *B. obtusa* (Stojanović i sar., 1996), *M. laxa* (Vučković i Babović, 1997), *M. fructigena* (Ivanović i Ivanović, 2001), *M. fructicola* (Vasić et al., 2012a) i *M. polystroma* (Vasić et al., 2013a). Kao prouzrokovaci čadave mrljavosti i crnotačkaste zonalne pegavosti u našoj zemlji utvđene su *Schizachyrium pomi*, *Pseudocercospora* sp. RH1, *Pseudocercospora* RH3, *Peltaster fructicola* i *Pseudocercospora* sp. (Ristić, 2009; Ivanović et al., 2010).

Tokom čuvanja su u Srbiji kao prouzrokovaci propadanja plodova jabuka identifikovane sledeće fitopatogene gljive: *M. fructigena* (Babović i sar., 1979; Tošić i sar., 1994; Vučković i Babović, 1997), *P. expansum* (Vico i sar., 2013), *Fusarium lateritium* (Stojanović, 1968), *F. lactis* (Babović i sar., 1979), *F. avenaceum* (Babović i sar., 1994), *Stemphylium botryosum*, *Leptothyrium pomi*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium fulvum*, *Alternaria tenuissima* (Babović i sar., 1979), *Pestalotiopsis* sp. (Arsenijević i Jančurević, 1988), *B. obtusa* (Stojanović i sar., 1996), *B. cinerea* (Babović i sar., 1997), *C. acutatum*, *C. gloeosporoides* (Trkulja, 2003; Grahovac, 2014) i *Phomopsis perniciosa* (Arsenijević i Gavrilović, 2005). Novija istraživanja utvrdila su kao prouzrokovace propadanja plodova jabuke u skladištu i vrste *M. fructicola* (Vasić et al., 2012b), *B. dothidea* (Vasić et al., 2013b), *P. crustosum* (Vico et al., 2014) i *Neofabraea alba* (Vico et al., 2015).

2.3. Opšte osobine roda *Monilinia*

Vrste roda *Monilinia* ubrajaju se među ekonomski najštetnije patogene i uzročnici su sušenja cvetova, grančica i mrke truleži plodova jabučastih i koštičavih vrsta voćaka koje pripadaju rodovima *Prunus*, *Malus* i *Pyrus* (Wormald, 1954; Byrde and Willetts, 1977; Batra, 1991).

Monilinia spp. pripadaju carstvu Fungi, razdelu Ascomicota, podrazdelu Discomycetes, klasi Pezizomycotina, podklasi Leotiomycetes, redu Helotiales, familiji *Sclerotiniaceae*.

Rod *Monilinia* je podeljen na dve sekcije *Junctoriae* i *Disjunctoriae*. Kod sekcije *Disjunctoriae* konidije u lancima su odvojene septama, dok kod sekcije *Junctoriae* nisu. Vrste koje pripadaju sekciji *Disjunctoriae* su specijalizovane da parazitiraju samo jednog domaćina, dok vrste sekcije *Junctoriae* predstavljaju polifagne patogene voćnih vrsta. Ekonomski najznačajnije vrste sekcije *Junctoriae* su *M. fructicola* (G. Winter) Honey, *M. fructigena* (Aderhold and Ruhland) Honey ex Whetzel, *M. laxa* (Aderhold and Ruhland) Honey i *Monilia polystroma* van Leeuwen. U okviru vrste *M. laxa* opisana je i *M. laxa* f. sp. *mali* kao prouzrokovatelj sušenja cvetova i grančica jabuke (Wormald, 1954), a u okviru sekcije opisane su i dve nove vrste: *Monilia mumecola* Y. Sasaki and Sano, T, (Harada et al., 2004) i *Monilia yunnanensis* M.J. Hu and C. X. Luo sp. (Hu et al., 2011).

2.3.1. Domaćini *Monilinia* vrsta

Glavni domaćini *M. fructicola*, *M. fructigena* i *M. laxa* su: jabuka (*Malus pumila*), kruška (*Pyrus communis*), dunja (*Cydonia oblonga*), kajsija (*Prunus armeniaca*), trešnja (*P. avium*), višnja (*P. cerasus*), šljiva (*P. domestica*), breskva (*P. persica*) i badem (*P. amygdalis*) (Byrde and Willetts, 1977). Domaćini *M. fructicola* su osim koštičavog i jabučastog voća i *Chaenomeles* spp., *Crataegus* spp., kupina (*Rubus fruticosus*), *Eriobotrya japonica* i plodovi grožđa (*Vitis vinifera*) (Baker, 2011). U Srbiji je *M. fructigena* pronađena i na grožđu (Stojanović i Kostić, 1958; loc. cit. Ivanović i Ivanović, 2001).

Krug odmaćina *M. polystroma* obuhvata jabuku (van Leeuwen et al., 2000; Petroczy and Palkovics, 2009; OEPP / EPPO, 2011; Vasić et al., 2013a; Poniatowska et al., 2013; Di Francesco et al., 2015), krušku (Martini et al., 2015), šljivu (Zhu and Guo, 2010; Poniatowska et al., 2013), breskvu (OEPP / EPPO, 2011; Martini et al., 2014; Poniatowska et al., 2013) i kajsiju (Hilber-Bodmer et al., 2012).

2.3.2. Ekonomske štete na plodovima jabuke prouzrokovane *Monilinia* spp.

Iako sve vrste roda *Monilinia* mogu uspešno da parazitiraju plodove jabuke, *M. fructigena* je ekonomski najznačajniji prouzrokovatelj smeđe truleži plodova jabuke (Byrde and Willetts, 1977; Batra, 1991; van Leeuwen et al., 2000; Holb, 2004a). U Velikoj Britaniji Wormald (1954) je zabeležio značajne štete prouzrokovane *M. laxa* f. sp. *mali* u vidu sušenja cvetova i pojave rak rana na granama jabuke.

Ekonomske štete prouzrokovane vrstama roda *Monilinia* na jabuci kreću se od 7 do 25% u toku vegetacije, a u uslovima skladištenja od 0,6 do 8% (Berrie and Holb, 2014). U Holandiji su gubici u prinosu jabuke prouzrokovani *M. fructigena* iznosili 4-5% u vegetaciji i 1-2% u hladnjačama (van Leeuwen et al., 2000), dok su u Engleskoj tokom vegetacije gubici bili 1-11% i varirali su u zavisnosti od sortimenta i vremenskih uslova (Xu et al., 2001). Mnogo veći gubici, od 27-46%, zabeleženi su u organskoj proizvodnji jabuke u Mađarskoj (Holb, 2004a). Procenat zaraženih plodova jabuke je bio viši na kasnijim sortama, verovatno zbog duže izloženosti inokulumu sa zaraženih plodova ranih sorti koji su ostali u krošnji ili su opali na zemlju (Holb and Scherm, 2007). Ivanović i Ivanović (2001) navode da *M. fructigena* može izazvati ekonomske štete i do 80% u netretiranim zasadima jabuke u Srbiji.

Gubici u prinosu zavise od klimatskih faktora, sortimenta, kao i od učestalosti kontakata zdravih i zaraženih plodova (Xu et al., 2001). Plodovi sa mehaničkim povredama nastalim usled delovanja abiotskih faktora, kao i sa oštećenjima od insekata (*Cydia pomonella* i *Forficula auricularia*) ili ptica (*Turdus merula*) su podložniji infekciji *Monilinia* spp. zbog čega su i ekonomske štete veće (Croxall et al., 1951, Lack, 1989; loc. cit. Holb, 2004a; van Leeuwen et al., 2000; Xu and Robinson, 2000; Holb and Scherm, 2008).

2.3.3. Geografska rasprostranjenost najznačajnijih vrsta roda *Monilinia*

Gljive iz roda *Monilinia* su rasprostranjene u celom svetu. *M. fructigena* je široko rasprostranjena u Evropi i Aziji i karantinska je vrsta za Severnu Ameriku i Australiju, *M. laxa* je prisutna na svim kontinentima, a *M. fructicola* u Severnoj i Južnoj Americi, Japanu, i Australiji (Wormald, 1954; Byrde and Willetts, 1977; Batra 1991; OEPP / EPPO, 2009; Cabi. org, 2016). Novija istraživanja pokazuju široku

rasprostranjenost *M. fructicola* na koštičavom voću u Kini (Fan et al., 2010; Zhu et al., 2011). Ova vrsta je karantinska vrsta za Evropu (EPPO A2 lista karantinski štetnih vrsta) (OEPP / EPPO, 2009), a kod nas se nalazi na IA listi deo I štetnih patogena (Službeni glasnik Republike Srbije, br. 7/2010). U Evropi je prvi put utvrđena u Francuskoj 2001. godine, a kasnije i u Španiji, Austriji, Mađarskoj, Italiji, Nemačkoj, Sloveniji, Poljskoj, Rumuniji, Švajcarskoj, Slovačkoj, Češkoj, Hrvatskoj i Grčkoj (Baker, 2011; Ivić et al., 2014; Papavasileiou et al., 2014). Iako se najveći broj saopštenja odnosi na prisustvo karantinske vrste na koštičavom voću, *M. fructicola* je opisana i kao prouzrokovač propadanja plodova jabuke tokom vegetacije u Češkoj, Nemačkoj i Italiji (Duchoslavova et al., 2007; Grabke et al., 2011; Martini et al., 2013; Peter et al., 2015). Prisustvo *M. fructicola* utvrđeno je i u Srbiji, na uskladištenom plodu jabuke, na teritoriji opštine Grocka (Vasić et al., 2012a), a kasnije i na plodovima nektarine uzorkovanim na zelenoj pijaci u Beogradu, a poreklom sa Oplenca (Hrustić et al., 2013).

M. laxa f. sp. *mali* je opisana u Velikoj Britaniji (Wormald, 1954) i Sloveniji (Celar i Valič, 1999; Grill et al., 2008).

Prisustvo *M. polystroma* je utvrđeno u Kini (Zhu and Guo, 2010) Mađarskoj (Petroczy and Palkovics, 2009), Švajcarskoj (Hilber-Bodmer et al., 2012), Češkoj (OEPP / EPPO, 2011), Srbiji (Vasić et al., 2013a), Poljskoj (Poniatowska et al., 2013), Italiji (Martini et al., 2014) i Hrvatskoj (Di Francesco et al., 2015).

2.3.4. Simptomi bolesti na plodovima jabuke prouzrokovani *Monilinia* spp.

Plodovi različite zrelosti mogu biti zaraženi *Monilinia* vrstama. Prvi simptomi na plodovima se uočavaju u vidu sitnih okruglastih pega smeđe boje oko mesta ostvarene infekcije. Razvojem oboljenja pega se širi i smeđa trulež zahvata cele plodove. Pege su na početku glatke, ali u okviru njih patogen sporuliše u sporodohijama koje probijaju kutikulu plodova u vidu jastučića svetložute boje. Sporodohije se često obrazuju u koncentričnim krugovima. U uslovima niske relativne vlažnosti i na nezrelim plodovima izostaje sporulacija patogena. U zaraženim plodovima micelija gljive prožima tkivo, stromatizuje, a zatim usled gubitka tečnosti plodovi smežuravaju, postaju čvršći i pretvaraju se u mumije. Mumije mogu ostati na stablima ili pasti na zemlju, gde prezimljavaju prekrivene lišćem ili zakopane u zemlji (Byrde and Willetts, 1977).

U skladištima na zaraženim plodovima se ispoljavaju simptomi truleži crne boje što je verovatno uslovljeno odsustvom svetlosti (**Wormald, 1954**). Vreme infekcije plodova takođe može biti jedan od faktora koji utiču na ispoljavanje simptoma u skladištima. Simptom se prvo uočava kao smeđa trulež, ali kasnije počinje potamnjivanje pokožice u vidu crnih prstenova oko lenticela i celokupan plod postaje crne boje. Sporulacija patogena je retka ili gotovo potpuno odsutna, ali se uočava pojava beličaste micelije na površini zaraženog tkiva. Takvi plodovi ne smežuravaju, već ostaju nepromenjene strukture i sjajne pokožice. Ipak, kad se ovakvi plodovi iznesu iz hladnjača, vremenom se pretvaraju u mumije (**Wormald, 1954**).

2.3.5. Ciklus razvoja *M. fructigena*

M. fructigena prezimljava u mumificiranim plodovima jabuke koji predstavljaju izvor inokuluma za infekciju plodova naredne sezone (**Byrde and Willetts, 1977**). Pored plodova, gljiva može da prezimljava i na zaraženim grančicama, peteljicama plodova, kao i rak ranama na granama. Tokom proleća na mumijama, kao i ostalim zaraženim organima jabuke, gljiva formira konidije u lancima na konidioforama koje služe za primarne infekcije (**Byrde and Willetts, 1977**).

Osim konidija koje su nastale bespolnim razmnožavanjem gljive i predstavljaju najznačajnije tvorevine u ciklusu razvoja *M. fructigena* (**Byrde and Willetts, 1977; Batra, 1991; Xu et al., 2000; Xu et al., 2001; Bannon et al., 2009; Holb, 2008**), prisustvo apotecija sa askusima i askosporama, nastalih polnim razmnožavanjem gljive, je utvrđeno na plodovima u voćnjacima u Nemačkoj, Rusiji i Japanu (**Aderhold and Ruhland, 1905; Solkina, 1931; loc. cit. Batra and Harada, 1986**), kao i na mumificiranim plodovima, čuvanim u laboratorijskim uslovima u Italiji, Danskoj i SAD (**Manaresi, 1920; Johansen, 1945; Batra, 1979; loc.cit. Batra and Harada, 1986**). Razmena genetičkog materijala prilikom formiranja polnog stadijuma gljive može da dovede do pojave novih izolata drugačijih osobina (**Batra and Harada, 1986**). Međutim, za razliku od *M. fructicola*, koja je učestalo formirala polni stadijum u Kaliforniji (**Hong and Michailides, 1998**), nije utvrđen značaj polnog stadijuma u ciklusu razvoja *M. fructigena* (**Batra and Harada, 1986**).

Obrazovane spore se prenose vetrom, vodom ili vektorima kao što su insekti ili ptice (**Pauvert et al., 1969; Lack, 1989; loc. cit. Bannon et al., 2009**). *M. fructigena* je

patogen koji najčešće prodire kroz rane, ali može da prodire i kroz lenticele (**Horne et al., 1933; loc. cit. van Leeuwen et al., 2000**). Posle infekcije, dolazi do pojave simptoma smeđe truleži i na površini zaraženog tkiva se obrazuje mnoštvo sporodohija. Plodovi oštećeni od ptica, insekata, usled pucanja pokoričnog tkiva zbog intenzivnog porasta ploda, kao i plodovi koji su kontaktu sa zaraženim plodovima su podložniji infekciji patogenom (**Xu et al., 2001; Holb and Scherm, 2008**). Prema **Xu and Robinson (2000)** prisustvo vlage na mestu povreda nije neophodno za ostvarivanje infekcije sporama *M. fructigena* i kasniju pojavu simptoma bolesti.

Bannon et al. (2009) su pokazali da temperatura vazduha, kao i pravac i brzina vetra mogu da utiču na koncentraciju spora *M. fructigena* u vazduhu. Temperatura predstavlja biološki najznačajniji faktor koji je neophodan za obrazovanje spora, kao i njihovo dozrevanje. Međutim, **Bannon et al. (2009)** nisu utvrdili korelaciju između količine dnevnih padavina i koncentracije spora u vazduhu, slično kao i u istraživanju **Holb (2008)**. Utvrđena je značajna korelacija između broja zaraženih opalih plodova sorti koje ranije sazrevaju i intenziteta pojave simptoma na plodovima sorti koje sazrevaju kasnije tokom vegetacije (**Holb and Scherm, 2007**).

2.4. Identifikacija *Monilinia* spp.

2.4.1. Morfološke osobine i njihov značaj u identifikaciji vrsta roda *Monilinia*

Morfološke osobine *Monilinia* spp. značajne za identifikaciju obuhvataju mikroskopske i makroskopske odlike. Mikroskopske karakteristike su izgled i veličina reproduktivnih struktura gljive. U polnom delu životnog ciklusa vrste roda *Monilinia* se odlikuju formiranjem peharastih apotecija (potiče od grčke reči *aphoteke*, što označava skladište), koje nose mnoštvo askusa sa askosporama uronjenih u himenijum. Veličina askusa i askospora ima taksonomski značaj (**Wormald, 1921; Wormald, 1954**).

U bespolnom delu životnog ciklusa vrste roda *Monilinia* spp. formiraju konidije čija veličina ima taksonomski značaj (**Wormald, 1954; Willetts, 1969; Byrde and Willetts, 1977; Mordue, 1979a; Mordue, 1979b; Mordue, 1979c; Batra, 1991; van Leeuwen and van Kesteren, 1998; van Leeuwen et al., 2002; OEPP / EPPO, 2009**). Konidije se blastično formiraju, u nizovima (lancima konidija), tako da je najmlađa spora u osnovi niza (**Mordue, 1979a, Mordue 1979b, Mordue, 1979c, Wormald,**

1954, Byrde and Willetts, 1977; Batra, 1991). Konidije klijanjem obrazuju dugačku inicijalnu hifu (klicinu cev), koja prodire u tkivo domaćina i njena dužina se takođe koristi u identifikaciji *Monilinia* vrsta (Byrde and Willetts, 1977; Mordue, 1979a; Mordue, 1979b, Mordue, 1979c; Batra, 1991; van Leeuwen and Kesteren, 1998; van Leeuwen et al., 2002; OEPP / EPPO, 2009). Pored formiranja konidija, gljive ovog roda mogu da obrazuju mikrokonidije (Byrde and Willetts, 1977). Mikrokonidije se obrazuju na fijalidama, a fijalide direktno ili na mikrokonidioforama na lancima konidija, inicijalnoj hifi i vegetativnim hifama (Willetts and Colonge, 1969). Na osnovu morfologije mikrokonidijskog stadijuma nisu uočene značajne razlike između vrsta ovog roda (Wormald, 1954; Willetts and Colonge, 1969; Byrde and Willetts, 1977; Mordue, 1979b, Mordue, 1979c; Batra, 1991). Međutim, uočeno je da *M. laxa* f. sp. *mali* može da obrazuje mikrokonidije većih dimenzija od mikrokonidija *M. laxa* (Byrde and Willetts, 1977). U kulturi izolati *M. fructicola* obrazuju mikrokonije u vidu karakterističnih skupina crne boje, koje su vidljive okularno, dok kod *M. fructigena* i *M. laxa* mogu biti uočljive jedino posmatranjem pod svetlosnim mikroskopom (Willetts, 1969; Byrde and Willetts, 1977; OEPP / EPPO, 2009).

Identifikacija vrsta roda *Monilinia* moguća je i na osnovu morfoloških makroskopskih osobina kolonija (boja, obod, prisustvo režnjeva, prisustvo sporulacije, pigmetacija i stromatizacija), kao i brzine porasta kolonije (Willetts, 1969; Byrde and Willetts, 1977; Mordue, 1979a; Mordue, 1979b; Mordue, 1979c; Batra, 1991; van Leeuwen and van Kesteren, 1998; De Cal and Melgarejo, 1999; van Leeuwen et al., 2002; Lane, 2002; OEPP / EPPO, 2009).

Morfološke osobine *M. fructigena*

Makroskopske osobine. Kolonije *M. fructigena* na krompir-dekstroznom agaru (KDA) karakteriše žuta ili krem-beličasta boja, ravan obod, kao i srednje brz ili brz porast kolonija (Willetts, 1969; Byrde and Willetts, 1977; Mordue, 1979b; Batra, 1991; van Leeuwen and van Kesteren, 1998; van Leeuwen et al., 2002; Lane, 2002; OEPP/ EPPO, 2009).

Mikroskopske osobine. Apotecije su levkastog oblika, prečnika su 3-5 µm, spljoštene po ivici, tamne boje, imaju dugu dršku (5-15 µm) i formiraju je u proleće na mumificiranim plodovima koji leže na površini zemljišta. Askusi su cilindrični u osnovi

suženi, veličine 112–180 x 7,5–11,8 μm . Askospore su jednoćelijske, veličine 7,0–19 x 4,5–8,5 μm , ovalnog ili izduženog oblika, najčešće zaobljenih krajeva (**Wormald, 1921; Wormald, 1954**). Konidije su jednoćelijske, hijalinske i limunastog oblika. Prosečne veličine konidija su 28–24 x 9,4–14 μm i prikazane su u Tabeli 1 (**Ezekiel, 1924; loc. cit. Byrde and Willetts, 1977; Mordue, 1979b; Wormald, 1954; Batra, 1991; van Leeuwen et al., 2002; Šućur, 2010; Poniatowska et al. 2013; Hrutić, 2014**). Mikrokonidije su obično prisutne (**Mordue, 1979b**). Nerazgranata, dugačka inicijalna hifa u kapi vode se formira posle 18 h pri temperaturi od 25°C (**Mordue, 1979b**). Pri istim uslovima inkubacije na vodenom agaru, izolati *M. fructigena* obrazuju jednu ili dve inicijalne hife dužine 307–806 μm , dok se prva bočna grana na inicijalnoj hifi obrazuje na većoj udaljenosti od konidije (**Mordue, 1979b; van Leeuwen and van Kesteren, 1998; OEPP / EPPO, 2009**).

Tabela 1. Dimenzije konidija *M. fructigena* soppštene od strane različitih autora

Dužina (μm)		Širina (μm)		Domaćini	Autori
Ekstremne vrednosti	Prosek	Ekstremne vrednosti	Prosek		
–	18	–	11,4	jabuka	Ezekiel, 1924; loc. cit. Byrde and Willetts, 1977
12–34	22	9–15	13	razni	Wormald (1954)
12–34	21	6–15	13	razni	Mardue (1979b)
12–25	21,0	12–16	14	razni	Batra (1991)
20,5–23,5	21,5	12,5–13	13	razni	van Leeuwen et al. (2002) (konidije poreklom sa inokulisanih plodova kruške)
17,5–20,5	19	10,5–12,5	11,5	razni	van Leeuwen et al. (2002) (konidije sa CHA-chery agar)
-	15,3	-	9,4	razni	Šućur (2010)
-	24	-	13	razni	Poniatowska et al. (2013)
19,25–23,5	-	11,92–13,5	-	koštičavo voće	Hrutić (2014)

Morfološke osobine *M. laxa*

Makroskopske osobine. Gljiva formira kolonije na KDA podlozi koje su sivožute boje, reznjevitog oboda, sa izraženim formiranjem rozete, oskudne i varijabilne brzine porasta (**Calavan and Keitt, 1948; Willetts, 1969; Byrde and Willetts, 1977; Mordue, 1979c; Batra, 1991; van Leeuwen and van Kesteren, 1998; Lane 2002; OEPP / EPPO, 2009**).

Mikroskopske osobine. *M. laxa* izuzetno retko formira apotecije, koje su u osnovi levkaste, tamnomrke sa dugom drškom prečnika 2-15 µm. One se razvijaju u grupama na stromama. Askusi su cilindrični, veličine 121–180 x 7,5–11,8 µm, dok su askospore jednoćelijske, ovalnog, izduženog, najčešće zaobljenih krajeva, ali mogu biti i zašiljene, veličine 7-19 x 4,5–8,5 µm (**Wormald, 1954**). Konidije su jednoćelijske, hijalinske i limunastog oblika (**Byrde and Willetts, 1977**). Prosečne veličine konidija su 11,2-19 x 6,92-16 µm i prikazane su u Tabeli 2 (**Wormald, 1921; Wormald, 1930; loc. cit. Byrde and Willetts, 1977; Wormald, 1954; Mordue, 1979c; Batra, 1991; Šućur, 2010; Poniatowska et al. 2013; Hrustić, 2014**). Mikrokonidije su ovalnog oblika, prečnika 2-4,5 µm (**Calavan and Keitt, 1948; Mordue, 1979c; Batra, 1991**). Na biljci domaćinu formiraju se sporohodije čiji je prečnik 0,4-0,8 mm (**Mordue, 1979c**). Konidije klijaju u kratku i uvijenu inicijalnu hifu dužine 161-466 µm i uvijena, dok se prva bočna grana formira pri osnovi inicijalne hife gljive (**Mordue, 1979c; van Leeuwen and van Kesteren 1998; De Cal and Melgarejo, 1999; OEPP / EPPO, 2009**).

Tabela 2. Dimenzije konidija *M. laxa* sopštene od strane različitih autora

Dužina (µm)		Širina (µm)		Domaćini	Autori
Ekstremne vrednosti	Prosek	Ekstremne vrednosti	Prosek		
10–22	17,5	8–17	13	šljiva	Wormald (1921)
11,5–22,5	17,6	9–18	13,2	višnja	Wormald (1921)
11,5–28	18	8–20	12,5	kruška	Wormald, 1930; loc. cit. Byrde and Willetts, 1977
8–23	19	7–16	13,5	razni	Wormald (1954) (konidije formirane u vegetaciji)
5–19	11,5	4–12	8	razni	Wormald (1954) (konidije formirane na prezimelim organima)
5–23	-	4–16	-	razni	Mordue (1979c)
-	11,2	-	6,92	razni	Šućur (2010)
-	17	-	11	razni	Poniatowska et al. (2013)
11,25–15,42	-	8,25–11,07	-	koštičavo voće	Hrustić (2014)
12,4–23,8	-	9,3–15,5	-	razni	Batra (1991)

Morfološke osobine *M. laxa* f. sp. *mali*

Makroskopske osobine. *M. laxa* f. sp. *mali* formira na KDA podlozi kolonije sivožute boje, koje kasnije tamne, oboda režnjevito sa izraženim formiranjem rozete i varijabilne brzine porasta (**Wormald, 1919; Wormald, 1954; Celar and Valič, 1999**).

Mikroskopske osobine. Konidije *M. laxa* f. sp. *mali* su jednoćelijske, prozirne, limunastog oblika, prosečne veličine 13 x 9 µm (**Wormald, 1919; Wormald, 1954; Celar and Valič, 1999**). Mikrokonidije se formiraju na fjalidama i okruglastog su do ovalnog oblika (**Willetts and Colonge, 1969**).

Morfološke osobine *M. fructicola*

Makroskopske osobine. Gljiva formira na KDA podlozi kolonije koje su sivožute boje, obilne sporulacije sa izraženim koncentričnim krugovima spora i celog oboda. Kolonija se retko formira u obliku rozete i brzog je porasta (**Byrde and Willetts,**

1977; Mordue, 1979a; van Leeuwen and van Kesteren, 1998; OEPP / EPPO, 2009; Lane, 2002).

Mikroskopske osobine. Gljiva formira apotecije. Askusi su cilindrični i veličine 102–215 x 6–13 μm (Wormald, 1954). Askospore su poređane u jednom redu u askusu i veličine su 6–15 x 4–8,2 μm (Wormald, 1954).

Konidije su jednoćelijske, hijalinske i limunastog oblika. Prosečne veličine konidija su 12,1-15,7 x 7,3-10,4 μm i prikazane su u Tabeli 3 (Wormald, 1954; Mordue, 1979a; Batra, 1991; Zhu et al., 2005; Petroczy and Palkovics, 2006; Duchoslavová et al., 2007; Pellegrino et al., 2009; Munda and Viršček Marn, 2010; Hilber-Bodmer et al., 2010; Ondejkova et al., 2010; Grabke et al., 2011; Hu et al., 2011; Hrustić et al., 2013; Martini et al., 2013; Chen et al., 2013; Peter et., 2015). Mikrokonidije su ovalnog oblika, 2-4 μm veličine (Mordue, 1979a; Batra, 1991). Konidije kličaju u dugačku inicijalnu hifu 465-851 μm , dok se prva bočna grana formira na većoj udaljenosti od osnove inicijalne hife (Mordue, 1979a; van Leeuwen and van Kesteren, 1998; De Cal and Melgarejo, 1999; OEPP / EPPO, 2009). Van Leeuwen and van Kesteren (1998) navode da pojedini izolati gljive mogu da obrazuju bočne grane pri osnovi inicijalne hife, kao i da obrazuju dve inicijalne hife po konidiji.

Tabela 3. Dimenzije konidija *M. fructicola* sopštene od strane različitih autora

Dužina (µm)		Širina (µm)		Domaćini	Autori
Ekstremne vrednosti	Prosek	Ekstremne vrednosti	Prosek		
10–27	15	7–17	-	razni	Wormald (1954)
8–28	15	5–19	9	razni	Mordue (1979a) OEPP / EPPO (2009)
14–16	-	9–11,5	-	razni	Batra (1991)
11,3–17,5	15	9,8–12,5	10,4	breskva i nektarina	Zhu et al. (2005)
-	15,7	-	10,3	breskva	Petroczy and Palkovics (2006)
13,5–17,7	-	8,3–10,5	-	razni	Duchoslavova et al. (2007)
-	15,2	-	10,1	razni	Pellegrino et al. (2009)
10,1–17,7	12,1	6,2–6,8	7,3	breskva	Munda and Viršček Marn (2010)
-	14,4	-	8,8	kajsija	Hilber-Bodmer et al. (2010)
11,09–19,12	-	7,10–12,52	-	razni	Ondejkova et al. (2010)
-	14	-	9	jabuka	Grabke et al. (2011)
9,6–21,6	14,6	7,2–13,2	10,3	breskva	Hu et al. (2011)
7,38–14,76	-	4,92–9,84	-	nektarina	Hrustić et al. (2013)
12,1–17,4	-	8,4–11,2	-	jabuka	Martini et al. (2013)
-	15	-	10	trešnja	Chen et al. (2013)
-	15	-	10	jabuka	Peter et al. (2015)

Morfološke osobine *Monilia polystroma*

Makroskopske osobine. Kolonije *M. polystroma* na KDA podlozi su beličaste do sivkaste boje, ravnog oboda, sa prisutnim stromatičnim tvorevinama i srednje brzog ili brzog porasta (**van Leeuwen et al., 2002; Petroczy and Palkovics, 2009; Zhu and**

Guo, 2010; Hilber-Bodmer et al., 2012; Poniatowska et al., 2013; Martini et al., 2014).

Mikroskopske osobine. Konidije *M. polystroma* su jednoćelijske, hijalinske, limunastog oblika i prosečnih veličina 14,9-16,4 x 9,1-10,9 µm (Tabela 4) (**van Leeuwen et al., 2002; Zhu and Guo, 2010; Hilber-Bodmer et al., 2012; Poniatowska et al., 2013; Martini et al., 2014**). Konidije klijaju u jednu ili dve dugačke inicijalne hife dužine 700-1000 µm (**van Leeuwen et al., 2002**).

Tabela 4. Dimenzije konidija *M. polystroma* sopštene od strane različitih autora

Dužina (µm)		Širina (µm)		Domaćini	Autori
Ekstremne vrednosti	Prosek	Ekstremne vrednosti	Prosek		
12–21	16,4	8–12	10,1	jabuka	van Leeuwen et al. (2002) (konidije poreklom sa CHA)
11–20	14,9	8–11	9,1	jabuka	van Leeuwen et al. (2002) (konidije poreklom sa kruške)
-	16,6	-	10,1	jabuka	Petroczy and Palkovics (2009)
10,8–18,9	15,2	8,3–16,3	10,9	šljiva	Zhu and Guo (2010)
-	15,2	-	8,97	kajsija	Hilber-Bodmer et al. (2012)
-	16	-	10	razni	Poniatowska et al. (2013)
12-20	-	8-20	-	breskva	Martini et al. (2014)

2.4.2. Osobine genoma i njihov značaj u identifikaciji vrsta roda *Monilinia*

Kod *Monilinia* vrsta, kao i kod ostalih gljiva, najviše su proučavani jedarni geni ribozomalnih RNK, grupisani u rDNK jedinicima koje se ponavljaju nekoliko stotina puta u genomu (**Cooke et al., 1996**). Svaka rDNK jedinica se sastoji od tri rRNK gena: 18S rRNK gen (mala podjedinica, SSU), 5.8S rRNK gen i 28S rRNK gen (velika podjedinica, LSU). Između ribozomalnih gena u jednoj jedinici nalaze se dva unutrašnja dela, introna (internal transcribed spacers, ITS), označena kao ITS1 i ITS2. Dve rDNK jedinice su razdvojene sa intergenskim delom koji se označava kao IGS (intergenic spacer) (Slika 1) (**White et al., 1990**).

Carbone and Kohn (1993) su utvrdili da između vrsta porodice *Sclerotiniaceae*, pa i vrsta roda *Monilinia*, postoji nukleotidna razlika u ITS regionu ribozomalne DNK. U okviru sekcije *Juntoriae* pronađeno je pet nukleotidnih parova razlike između *M. fructicola* i *M. laxa*, dok je *M. fructigena* imala 13 nukleotidnih parova razlike u poređenju sa predhodne dve vrste (**Holst – Jensen et al., 1997**). *M. fructigena* i *M. polystroma* se međusobno razlikuju u pet nukleotidnih parova u ITS rDNK regionu (**Fulton et al. 1999**). Značajno variranje u genetičkim osobinama uočeno je i analizom gena za malu ribozomalnu podjedinicu (SSU) koje je pokazalo postojanje introna samo kod izolata *M. fructicola*, ali ne i kod *M. laxa* i *M. fructigena* (**Fulton and Brown, 1997; Snyder and Jones, 1999**). Međutim, kasnije je utvrđeno da kod nekih izolata *M. fructicola* nije prisutan intron u ovom delu genoma (**Fulton et al., 1999**). Kod *Monilinia* vrsta utvrđene su razlike i u sekvencama gena za citohrom b (*cyt b*), glicerinaldehid-3-fosfat dehidrogenazu (*G3PDH*) i β tubulin (*TUB2*) (**Hily et al., 2011; Hu et al., 2011**).

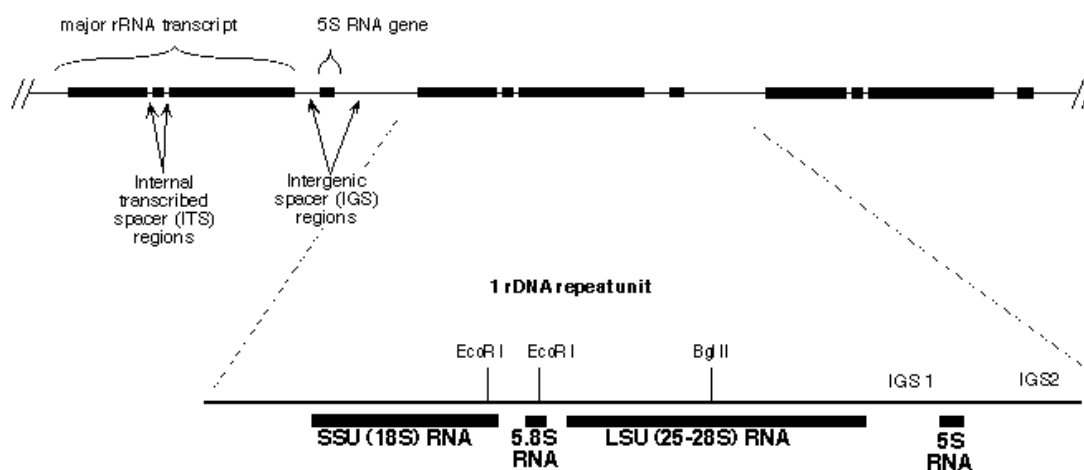
Na osnovu ITS rDNK regiona razvijeno je više molekularnih metoda za detekciju i identifikaciju *Monilinia* vrsta. Najzastupljenija je metoda lančane reakcije polimeraze (PCR) gde se korišćenjem različitih prajmera omogućava specifično umnožavanje delova ovog regiona (**Hughes et al., 2000; Ioos and Frey, 2000; Föster and Adaskaveg, 2000; Boehm et al., 2001; Ma et al., 2003; Gell et al., 2007**). Tako su **Hughes et al. (2000)**, **Ioos and Frey (2000)** i **Gell et al. (2007)** dizajnirali prajmere za specifičnu detekciju *M. fructicola*, *M. fructigena* i *M. laxa*. **Föster and Adaskaveg (2000)**, **Boehm et al. (2001)** i **Ma et al. (2003)** su napravili prajmere koji mogu razdvajati i specifično detektovati *M. fructicola* i *M. laxa*. **Snyder and Jones (1999)** su na osnovu građe ITS1 regiona razvili metodu analize polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata (Restriction fragment length polymorphism, RFLP) u kojoj se digestijom PCR produkata sa *MseI* restrikcionim enzimom omogućava razlikovanje *M. laxa* i *M. fructicola*.

Iako je većina molekularnih metoda detekcije i identifikacije vrsta roda *Monilinia* zasnovana na varijabilnosti u ITS rDNK regionu, osobine i drugih genskih lokusa su se pokazale pogodnim za karakterisanje i identifikaciju vrsta ovog roda. **Cote et al. (2004)** su razvili Multiplex PCR metodu zasnovanu na delu genoma sa nepoznatom funkcijom koja omogućava pouzdanu detekciju sve četiri vrste, *M. fructicola*, *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. polystroma*. **Hily et al. (2011)** su ispitivanjima

gena za citohrom b (*cyt b*) *Monilinia* vrsta utvrdili da *M. fructicola* i *M. laxa*, za razliku od *M. fructigena* poseduju intron u građi ovog gena što je poslužilo razvijanju PCR metode za specifičnu detekciju ove tri vrste. **Hirschhauser and Frohlich (2007)** su pokazali nukleotidnu varijabilnost u genu za lakazu 2 (*lcc2*) vrsta porodice *Sclerotiniaceae* i na osnovu sekvenci ovog regiona razvili su Multiplex PCR metodu za molekularnu detekciju *M. fructigena*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* i *S. minor*. **Hu et al. (2011)** su razvili Multiplex PCR metodu zasnovanu na *G3PGH* genu za razdvajanje kineskih *Monilinia* vrsta, *M. mumecola* i *M. yunnanensis*.

Grill et al. (2008) su primenom molekularne metode polimorfizma dužine amplifikovanih fragmenata (Amplified fragment length polymorphism, AFLP) potvrdili razliku između izolata vrste *M. laxa* poreklom sa koštičavih voćaka i izolata njene specijalizovane forme *M. laxa* f. sp. *mali* poreklom sa jabuke. **Luo et al. (2007)** su razvili Real time PCR metodu za detekciju *M. laxa*, a **van Brauwershaven et al. (2010)** za pouzdanu diferencijaciju između *M. fructigena*, *M. fructicola*, *M. laxa* i *M. polystroma*.

Analiza sekvenci DNK je postala najkorisniji metod za proučavanje filogenetskih odnosa između organizama. Posebno mesto u filogenetskim analizama zauzimaju ribozomalni geni. S obzirom da su ribozomi prisutni u svim živim organizmima, smatra se da se kroz evoluciju ribozomalnih gena može posmatrati evolucija celog genoma (**White et al., 1990**). Filogenetski međuođnosi *Monilinia* vrsta su ispitivani na osnovu ITS regiona (**Hu et al., 2011; Petróczy et al., 2012; Paniatovska et al., 2013**). Pored ovog regiona, za filogenetske analize *Monilinia* vrsta korišćeni su i *Cyt b* gen (**Hily et al., 2011**) i geni za *G3PDH* i *TUB2* (**Hu et al., 2011**).



Slika 1. Šematski prikaz gena za ribozomalnu RNK (rDNK)

<http://sites.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>

2.4.3. Stroma vrsta roda *Monilinia*

Strome su pseudoparenhimske mase micelije gljiva, koje se nakon perioda vegetativnog rasta, gusto isprepleću ispod površine prirodnog supstrata na kome gljiva raste ili formiraju izdignute tvorevine u kojima se obrazuju piknidi, peritecije ili druga tela (**Muntanola-Cvetković, 1987**). One često čine prelazni sloj između čisto vegetativnog i reproduktivnog stadijuma gljive. Strome ponekad zahvataju znatne delove napadnutih organa. Dalji napredak patogenih procesa vodi ka dezorganizaciji tkiva domaćina, koja su zamenjena gustim spletom hifa, tj. stromama (**Muntanola-Cvetković, 1987**). Pored stroma i sklerocije predstavljaju udružene mase hifa i opisuju se kao pseudotkiva, koje gljive mogu da formiraju. Sklerocije su više-manje tvrde nezavisne micelijske tvorevine. Često u literaturi nije jasna granica između stroma i sklerocija. **Batra (1991)** baveći se vrstama familije *Sclerotiniaceae* definiše stromu u širem smislu kao tvorevinu nastalu udruživanjem hifa, a sklerociju kao poseban tip strome. **Whetzel (1945)** kod familije *Sclerotiniaceae* izdvaja dva tipa strome: sklerocijsku stromu (sklerocija) i supstratnu stromu.

Stroma je veoma važna struktura u životnom ciklusu vrsta roda *Monilinia* jer im služi za preživljavanje nepovoljnih uslova tokom dužeg perioda i za formiranje reproduktivnih struktura (**Byrde and Willetts, 1977**). U prošlosti su stromatične tvorevine kod *Monilinia* vrsta nazivane i definisane na različite načine. **Whetzel (1945)**

ih opisuje kao šuplje-sferoide sklerocije, **Willetts (1968)** kao strome, a **Honey (1928)** i **Batra (1991)** kao pseudosklerocijske tvorevine. Strome predstavljaju varijabilne i složene strukture čiji izgled, mesto obrazovanja, dinamika razvoja i diferencijacija zavisi od vremene ostvarene infekcije, uslova spoljašne sredine i domaćina (**Batra, 1991**).

Whetzel (1945) je opisao da vrste roda *Monilinia* stvaraju šuplje-sferoidne sklerocije koje se obrazuju ispod kutikule zahvatajući i deo tkiva do određene dubine. Medula se sastoji od krupnih hifa sa zadebljanim zidovima, dok je ka periferiji ograničena sa dva sloja rinda. Gljiva prožima zaraženo tkivo obrazujući manje ili više diferenciranu šuplju sklerociju, koja se isušuje i smežurava oko semena ili tkiva koje nije zahvaćeno oboljenjem.

Sa druge strane, **Willetts (1968)** navodi da vrste roda *Monilinia* obrazuju stromu i daje opis stromatizacije tkiva na inokulisanim plodovima jabuke, kruške, breskve, nektarine, kajsije, šljive i višnje vrstama *M. fructigena*, *M. fructicola*, *M. laxa* i *M. laxa* f. sp. *mali*. Sve vrste obrazuju stromatično tkivo ispod i iznad kutikule. *M. fructicola* stromatizuje tkivo ispod kutikule na svim testiranim domaćinima, izuzev jabuke. Sloj isprepletanih hifa koji se obrazuje na površini tkiva plodova inokulisanih vrstama *M. fructigena*, *M. laxa* i *M. laxa* f. sp. *mali* nije dobro diferenciran kao kod plodova inokulisanih *M. fructicola*. **Willetts (1968)** je zaključio da skupine hifa vrste *M. fructicola* koje probijaju kutikulu kajsije umesto da obrazuju lance konidija, obrazuju kompaktnu micelijsku prevlaku na površini ploda. Sličnu pojavu je uočio i na plodovima kajsije inokulisanih vrstom *M. fructigena*. Debljina sloja isprepletanih hifa na površini tkiva plodova inokulisanim *M. fructigena* varira od 0,2-1 mm, dok su u unutrašnjosti tkiva u zoni kutikule ćelije domaćina potpuno prožete mnoštvom hifa do dubine od 200 µm.

Imajući u vidu složenu građu stroma, koja se obrazuje u tkivu biljke, ali i na njenoj površini većina istraživača definiše pseudosklerocijsku strukturu strome roda *Monilinia* (**Aderhold and Ruhland, 1905, Faes and Staehelin, 1924, Honey, 1928, 1936, Nannfeldt, 1932; loc.cit. Batra, 1991**). **Honey (1928)** je opisao ektostromu (konidiogenu stromu) i entostromu (unutarćelijsku stromu iz koje će se diferencirati apotecije) kod *M. fructicola*.

Batra (1991) takođe smatra da strome vrsta roda *Monilinia* imaju pseudosklerocijsku strukturu i da se sastoje iz ektostrome i entostrome (Tabela 5). Ektostroma je konidiogena struktura kojoj nedostaje rind, melanizirani sloj ćelija. U zaraženom biljnom tkivu nakon infekcije micelija se širi intercelularno i intracelularno, zatim ka epidermisu gde hife postaju šire, zadebljelih zidova i sa čestim septama. Pojedine hife se izdužuju vertikalno i formiraju se grupe udruženih hifa koje grade pseudoparenhim subepidermalno ili subkutikularno. Kod *M. fructicola*, *M. fructigena* i *M. laxa* ektostroma je često spojena sa entostromom, koja se obrazuje kasnije. *M. fructicola* i *M. fructigena* obrazuju obilnu ektostromu, formiranjem kompaktnog hifalnog sloja na površini biljnih delova debljine do 1 mm. Ovaj sloj nastaje od starih sporodohija, na kojima se ne obrazuju konidije, već hife gljive ili od delova ektostrome koji probijaju kutikulu i obrazuju ovaj hifalni omotač. Spoljašni melanizirani sloj na hifalnom omotaču **Willetts (1968)** naziva rindom. Entostroma je višegodišnja tvorevina, koja je kod nekih vrsta šuplje-sferoidna, dok je kod drugih vrsta čvrste strukture. Sastoji se od dva sloja melaniziranih ćelija rinda između kojih je medula, svetle do skoro bele boje, koju grade hife gljive zadebljelih zidova i ćelije domaćina. U vreme sporulacije medula je okružena masom polisaharida. Kada je entostroma potpuno obrazovana debljine je od 1-3 mm, dok je kod nekih vrsta samo mikroskopski vidljiva. Na poprečnom preseku rind je sačinjen od dva do tri sloja ćelija pseudoparenhimskog ili plektenhimskog tkiva, dok je kod pojedinih vrsta jako redukovan i zahvata samo ćelije epidermisa. Kod *M. laxa* i *M. fructigena* unutrašnji rind se ne formira (**Byrde and Willetts, 1977**). U entostromi se formiraju začeci stroma od kojih se dalje diferencira ektostroma, entostroma ili obe (**Batra, 1991**).

U kulturi *M. fructicola* formira stromatične tvorevine koje se sastoje iz rinda, korteksa i medule (**Kohn and Grenville, 1989; Willetts and Bullock, 1992**). Rind je građen od jedne ili više melaniziranih, zadebljanih ćelija koje se formiraju na spoljašnjoj strani sklerocije. Korteks je zona između rinda i medule, sačinjena od okuglastih ćelija čija debljina varira u zavisnosti od vrste. Granica korteksa nije jasno diferencirana prema rindu i meduli. Korteks je zona gde ima najviše nagomilanih hranljivih materija u ćelijama. Medula je zona ispod rinda i korteksa koja nastaje povezivanjem hifa. Najgušća je u zoni ispod rinda i odlikuje se prisustvom ekstraćelijskog matriksa u međućelijskom prostoru (**Kohn and Grenville, 1989; Willetts and Bullock, 1992**).

Iako su **van Leeuwen et al. (2002)** uočili intenzivnu stromatizaciju plodova inokulisanih *M. polystroma*, kao i **Poniatowska et al. (2013)** pojavu stromatičnog sloja na površini inokulisanih plodova šljive, o građi strome ove vrste još nema literaturnih podataka. **Van Leeuwen et al. (2002)** su pretpostavili da stromatični sloj kod *M. polystroma* ima ulogu u zaštiti od razgradnje i propadanja plodova pod uticajem abiotskih i biotskih faktora.

Tabela 5. Opis stroma vrsta sekcije *Junctioniae* prema **Batra (1991)**

Vrsta gljive	Opis strome
<i>M. fruticola</i>	Entostroma <i>M. fruticola</i> je šuplje-sferoidna, dok je ponekad njeno formiranje potpuno odsutno. Nastaju od hifa koje prožimaju deo mezokarpa dok se ceo plod ne stromatizuje. Medula je ograničena spoljašnjim i unutrašnjim rindom, hife su širine 4-6 µm i uronjene u ekstracelularni matriks. Rind je sačinjen od dva do četiri sloja pseudoparenhimskih ćelija, koje su zadebljlih zidova i melanizirane. Ektostroma je kao jastuk na kojoj se obrazuju snopovi razgranatih ili nerazgranatih konidiofora u grupama, kao i kompaktne sporodohije.
<i>M. fructigena</i>	Entostroma <i>M. fructigena</i> se obrazuje unutar perikarpa. Rind je sačinjen iz dva do tri sloja ćelija širine 5-6 µm, melaniziranih zidova. Medula je građena od retkog spleta hifa 4-6 µm širine, sa oskudnim matriksom polisaharida. Ektostroma je subepidermalna.
<i>M. laxa</i>	Entostroma <i>M. laxa</i> je šuplje-sferoidna subepidermalna 0,3-1 mm debljine, sačinjena od hifa zadebljanih zidova koje su oivičene sa spoljašnjim i unutrašnjim rindom. Rind je građen iz dva do četiri sloja ćelija zadebljanih zidova sa prisustvom melanina, a dok su hife medule 6-10 µm široke i okružene ekstraćelijskim matriksom. Ektostroma je subepidermalna.

2.5. Kontrola vrsta roda *Monilinia*

U kontroli oboljenja prouzrokovanih *Monilinia* spp. primenjuje se više različitih mera koje obuhvataju agrotehničke, hemijske, fizičke i biološke mere, kao i gajenje otpornih sorti. Smanjenje učestalosti pojave *Monilinia* vrsta na plodovima jabuke efikasno se ostvaruje adekvatnom primenom fungicida u toku vegetacije. Hemijsko suzbijanje patogeni podrazumeva kombinovanje sistemskih i protektivnih fungicida, kao i insekticida u cilju sprečavanja oštećenja na plodovima od štetočina (**Ivanović i Ivanović, 2001**). Za zaštitu plodova od prouzrokovaca truleži, pa time i od *Monilinia* spp., u Srbiji su registrovani sledeći fungicidi trifloksistrobin+kaptan (Flint-Plus), karbendazim (Galofungin), ciprodinil+fludioksonil (Switch), tiofanat-metil (Funomil), boskalid+piraklostrobin (Bellis) i bakterija *Bacillus subtilis* (F-Stop) (**Obradović i sar., 2015**).

U zasadima jabuke uništavanje primarnog izvora inokuluma predstavlja značajnu meru borbe (**van Leeuwen et al., 2002; Holb, 2006**). Imajući u vidu da je *M. fructigena* dominantni prouzrokovatelj propadanja plodova jabuke (**Byrde and Willetts, 1977; van Leeuwen et al., 2000; Holb, 2004a**), sakupljanje zaraženih plodova sa zemlje, kao i u krošnjama treba sprovesti tokom jeseni i rano u proleće (**van Leeuwen et al., 2002; Holb and Scherm, 2007**). Jedna od mera kontrole je i redovno proređivanje plodova, jer se na taj način omogućava strujanje vazduha i smanjuje se međusobni kontakt plodova (**Ivanović i Ivanović, 2001**). **Holb et al. (2012)** su dokazali da optimalna ishrana jabuke kalcijumom tokom vegetacije, smanjuje pojavu i štete prouzrokovane *M. fructigena* tokom čuvanja u skladištima.

Način skladištenja jabuke može da utiče na dinamiku razvoja bolesti čiji je prouzrokovatelj *M. fructigena*. Čuvanje plodova u hladnjačama sa smanjenom koncentracijom kiseonika (ULO hladnjače), smanjuje intenzitet oboljenja prouzrokovano ovim parazitom (**Holb et al., 2012**). Potapanje plodova jabuke u toplu vodu temperature od 54°C u trajanju od 3 min, potapanje plodova u vodu temperature od 58°C u trajanju od 20 s i potapanje plodova u vodu temperature od 62°C 20 s su bili efikasni tretmani u kontroli smeđe truleži prouzrokovane *M. fructigena* u skladištu (**Maxim et al., 2012**).

Sve veći zahtevi prema hrani bez pesticida, kao i zaštiti životne sredine od ostataka pesticida pokrenuli su ispitivanja efikasnosti i moguće primene različitih nepesticidnih mera kontrole biljnih patogena. Biološka kontrola obuhvata primenu antagonista i proizvoda njihovog metabolizma, supstanci biljnog i životinjskog porekla, kao i drugih prirodnih supstanci koje povećavaju otpornost biljke prema patogenima (**Pal and Gardener, 2006**).

Prema **Castoria and Wright (2010)** antimikrobno delovanje mikroorganizama kao agensa biološke borbe na patogene može biti direktni i indirektni antagonizam. Direktni antagonizam obuhvata kompeticiju za hranu i prostor, lučenje enzima (među kojima su značajni oni koji razgrađuju ćelijski zid patogena) i mikoparazitizam gde postoji fizički kontakt često praćen delovanjem enzima mikoparazita. Indirektni antagonizam podrazumeva da se kao posledica prisustva biološkog agensa indukuje otpornost ploda prema patogenu. Biološki agens može da deluje na oba načina.

Za suzbijanje vrsta roda *Monilinia* kao agensi biološke borbe ispitivane su različite vrste kvasaca kao što su *Pseudozyma fusiformata*, *Cryptococcus laurentii*, *Aerobasidium pullulans* (Zhang et al. 2010; Mari et al., 2012), *Metschnikowia pulcherima*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Wickerhamomyces anomalus* (Oro et al., 2014), *Candida pruni* (Zhang et al., 2014), kao i bakterije iz rodova *Pseudomonas* (Altindag et al., 2006) i *Bacillus* (Pusey and Wilson, 1983; 1984; Uthede and Sholberg, 1986; loc. cit. Arsenijević i sar., 1997; Yanez-Mendizabel et al., 2012), *Pantonea agglomerans* (Bonaterra et al., 2003). Ispitivano je i delovanje različitih vrsta gljiva: *Epicoccum nigrum* (Melgarejo et al., 1985; Madrigal and Melgarejo, 1994; Mari et al., 2007; De Cal et al., 2009), *Aspergillus flavus*, *Penicillium chrysogenum*, *P. frequentas* (Melgarejo et al., 1985; Madrigal and Melgarejo, 1994), *P. purpurogenenum* (Melgarejo et al., 1985; Larena and Melgarejo, 1996), kao i *Lambertella corni-marisi* prema *M. fructigena* (Harada, 1998).

Etarska ulja su sekundarni metaboliti biljaka i pored brojnih farmakoloških svojstava, dakazana su njihova antimikrobna i fungicidna svojstva (Zambonelli et al., 1996; Oxenham et al., 2005). Prema Dafferera et al. (2003) potencijal etarskih ulja u kontroli biljnih patogena ogleda se u njihovom prirodnom poreklu koje ih čini manje štetnim za čoveka i životnu okolinu, ali i u malom riziku za razvoj rezistentnosti, obzirom da su po svom sastavu kompleks velikog broja jedinjenja sa različitim mehanizmima antimikrobnog dejstva. Poznato je oko 3000 različitih etarskih ulja od kojih se oko 300 vrsta komercijalno upotrebljava (Bakkali et al., 2008).

Veliki broj literaturnih podataka svedoči o antifungalnom dejstvu etarskih ulja prema različitim fitopatogenim gljivama (Soatthiamroong et al., 2003; Baruah et al., 1996; Carta et al., 1996; Arras and Usai, 2001; Meepagola et al., 2002; Plotto et al., 2003; Glamočlija et al., 2006; Tabanca et al., 2006; Demirci et al., 2006; Tabanca et al., 2007; Lee et al. 2007; Tripathi et al. 2008; Christian and Goggi, 2008; Hadizadeh et al., 2009; Wedge et al., 2009; Duduk et al., 2015). Takođe, brojni literaturni podaci dokazuju antifungalni efekat etarskih ulja, njihovih pojedinačnih sastojaka, kao i biljnih ekstrakata u kontroli vrsta roda *Monilinia*. Lazar-Baker et al. (2011) su utvrdili značajan inhibitorni efekat etarskog ulja biljne vrste *Backhousia citriodora* prema *M. fructicola*, Mamoci et al. (2014) etarskog ulja origana (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) i Elshafie et al. (2015) etarskih ulja *Thymus vulgaris* i *Verbena*

oficinallis prema *M. fructigena*, *M. fructicola* i *M. laxa*. **Deng et al. (2013)** su pokazali antifungalno dejstvo etarskih ulja karanfilića, cimeta, anisa, kima, morača i *Zanthoxylum americanum* prema *M. fructigena*. Pojedinačne komponente etarskih ulja karvakrol, timol, eugenol, citronelol, geraniol, citral, perilaldehid, citronalal, perilil-alkohol i mentol ispoljile su antifungalno delovanje prema *M. fructicola* (**Tsao and Zhou, 2000**). Ovakvo dejstvo eugenola utvrđeno je i prema *M. fructigena* (**Amiri et al., 2008**).

Po svom hemijskom sastavu etarska ulja mogu sadržati terpene, estre, aldehide, ketone, alkohole, fenole, okside i druga jedinjenja (**Marković, 2011**). Antifungalno dejstvo etarskih ulja se najčešće vezuje za fenole i terpene. Među fenolnim jedinjenjima ovakvo dejstvo ispoljavaju karvakrol (**Muller-Riebau et al., 1995; Griffin et al., 1999; Tsao and Zhou, 2000; Neri et al., 2006; Marković, 2011**), timol (**Muller-Riebau et al., 1995; Tsao and Zhou, 2000; Marković, 2011**), eugenol (**Oxenhaim et al., 2005; Neri et al., 2006; Kishore et al., 2007; Amiri et al., 2008**), metil-eugenol, metil-havikol, anetol, safrol, miristicin i apiol (**Marković, 2011**). Od terpenskih jedinjenja antifungalno dejstvo je opisano za limonen (**Kishore et al., 2007; Marković et al., 2011**), pinen (**Griffin et al., 1999; Marković et al., 2011**), kamfen (**Griffin et al., 1999; Marković, 2011**), kadined, kariofilen (**Oxenhaim et al., 2005**), terpinen (**Griffin et al., 1999; Marković, 2011**), cedral, dipenten, felandren, sabinen i mircen (**Marković, 2011**). I druga hemijska jedinjenja mogu biti nosioci antifungalnog dejstva etarskih ulja kao što su aldehidi - citral (**Neri et al., 2006; Kishore et al., 2007; Marković, 2011**), citronelelal (**Griffin et al., 1999; Marković, 2011**) i neral (**Marković, 2011**), alkoholi - linalol (**Oxenhaim et al., 2005; Marković, 2011**), citranelol (**Marković, 2011**), geraniol (**Kishore et al., 2007; Griffin et al., 1999; Marković, 2011**), borneol (**Griffin et al., 1999; Marković, 2011**), mentol, nerol (**Griffin et al., 1999**), terpinol, farmezol, vetiverol, benzin-oksid, bisabolol-oksid, kao i ketoni - verbenon (**Marković, 2011**) i menton (**Griffin et al., 1999; Marković, 2011**).

Vrste biljne familije *Brassicaceae* konstitutivno akumuliraju značajne količine potencijalno antimikrobnih jedinjenja glukozinolata (**Fahey et al., 2001**). Glukozinolati i njihovi isparljivi proizvodi su odavno poznati po svom fungicidnom, baktericidnom, nematocidnom i alelopatskom svojstvu (**Fahey et al., 2001**). Ovi sekundarni metaboliti nalaze se u vakuolama i fizički su odvojeni od mirozinaze koja se nalazi u drugim

delovima ćelije. Kao rezultat mehaničke povrede ili napada patogena glukozinati i enzim mirozinaza dolaze u kontakt što dovodi do hidrolitičkog razlaganja glukozinolata. Enzim mirozinaza (tioglukozid glukohidrolaza, EC 3.2.3.1) razlaže glukozinolate do aglikona, glukoze i sulfata. Aglikon je nestabilan i prelazi u izotiocijanate (ITC), tiocijanate, nitrile i druge proizvode u zavisnosti od strukture glukozinolata i uslova izvođenja hemijske reakcije (Vig et al., 2009). Samo aromatični i alifatični glukozinolati hidrolitičkim razlaganjem stvaraju izotiocijanate čije je antifungalno dejstvo dokazano (Kirkegaard et al., 1996; Mari et al., 1996; Manici et al., 1997; Sarwar et al., 1998; Smolinska and Horbowicz, 1999; Charron and Sams, 1999; Smith i Kirkegaard, 2002; Mari et al., 2002; Sellam et al., 2007; Fan et al., 2008; Mari et al., 2008; Troncoto-Rojas et al., 2009; Wu et al., 2011).

Antifungalni potencijal izotiocijanata familije *Brassicaceae* potvrđen je prema mnogim zemljišnim fitopatogenim gljivama (Kirkegaard et al., 1996; Manici et al., 1997; Sarwar et al., 1998; Smolinska and Horbowicz, 1999; Charron and Sams, 1999; Smith and Kirkegaard, 2002; Fan et al., 2008). Iako su glukozinolati neselektivno toksična jedinjenja, uočena je razlika u osetljivosti između različitih vrsta gljiva, pa čak i među izolatima jedne vrste prema različitim izotiocijanatima (Kirkegaard et al., 1996; Fan et al., 2008; Duduk et al., 2010a). Osim toga, antifungalno delovanje izotiocijanata zabeleženo je i prema ekonomski štetnim patogenima plodova posle berbe kao što su *P. expansum*, *B. cinerea*, *M. laxa* i *A. alternata* (Mari et al., 1996; Mari et al., 2002; Mari et al., 2008; Fan et al., 2008; Troncoto-Rojas et al., 2009; Wu et al., 2011). Antifungalno delovanje prema ovoj grupi patogena govori u prilog mogućnosti korišćenja biofumigacije izotiocijanatima kao mere zaštite plodova u uslovima skladištenja.

U Srbiji u okviru istraživanja različitih agenasa biološke kontrole *Monilinia* spp. utvrđeno je antagonističko dejstvo saprofitne bakterije *Pseudomonas* sp. izolovane iz crnog luka i *Bacillus* sp. prema *M. laxa* (Arsenijević et al., 1994; loc. cit Arsenijević i sar 1997), antagonizam različitih parazitnih i saprofitnih bakterija prema *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. linhartiana* (Trkulja, 1997; loc cit. Arsenijević et al., 1997), *Bacillus subtilis* prema *M. fructigena*, *M. fructicola* i *M. laxa* (Đurić i sar., 2003; Hrustić, 2014), ali i gljive *Trichoderma* sp. prema *M. fructigena* i *M. laxa* (Balaž i sar., 1999).

Antifungalno dejstvo biljnih ekstrakata i etarskih ulja u *in vitro* i *in vivo* uslovima prema *Monilinia* spp. bilo je predmet istraživanja i u Srbiji (**Jasnić i sar., 1996; Jasnić et al., 1996, loc. cit. Arsenijević i sar., 1996; Hrustić i sar., 2011; Duduk i sar., 2011; Vasić et al., 2012b; Vasić i sar., 2013c; Hrustić, 2014**). **Jasnić et al. (1996)** utvrdili su fungistatično dejstvo biljnih ekstrakata timijana i koprive i etarskog ulja belog luka na razvoj smeđe truleži na veštački inokulisanim plodovima jabuke izolatom *M. fructigena* (**loc. cit. Arsenijević i sar., 1996**). Posebne formulacije etarskog ulja timijana inhibirale su razvoj bolesti na veštački inokulisanim plodovima jabuke gljivom *M. fructigena* (**Hrustić, 2014**).

O antifungalnom dejstvu produkata hidrolize biljnog tkiva različitih vrsta familije *Brassicaceae* prema patogenima u našoj zemlji nema mnogo podataka. Jedina dva istraživanja koja su potvrdila njihovo antifungalno dejstvo su prema zemljišnim patogenima jagode (**Duduk et al., 2010b**) i prouzrokovateljima propadanja plodova jagode (**Duduk i sar., 2012**).

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

U programu istraživanja ove doktorske disertacije postavljeni su sledeći ciljevi:

- Da se utvrdi prisustvo i rasprostranjenost vrsta roda *Monilinia* patogenih za jabuku (*Malus domestica* Borkh.) u Srbiji.
- Da se ispita moguće prisustvo *M. fructicola*, karantinske vrste za našu zemlju, s obzirom na širenje ove vrste u Evropi i nama susednim zemljama.
- Da se okarakterišu izolati *Monilinia* spp. na osnovu morfoloških, ekoloških, odgajivačkih i patogenih osobina.
- Da se utvrde sekvence ITS1-5.8S-ITS2 rDNK regiona odabranih izolata *Monilinia* spp. i da se međusobnim poređenjem i određivanjem filogenetskih odnosa doprinese identifikaciji, kao i da se razvije nova molekularna metoda detekcije *Monilinia* vrsta.
- Da se ispita antifungalni potencijal etarskih ulja i efikasnosti njihove primene u uslovima *in vitro* i *in vivo* radi iznalaženja zdravstveno bezbednih postupaka kontrole smeđe truleži plodova jabuke.
- Da se ispita antifungalno delovanje isparljivih sastojaka hidrolize biljnog tkiva sedam vrsta i kultivara familije *Brassicaceae* prema prouzrokovateljima smeđe truleži.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Izolacija i identifikacija *Monilinia* spp.

4.1.1. Pregled terena i sakupljanje uzoraka simptomatičnih plodova jabuke

Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije obuhvatila su pregled zasada jabuke i skladišta na prisustvo smeđe truleži plodova jabuke u Srbiji u toku tri godine, od 2010. do 2012. godine. U toku vegetacije plodovi jabuke sa simptomima oboljenja su prikupljeni iz zasada u lokalitetima Smederevo, Ruma, Grocka, Svilajnac, Bela Crkva i Topola. Prisustvo smeđe truleži plodova jabuke praćeno je i u skladištima u kojima se ubrani plodovi čuvaju u različitim uslovima hlađenja, u lokalitetima Smederevo, Grocka, Svilajnac i Bela Crkva. Prikupljeni plodovi jabuke su pregledani i etiologija oboljenja je dalje proučavana u Laboratoriji za fitopatologiju Poljoprivrednog fakulteta u Zemunu.

4.1.2. Izolacija gljiva i dobijanje čistih kultura

Izolacija gljiva urađena je iz plodova jabuke sa simptomima smeđe truleži. Plodovi su površinski dezinfikovani 70% alkoholom i obrisani vatom, a zatim su fragmenati tkiva (oko 5 mm) na prelazu između zdravog i obolelog dela ploda postavljeni u Petri kutije sa podlogom od krompir dekstroznog agara (KDA) sa dodatkom mlečne kiseline i inkubirani u termostatu pri temperaturi od 25°C u mraku. Čiste kulture izolata dobijene su presejavanjem fragmenata podloge sa micelijom na nove KDA podloge.

4.1.3. Provera patogenosti, reizolacija i dobijanje monosporijalnih kultura

Provera patogenosti dobijenih izolata urađena je na plodovima jabuke sorte Ajdared. Plodovi su prvo površinski dezinfikovani potapanjem u 1% rastvor NaOCl u trajanju od 1 min, a zatim dva puta isprani u sterilnoj destilovanoj vodi i ostavljeni da se prosuše na vazduhu. Na površini ploda sterilnim skalpelom napravljena su po tri isečka. U ovako pripremljene isečke postavljeni su fragmenti micelije zajedno sa podlogom.

Kontrolni plodovi inokulisani su isečcima sterilne KDA podloge. Inokulisani plodovi inkubirani su u plastičnim kontejnerima u uslovima visoke relativne vlažnosti i veštačke smene svetla i tame (14 h svetlo / 10 h tama) pri 25°C tokom pet dana. Sa veštački inokulisanih plodova jabuke na kojima su se pojavili simptomi smeđe truleži reizolovana je gljiva na KDA podlogu.

U cilju dobijanja monosporijalnih kultura izolati koji su na osnovu ispoljenih simptoma na sakupljenim plodovima, kao i izgleda kolonija nakon reizolacije patogena imali karakteristike vrsta roda *Monilinia* spp. odgajani su na V8 podlozi tokom 10 dana u uslovima 12 h svetlo / 12 h tama po metodi **Neri et al. (2007)**. U razvijene kulture dodavano je po 5 ml sterilne destilovane vode i blagim struganjem pomoću staklenog štapića oslobođene su micelija i konidije od podloge. Dobijene suspenzije su izmešane na Vorteks mešalici u cilju razbijanja lanaca i oslobađanja pojedinačnih konidija, a zatim procedene kroz sloj sterilnog filter papira radi odstranjivanja ostataka micelije. Po 100 µl suspenzije spora koncentracije od 10⁵ konidija / ml zasejano je na KDA podloge u Petri kutijama. Petri kutije su zatim zatvorene, oplepljene parafilmom i inkubirane 18 h u termostatu pri 25°C. Pojedinačne proklijale spore su zatim presejane na nove KDA podloge. Kod izolata koji nisu sporulisali na V8 podlozi, monosporijalne kulture dobijene su sečenjem vrhova hifa i njihovim presejavanjem na nove KDA podloge.

Dobijeni izolati su čuvani na kosoj KDA podlozi zalivenoj sterilnim tečnim parafinom, pri 4°C. Pored ovakvog načina čuvanja izolati su čuvani u podlozi od tečnog hranljivog bujona i glicerola (23,3 g hranljivog bujona, 150 ml glicerola i 850 ml vode) pri –80°C.

4.1.4. Identifikacija izolata *Monilinia* spp. na osnovu morfoloških osobina

Za identifikaciju patogenih monosporijalnih izolata ispitivane su makroskopske (izgleda kolonije, boja, obod, sporulacija, kao i formiranje stromatičnih tvorevina u kulturi) i mikroskopske (izgled i način formiranja konidija) morfološke osobine. Morfološke odlike su posmatrane na KDA podlozi posle sedam dana inkubacije pri 22°C u uslovima veštačke smene svetla i tame (12 h svetlo / 12 h tama). Mikroskopske osobine izolata su proučene nakon iniciranja sporulacije na V8 podlozi u uslovima 12 h svetlo / 12 h tama tokom 10 dana. Ispitivani izolati su identifikovani poređenjem dobijenih rezultata sa podacima iz literature (**Willetts, 1969; Byrde and Willetts, 1977;**

Mordue, 1979a; Mordue, 1979b; Mordue, 1979c; Batra, 1991; van Leeuwen and van Kesteren, 1998; van Leeuwen et al., 2002; Lane, 2002; OEPP / EPPO, 2009).

4.1.5. Molekularna detekcija izolata *Monilinia* spp.

Molekularna detekcija dobijenih izolata *Monilinia* spp. urađena je primenom metode Multipleks lančane reakcije polimeraze (Multiplex PCR) razvijene od strane Cote et al. (2004).

Ekstrakcija nukleinskih kiselina

Ekstrakcija nukleinskih kiselina urađena iz kultura starih sedam dana gajenih na KDA podlozi po metodi **Day and Shatock (1997)** na sledeći način:

Iz svake kulture gljive sterilnim skalpelom sastrugano je 10 mg micelije i homogenizovano u sterilnom avanu sa tečnim azotom dok nije pretvoreno u prah. U svaki uzorak dodato je po 800 µl ekstrakcionog CTAB pufera (100 mM Tris HCl, pH 8,0; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA i 2% CTAB, cetiltrimetilamonijumbromid, pH 8). Sadržaj je zatim prebačen u sterilne mikrotube od 2 ml. Sadržaj je inkubiran 1 h u vodenom kupatilu pri 65°C i svakih 15 min dobro je promućkan okretanjem mikrotuba. U svaki uzorak dodato je po 600 µl hloroforma i 10 s mućkano Vorteks mešalicom. Uzorci su centrifugirani 10 min pri 13 000 g. Uzet je gornji sloj pipetiranjem oko 500 µl i prenet u novu sterilnu i obeleženu mikrotubu. U svaki uzorak dodato je po 300 µl izopropanola. Ovako pripremljeni uzorci su inkubirani 10 min na -20°C i centrifugirani 10 min pri 13000 g. Tečna faza pažljivo je odlivena pipetiranjem iz mikrotuba. U svaki uzorak dodato je po 600 µl 70% etanola. Uzorci su centrifugirani 10 minuta pri 13 000 g. Supernatant je pažljivo odliven iz mikrotuba. Otvorene mikrotube su ostavljene nekoliko sati na sobnoj temperaturi da se osuše. Talog je resuspendovan u 100 µl TE pufera (10 mM Tris pH 8 i 1 mM EDTA) ostavljen nekoliko sati na +4°C u frižideru da se dobro rastvori. Ekstrakt nukleinskih kiselina čuvan je pri temperaturi od -20°C.

Multiplex PCR metoda

Za molekularnu detekciju dobijenih izolata korišćena je Multiplex PCR metoda (Cote et al., 2004) sa prajmerima MO368-5, Laxa-R2, MO368-8R i MO368-10R (Metabion International AG Germany) specifičnim za detekciju *M. fructigena*, *M.*

polystroma, *M. fructicola* i *M. laxa* (Tabela 6). Svaka reakciona PCR smeša, ukupne zapremine 25 µl, sadržala je 12,5 µl 2xPCR master mix (Fermentas, Litvanija), po 0,5 µl svakog prajmera (MO368-5, MO368-8R, MO368-10R i Laxa-R2) (10 pmol / µl) (Metabion international AG, Germany), 10,5 µl vode i po 1 µl ekstrahovane DNK. Kao negativna kontrola korišćena je reakciona PCR smeša bez dodate DNK.

Uslovi izvođenja Multiplex PCR metode bili su sledeći:

- početna denaturacija 2 min pri temperaturi od 95 °C,
- 35 ciklusa: denaturacija 15 s pri 95°C; aniling 15 s na 60°C; elongacija 1 min na 72°C;
- finalna elongacija 3 min na 72°C.

Vizuelizacija PCR produkata

Vizuelizacija PCR produkata urađena je u 1,5% agaroznom gelu. Agarozni gel pripremljen je u 1xTBE puferu i zagrejan do temperature ključanja u mikrotalasnoj pećnici. Nakon hlađenja do temperature oko 60°C, gel je razliven u kalup za horizontalnu elektroforezu u koju je predhodno postavljen češalj. Nakon očvršćavanja gela i uklanjanja češlja, kalup je uronjen u kadnicu za horizontalnu elektroforezu sa 1xTBE puferom. Uzorci su pripremljeni mešanjem 5 µl produkta PCR reakcije i 1 µl pufera za nalivanje (6x Loading Dye Solution, Fermentas). Pri svakoj elektroforezi korišćeno je 6 µl markera (Gen Ruler 100 bp DNA Ladder, Fermentas Lithuania). Elektroforeza je izvedena pri konstantnoj struji od 100 V u trajanju od 30 min u aparatu za horizontalnu elektroforezu (PeqPOWER, Peqlab Germany).

Posle završene elektroforeze gel je inkubiran 20 min u vodenom rastvoru etidijum bromida u finalnoj koncentraciji od 5 µg / ml. Amplifikovani fragmenti posmatrani su u mračnoj komori pomoću UV svetla transiluminatora i fotografisani.

U Multiplex PCR metodi pozitivnom reakcijom smatrana je pojava amplikona veličine oko 402 bp specifičnih za *M. fructigena* i amplikona veličine oko 425 bp specifičnih za *M. polystroma* koje unmožavaju prajmeri MO368-5 / MO368-8R, pojava amplikona veličine oko 535 bp specifičnih za *M. fructicola* koje unmožavaju prajmeri MO368-5 / MO368-10R i pojava amplikona oko veličine 351 bp specifičnih za *M. laxa* koje unmožavaju prajmeri MO368-5 / Laxa-R2.

4.2. Proučavanje morfoloških osobina izolata *Monilinia* spp.

Za morfološku karakterizaciju odabrani su izolati *Monilinia* spp. na osnovu pripadnosti vrsti, geografskog porekla, kao i ispoljenih morfoloških osobina. Takođe, korišćeni su i referentni izolati MCG *M. fructigena*, C-28 *M. laxa* i a-100 *M. fructicola*, dobijeni ljubaznošću prof. dr. Marte Mari iz Univerziteta u Bolonji, Italija, kao i izolata 0603202046 *M. polystroma* i PD20.96 *M. laxa*, dobijeni ljubaznošću dr Gerard van Leeuwen, Plant Protection Service, National Reference Laboratory, Wageningen, Holandija.

Makroskopske morfološke osobine odabranih izolata proučavane su prema taksonomskim kriterijumima (Willetts, 1969; Byrde and Willetts, 1977; Mordue, 1979a; Mordue, 1979b; Mordue, 1979c; Batra, 1991; van Leeuwen and van Kesteren, 1998; van Leeuwen et al., 2002; Lane, 2002; OEPP / EPPO, 2009). Na KDA podlozi posmatrani su izgled, boja, obod, naličje kolonija, sporulacija, formiranje stromatičnih tvorevina i porast micelije. Fragmenti micelije izolata prečnika 5 mm uzeti su sa oboda pet dana starih kultura odgajanih na KDA podlozi, nanošeni u centar sterilnih KDA podloga i inkubirani 12 dana u uslovima veštačke smene svetlosti i tame (12 h svetlo / 12 h tama) pri temperaturi od 22 °C u termostatu. Porast kolonija ispitivanih izolata meren je svakodnevno tokom sedam dana inkubacije i izražen je kao prosečni dnevni porast po danu (mm / dan).

Mikroskopske morfološke odlike izolata *Monilinia* spp. obuhvatile su: a) ispitivanje oblika i veličine konidija sa inokulisanih plodova jabuke i podloge od V8 agara, b) formiranje makrokonidija i c) način klijanja konidija na podlozi od vodenog agara (VA). Inokulacija plodova u cilju iniciranja sporulacije na površini zaraženog tkiva je urađena prema postupku van Leeuwen et al. (2002). Za inokulaciju su korišćeni pet dana stari izolati odgajeni na KDA podlozi u uslovima veštačke smene dana i noći (12 h svetlo / 12 h tama). Plodovi jabuke sorte Ajdared su prvo površinski dezinfikovani potapanjem u 1% rastvoru NaOCl u trajanju od 1 min, a zatim dva puta isprani u sterilnoj destilovanoj vodi i ostavljeni da se prosuše na vazduhu. Na površini ploda sterilnim bušačem micelije su napravljene povrede (6 mm prečnika i 5 mm dubine), a zatim su isečci micelije zajedno sa podlogom prečnika 5 mm sa oboda kultura uneseni u otvore na plodovima. Plodovi inokulisani isečkom sterilne KDA podloge korišćeni su kao kontrola. Inokulisani i kontrolni plodovi inkubirani su u plastičnim

kontejnerima pri temperaturi od 22°C u uslovima visoke relativne vlažnosti (RH 95-100%) i veštačke smene svetla i tame (14 h svetlo / 10 h tama). Osam dana posle inokulacije, kutije sa inokulisanim plodovima su otvorene radi snižavanja relativne vlažnosti i oslobađanja pojedinačnih konidija iz lanaca konidija. U cilju iniciranja sporulacije za proučavanje mikroskopskih osobina ispitivani izolati su odgajani i na V8 podlozi tokom 10 dana u uslovima 12 h svetlo / 12 h tama pri temperaturi od 25°C (**Neri et al., 2007**).

Iniciranje obarazovanja mikrokonidijskog stadijuma obavljeno je gajenjem izolata na V8 podlozi u uslovima veštačke smene dana i noći (**Neri et al., 2007**). Nakon 20 dana inkubacije provereno je formiranje mikrokonidijskog stadijuma pravljenjem preparata i posmatranjem pod svetlosnim mikroskopom (Leica Microsystems AG, Heerrugg, Switzerland) .

Za postupak ispitivanja načina klijanja konidija po 100 µl suspenzije spora koncentracije 10⁵ konidija / ml zasejano je u Petri kutije u koje razlivena sterilna podloga od vodenog agara (VA). Petri kutije su zatim zatvorene, oblepljene parafilmom i inkubirane 18 h u termostatu pri 25°C.

Mikroskopska merenja proučavanih izolata *Monilinia* spp. obuhvatila su: dužinu i širinu konidija, ukupnu dužinu inicijalnih hifa, dužinu inicijalne hife do prve bočne grane, kao i veličinu mikrokonidija. Mereno je po 50 konidija ili inicijalnih hifa i njihovo fotografisanje obavljeno je pomoću svetlosnog mikroskopa Leica DC 300 (Leica Microsystems AG, Heerrugg, Switzerland) oprepremljenim digitalnom kamerom Leica DMLS (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Germany) i softverom Leica IM1000 (Leica Microsystems AG, Heerrugg, Switzerland).

Mikroskopska ispitivanja odabranih izolata *Monilinia* spp. posmatrana su korišćenjem skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM). Priprema uzoraka za SEM urađena je po modifikovanom postupku **Soylu et al. (2006)**. Fragmenti kolonije zajedno sa V8 podlogom, prečnika oko 5 mm isecani su bušačem micelije, a zatim fiksirani u 2,5% rastvoru glutaradehida u fosfatnom puferu (0,01 M, pH 7,2) u trajanju od 2 h, pri sobnoj temperaturi. Uzorci su zatim isprani dva puta u istom puferu u trajanju od po 10 min, a potom dehidrirani u seriji razblaženja rastvora alkohola: 70%, 80%, 90% i tri puta u 100% alkoholu. Dehidratacija u svakoj koncentraciji alkohola je obavljena u trajanju od 30 min, a zatim su uzorci držani u 100% alkoholu tokom 18 h pri

temperaturi od 4°C. Uzorci su sečeni na manje komade, a zatim sušeni na kritičnoj tački sušenja pomoću tečnog CO₂ (Critical Point Dryer, CPD 030, BAL-TEC, Scan Germany), čime je kompletirana priprema uzoraka, zatim su presvlačeni zlatom u uređaju za uparavanje (BAL-SCD 005, Scan Germany) u trajanju od 90 s pri jačini struje od 30 mA. Uzorci su posmatrani pod skening elektronskim mikroskopom (JEOL, JSM 6460, Japan) pri 20 kV.

4.3. Proučavanje ekoloških i odgajivačkih osobina izolata *Monillinia* spp.

Uticaj različitih uslova osvetljenja na razvoj i sporulaciju izolata *Monilinia* spp.

Uticaj različitih uslova osvetljenja na porast i sporulaciju odabranih izolata *Monilinia* spp. proučavan je pri sledećim uslovima: a) 12 h svetlo / 12 h tama; b) 12 h UV svetlo / 12 h tama; c) tama. Zasejavanje podloga urađeno je nanošenjem isečaka kolonija izolata prečnika 5 mm iz pet dana starih kultura gajenih na KDA podlozi. Porast micelije na različitim hranljivim podlogama praćen je svakodnevno merenjem prečnika kolonije u periodu od sedam dana i izračunavan je prosečan dnevni porast. Nakon inkubacije u razvijene kulture je dodavano po 5 ml vode, a zatim je suspenzija spora procedena kroz sloj filter papira u cilju odstranjivanja micelije. Koncentracija spora je zatim određena hemocitometrom. Broj konidija po jedinici površine izračunat je kao količnik broja spora u ukupnoj zapremini destilovane vode i površine kolonije. Ogled je postavljen u pet ponavljanja.

Uticaj temperature na razvoj i sporulaciju izolata *Monilinia* spp.

Za ispitivanje uticaja različitih temperatura na porast kolonija i sporulaciju, proučavani izolati predhodno su odgajani na KDA podlozi tokom pet dana. Zasejavanje isečaka kolonija izolata prečnika 5 mm urađeno je prenošenjem u centar KDA podloge pomoću kopljaste igle. Petri kutije su zatim inkubirane pri temperaturama od 5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C i 30°C u tami. Porast kolonije pri izlaganju različitim temperaturama praćen je svakodnevno merenjem prečnika kolonije u periodu od sedam dana i izračunavan je kao prosečan dnevni porast. Intenzitet sporulacije izražen je kroz broj konidija po cm² kolonije. Priprema spora i izračunavanje spora po jedinici površine urađeni su prema gore opisanom postupku. Ogled je postavljen u pet ponavljanja.

Uticaj različitih podloga na razvoj i sporulaciju izolata *Monilinia* spp.

Uticaj različitih podloga na porast i sporulaciju odabranih izolata *Monilinia* spp. proučavan je na pet različitih podloga: podlozi od slada (MEA), podlozi od jabuke (AJA), KDA podlozi, Čapekovej podlozi (CYA) i V8 podlozi. Zasejavanje podloga urađeno je nanošenjem isečaka kolonija izolata prečnika 5 mm iz pet dana starih kultura gajenih na KDA podlozi. Zasejane kolonije inkubirane su na sobnoj temperaturi u tami. Porast micelije na različitim hranljivim podlogama praćen je svakodnevno merenjem prečnika kolonije u periodu od sedam dana i izračunavan je prosečan dnevni porast. Nakon inkubacije od sedam dana pri sobnoj temperaturi na različitim hranljivim podlogama u razvijene kulture je dodavano po 5 ml vode, a zatim je suspenzija spora procedena kroz sloj filter papira u cilju odstranjivanja micelije. Koncentracija spora je zatim određena hemocitometrom. Broj konidija po jedinici površine izračunat je kao količnik broja spora u ukupnoj zapremini destilovane vode i površine kolonije. Ogled je postavljen u pet ponavljanja.

Uticaj pH vrednosti na razvoj i sporulaciju izolata *Monilinia* spp.

Ispitivanje uticaja pH vrednosti podloge na porast i sporulaciju izolata, proučavano je KDA podlozi čija je pH posle sterilizacije, sa 0,1N HCl i 0,1N NaOH podešena do vrednosti pH 3, 4, 5, 6, 7, 8 i 9. Očitavanje i podešavanje pH vrednosti podloge vršena su pomoću pH-metra (Universalinindikator, pH 0-14 Merck, Germany). Zasejavanje odabranih izolata na podlogu urađeno je prenošenjem isečaka micelije prečnika 5 mm uzetih sa oboda kolonija starih sedam dana odgajenih na KDA, u centar Petri kutija pomoću kopljaste igle. Nakon zasejavanja Petri kutije su inkubirane na sobnoj temperaturi u mraku. Porast micelije na različitim pH vrednostima podloga praćen je svakodnevno merenjem prečnika kolonije u periodu od sedam dana i izračunavan je kao prosečan dnevni porast, dok je intenzitet sporulacije izražen kroz broj konidija po cm² kolonije. Priprema suspenzije konidija i izračunavanje broja konidija po jedinici površine urađeni su prema gore opisanom postupku. Ogled je postavljen u pet ponavljanja.

Hranljive podloge korišćene u ispitivanjima:

-Podloga od slada (Malt agar, MEA) pripremljena je od 20 g ekstrakta slada, 15 g agara i 1000 ml destilovane vode prema recepturi **Kim et al. (2005)**.

-Krompir-dekstrozna podloga (Potato-dextrose agar, KDA) pripremljena je od 38 g ekstrakta podloge (PDA, EMB Chemicals Inc. Gibbstown, NJ, USA) i 1000 ml destilovane vode.

-V8 podloga (V8 juice agar, V8) pripremljena je od 200 ml soka od paradajza, 3 g CaCO_3 , 17 g agara i 800 ml destilovane vode, prema recepturi **Gams (1987)**.

-Podloga od jabuke (Apple juice agar, AJA), pripremljena je od 200 ml soka od jabuke, 3 g CaCO_3 , 15 g agara i 800 ml destilovane vode, prema recepturi **Kim et al. (2005)**.

-Čapekova podloga (Czapeck dox agar, CYA) pripremljena je od 50 g ekstrakta (Czapeck dox agar, CYA, Fluka Analytical) i 1000 ml destilovane vode.

-Podloga od vodenog agara (Water agar, VA) pripremljena je od 20 g agara i 1000 ml destilovane vode.

4.4. Proučavanje patogenih osobina izolata *Monilinia* spp.

Patogene osobine odabranih izolata *Monilinia* spp. ispitivane su inokulacijom plodova jabuka sorti Ajdared, Zlatni Delišeš i Greni Smit. Pojava simptoma i razvoj oboljenja praćen je posle tri, pet, 15 i 30 dana inkubacije, dok je virulentnost izolata određena merenjem veličine pega posle pet dana, a intenzitet sporulacije posle šest dana.

4.4.1. Proučavanje virulentosti izolata

Ispitivanje virulentnosti odabranih izolata obavljeno je inokulacijom plodova jabuke sorti: Ajdared, Zlatni Delišeš i Greni Smit prema metodi **van Leeuwen et al. (2002)**. Za inokulaciju su korišćeni izolati odgajeni pet dana na KDA podlozi u uslovima 12 h svetlo / 12 h tama. Plodovi jabuke su prvo površinski dezinfikovani potapanjem u 1% rastvoru NaOCl u trajanju od 1 min, a zatim isprani dva puta u sterilnoj destilovanoj vodi i ostavljeni da se prosuše na vazduhu. Na površini svakog ploda je sterilnim bušačem napravljena po jedna povreda (prečnika 6 mm i dubine 5 mm), a zatim su isecci micelije zajedno sa podlogom prečnika 5 mm uzeti sa oboda

kultura i uneseni u otvore na plodovima. Kontrolni plodovi inokulisani su isečkom sterilne KDA podloge. Inokulisani i kontrolni plodovi inkubirani su u plastičnim kontejnerima pri temperaturi od 22°C u uslovima visoke relativne vlažnosti (95-100%) i veštačke smene svetla i tame (14 h svetlo / 10 h tama). Prečnik pega meren je posle pet dana inkubacije. Po ispitivanom izolatu i kontroli je korišćeno šest plodova.

4.4.2. Proučavanje intenziteta sporulacije ispitivanih izolata na inokulisanim plodovima jabuke

Intenzitet sporulacije izolata na inokulisanim plodovima jabuke određen je po postupku **van Leeuwen et al. (2002)**. Posle inkubacije od šest dana konidije u okviru pega su spirane destilovanom vodom. Dodato je po 30 ml sterilne destilovane vode po plodu uz mešanje pri 250 rpm u trajanju od 30 s na magnetnoj mešalici. Ovako dobijene suspenzije spora filtrirane su kroz sloj filter papira u cilju odstranjivanja micelije. Nakon izračunavanja koncentracije spora pomoću hemocitometra preračunat je broj spora u ukupnoj zapremini vode. Broj spora po jedinici površine (broj spora / cm²) dobijen je kao količnik ukupnog broja spora u zapremini vode i površine pege.

4.4.3. Proučavanje histopatologije plodova jabuke i morfologija stroma

Histopatološka ispitivanja kolonizacije i stromatizacije plodova jabuke inokulisanih odabranim izolatima *Monilinia* spp. obavljena su posle jednog i posle četiri meseca inkubacije. Za ova ispitivanja plodovi jabuke sorte Ajdared su prvo površinski dezinfikovani potapanjem u 1% rastvoru NaOCl u trajanju od 1 min, a zatim dva puta isprani u sterilnoj destilovanoj vodi i ostavljeni da se prosuše na vazduhu. Na površini ploda su sterilnom kopljastom iglom napravljene povrede u koje su postavljeni fragmenti micelije zajedno sa podlogom. Kontrolni plodovi inokulisani su isečcima sterilne KDA podloge. Inokulisani plodovi držani su u plastičnim kontejnerima u uslovima tame pri 25°C i inkubirani jedan odnosno četiri meseca.

Za histološka istraživanja isecani su fragmenti tkiva ploda jabuke (5 x 5 mm) u zoni pokožice i dela ploda nastalog od cvetne lože na mestima gde je uočena stromatizacija. Ovi fragmenti su fiksirani u 50% alkoholnom rastvoru ili u FAA (Formalin-Acetic Acid Alcohol), dehidratirani, tretirani parafinom, zatim sečeni pomoću mikrotoma (Leica SM2000 R) na debljinu od 5-10 µm. Nakon deparafinizacije

i rehidracije preseci su tretirani na različite načine radi pripreme privremenih ili trajnih mikroskopskih preparata (Ruzin, 1999) koji su zatim posmatrani svetlosnim ili fluorescentnim mikroskopom.

Za svetlosnu mikroskopiju preparati su obojeni nekom od sledećih metoda, a zatim posmatrani mikroskopom Leica 2000:

1. toluidin plavim (0,05% vodeni rastvor) (**Ruzin, 1999**)
2. alcijan plavim i safraninom (1% rastvor u 50% etanolu) (**Ruzin, 1999**)
3. metilen plavim i safraninom (5% rastvor metilen plavog u laktofenolu i 1% rastvor safranina u vodi). Ovo bojenje je urađeno na dva načina, prema metodi **Marques et al. (2013)** preseci su bojeni rastvorom safranina 10 sekundi, kao i po modifikovanoj metodi gde je uneta mala izmena u protokol, jer su preseci držani u safraninu samo 5 sekundi.

Za fluorescentnu mikroskopiju uzorci su tretirani:

1. rastvorom kalcifluora i evans plavog (rastvor Calcofluor White M2R 1 g / l i Evans blue 0,5 g / l) (**Monheit et al., 1984**) ili
2. rastvorom kalcifluora i evans plavog u kombinaciji sa bazom (10% rastvor KOH) u zapreminskom odnosu 1:1 (**Monheit et al., 1984**).

Nakon bojenja uzoraka kalcifluorom i evans plavim, posmatrani su fluorescentnim mikroskopom Leica DMLS opremljenim HBO 50 W živinom lampom, UV filterom (filter block BP 340-380) i slikani kamerom DFC300.

4.5. Proučavanje molekularnih osobina *Monilinia* spp.

4.5.1. Pogodnost upotrebe različitih prajmera za specifičnu detekciju *Monilinia* spp.

Iz odabranih izolata *Monilinia* spp. urađena je ekstrakcija nukleinskih kiselina po opisanoj metodi **Day and Shatock (1997)**. Za standardizaciju PCR metode, kao i ispitivanje pogodnosti upotrebe različitih prajmera za specifičnu detekciju *M. fructigena*, *M. polystroma*, *M. laxa* i *M. fructicola* korišćeni su prajmeri prikazani u Tabeli 6 koje su dizajnirali **Cote et al. (2004)**, **Hughes et al. (2000)** i **Ioos and Frey (2000)**. Standardizacija je urađena sa referentnim i drugim identifikovanim izolatima *Monilinia* spp.

Tabela 6. Prajmeri korišćeni za molekularnu detekciju i identifikaciju *Monilinia* spp.

Naziv prajmera	Sekvenca (5'→3')	Literaturni izvor
Mo368-5 Mo368-8R Mo368-10R Laxa-R2	GCAAGGTGTCAAAACTTCCA AGATCAAACATCGTCCATCT AAGATTGTCACCATGGTTGA TGCACATCATATCCCTCGAC	Cote et al. (2004)
Mfg-R2 Mfc-F1 Mfc-R1 Ml-Mfg-F2 Ml-Mfc-R1	GGTCAACCATAGAAAATTGGT TATGCTCGCCAGAGGATAATTA GATTTTAGAGCCTGCCATTA GCTCGCCAGAGAATAATC GATTTTAGAGCCTGCCATTG	Hughes et al. (2000)
ITS1Mfgn ITS4Mfgn ITS1Mfcl ITS4Mfcl ITS1Mlx ITS4Mlx	CACGCTCGCCAGAGAATAACC GGTGT TTTTGCCAGAAGCACACT TATGCTCGCCAGAGGATAATT TGGGT TTTTGGCAGAAGCACACT TATGCTCGCCAGAGGATAATC TGGGT TTTTGGCAGAAGCACACC	Ioos and Frey (2000)
ITS1 ITS4	TCCGTAGGTGAACCTGCGG TCCTCCGCTTATTGATAT	White et al. (1990)

PCR metoda (Hughes et al., 1990). Svaka reakciona PCR smeša, ukupne zapremine 25 µl, sadržala je 12,5 µl 2xPCR master mix (Fermentas, Litvanija) po 1 µl svakog prajmera (10 pmol / µl) (Metabion international AG, Germany), 9,5 µl vode i po 1 µl ekstrahovane DNK. Kao negativna kontrola je korišćena reakciona PCR smeša bez dodate DNK.

Uslovi izvođenja u PCR reakciji korišćenjem prajmera Mfc-F1 i Mfc-R1 specifičnih za *M. fructicola* bili su sledeći:

- početna denaturacija 2 min pri temperaturi od 94°C,
- 27 ciklusa: denaturacija 1 min pri 94°C; aniling 1 min pri 59°C; elongacija 1,5 min pri 72°C;
- finalna elongacija 10 min pri 72 °C.

Uslovi izvođenja u PCR reakciji korišćenjem prajmera Ml-Mfg-F2 i Ml-Mfc-R1 specifičnih za *M. laxa* i upotrebom prajmera ITS1 i Mfg-R2 specifičnih za *M. fructigena* bili su sledeći:

- početna denaturacija 2 min pri temperaturi od 94°C,

- 30 ciklusa: denaturacija 1 min pri 94°C; aniling 1 min pri 59°C; elongacija 1,5 min pri 72°C;
- finalna elongacija 10 min pri 72 °C.

U PCR metodi korišćenjem prajmera Mfc-F1 / Mfc-R1 pozitivnom reakcijom je smatrana pojava amplikona oko 280 bp specifičnih za *M. fructicola*, upotrebom prajmera Ml-Mfg-F2 / Ml-Mfc-R1 pojava amplikona oko 280 bp specifičnih za *M. fructicola* i prajmera ITS1 / Mfg-R2 pojava amplikona oko 460 bp specifičnih za *M. fructigena*.

PCR metoda (Ioos and Frey, 2000). Svaka reakciona PCR smeša, ukupne zapremine 25 µl, sadržala je 12,5 µl 2xPCR master mix (Fermentas, Litvanija) po 1 µl svakog prajmera (10 pmol / µl) (Metabion international AG, Germany), 9,5 µl vode i po 1 µl ekstrahovane DNK. Kao negativna kontrola je korišćena reakciona PCR smeša bez dodate DNK.

Uslovi izvođenja u direktnom PCR-u bili su sledeći:

- početna denaturacija 3 min pri temperaturi od 94 °C,
- 30 ciklusa: denaturacija 30 s pri 94 °C; aniling 30 s min pri 62,5 °C; elongacija 1,5 min pri 72 °C;
- finalna elongacija 10 min pri 72 °C.

U PCR metodi upotrebom prajmera ITS1Mfcl / ITS4Mfcl pozitivnom reakcijom smatrana je pojava amplikona od oko 350 bp specifičnih za *M. fructicola*, korišćenjem prajmera ITS1Mfgn / ITS4Mfgn pojava amplikona oko 350 bp specifičnih za *M. fructigena* i upotrebom prajmera ITS1Mlx / ITS4Mlx pojava amplikona oko 350 bp specifičnih za *M. laxa*.

4.5.2. Ispitivanje sekvenci nukleotida ITS rDNK regiona izolata *Monilinia* spp.

U cilju određivanja sekvenci ITS1-5.8S-ITS2 rDNK regiona odabranih izolata urađena je PCR metoda korišćenjem univerzalnih ITS1 / ITS4 prajmera (**White et al., 1990**). Ova metoda je korišćena kao kontrola prisustva nukleinskih kiselina u uzorcima korišćenim za standardizaciju i ispitivanje pogodnosti upotrebe različitih prajmera za specifičnu detekciju *Monilinia* spp.

Svaka reakciona PCR smeša, ukupne zapremine 25 µl, sadržala je 12,5 µl 2xPCR master mix (Fermentas, Litvanija), po 1 µl svakog prajmera (10 pmol / µl), 9,5

μl vode i 1 μl ekstrahovane DNK. Kao negativna kontrola je korišćena reakciona PCR smeša bez dodate DNK.

Uslovi izvođenja u direktnom PCR-u (**White et al., 1990**) bili su sledeći:

- početna denaturacija 2 min pri temperaturi od 94°C,
- 30 ciklusa: denaturacija 30 s pri 94°C; aniling 30 s pri 55°C; elongacija 30 s pri 72°C;
- finalna elongacija 10 min pri 72°C.

Pojava PCR produkata sa prajmerima ITS1 / ITS4 oko 550 bp smatrana je pozitivnom reakcijom.

Kod odabranih izolata PCR produkti su prečišćeni pomoću mi-PCR Purification Kit (Metabion International AG, Germany) po uputstvu proizvođača na sledeći način:

U tubice sa 20 μl PCR produkta dodato je 100 μl pufera za vezivanje (DNA Bunding Buffer), a zatim je pipetiranjem sve dobro promešano. Smeša je zatim prebačena u kolonu sa filterom, a zatim centrifugirana na maksimalnom broju obrtaja (13000 rpm) u trajanju od 1 min u cilju vezivanja DNK za filter. Nakon centrifugiranja tečna faza je odbačena, a tubica je vraćena u kolonu sa filterom i u nju je dodato 750 μl pufera za ispiranje (Washing Buffer) i tubica centrifugirana na 13000 rpm u trajanju od 1 min. Posle centrifugiranja u kolone je dodato još 250 μl istog pufera (Washing Buffer), centrifugirano na 13000 rpm u trajanju od 1 min i na kraju tečna faza je odbačena i kolona je vraćena u istu kolekcionu tubicu i centrifugirana pri istim uslovima. Nakon centrifugiranja kolona je prebačena u novu kolekcionu tubicu kroz koju je pipetirano po 50 μl zagrejane vode (Rnase-free water, Molecular Biology Grade Water, Eppendorf) temperature 65-75°C i još jednom centrifugirana pri istim uslovima. Odmah po završetku poslednjeg centrifugiranja kolona je odbačena, a prečišćen uzorak sakupljen u kolekcionoju tubici čuvan je pri -20°C.

Prečišćeni PCR produkti su poslani na uslužno sekvenciranje u oba smera (prajmerima korišćenim za amplifikaciju) u Macrogen Inc. (<http://dna.macrogen.com>, Korea). Dobijene sekvence su spojene u programu Pregap4 u okviru Staden paketa (**Staden et al., 2000**), posle čega su im određene konzenzus nukleotidne sekvence. Sekvence su upoređivane sa dostupnim sekvencama deponovanih u GenBank bazi podataka u okviru National Center for Biotechnology and Information (NCBI) korišćenjem MegaBlast algoritma (Basic Local Alignment Search Tool) u cilju potvrde

identifikacije dobijenih sekvenci. Sve dobijene konsenzus sekvence su deponovane u GenBank (NCBI) gde im je dodeljen pristupni broj (GenBank Accession Number). Međusobno poređenje dobijenih sekvenci izolata *Monilinia* vrsta urađeno je korišćenjem MEGA 6 programa (Tamura et al., 2013).

4.5.3. Ispitivanje pogodnosti ITS rDNK regiona izolata *Monilinia* spp. za RFLP analizu

Sekvence ITS rDNK regiona su korišćenjem pDRAW32 softvera (www.acalome.com) analizirane na prisustvo specifičnih mesta za restrikcione enzime koji se mogu koristiti za specifičnu detekciju i razdvajanje *M. polystroma* od *M. fructigena*, *M. fructicola* i *M. laxa*. Za ovu analizu korišćene su sekvence izolata *Monilinia* spp. poreklom iz Srbije. Takođe, korišćene su i sekvence *M. fructigena* (44), *M. polystroma* (7), *M. fructicola* (76) i *M. laxa* (41) koje su deponovane u GenBank bazi podataka (Prilog 1).

Potvrda dobijenih razlika u virtuelnoj restrikcionoj analizi je urađena digestijom amplifikovanih ITS1 / ITS4 produkata izolata *Monilinia* spp. *HhaI* restrikcionim enzimom (Fermentas, Lithuania) prema uputstvu proizvođača. Reakcije RFLP analize su se odvijale u reakcionoj smeši koja se po uzorku sastojala od 9,75 µl destilovane vode, 2,5 jedinice (U) *HhaI* restrikcionog enzima, 2 µl pufera za restrikcioni enzim i, u zavisnosti od količine umnoženog amplikona, od 3 do 7 µl PCR produkta (što je oko 100-200 ng). Reakcione smeše su inkubirane tokom noći pri temperaturi od 37°C. Produkti RFLP analize razdvojeni su u 2% agaroznom gelu i obojeni prema već opisanom postupku za vizuelizaciju PCR produkata. RFLP analiza je ponovljena više puta.

4.5.4. Ispitivanje filogenetskih međuodnosa

Filogenetska analiza je urađena korišćenem 19 dobijenih sekvenci ITS rDNK regiona *Monilinia* vrsta, kao i 24 sekvence vrsta roda *Monilinia* dostupnih u GenBank bazi podataka (Prilog 1). Filogenetsko stablo konstruisano je korišćenjem Maximum Parsimony metode (MEGA 6) uz bootstrap analizu u 1000 ponavljanja. Za koren stabla korišćena je sekvenca *Botryotinia fuckeliana* (FJ791158).

4.6. Ispitivanje zastupljenosti *Monilinia* spp. u zasadima i skladištima

Nakon urađene identifikacije izolata vrsta roda *Monilinia* izračunata je njihova procentualna zastupljenost u odnosu na ukupan broj dobijenih i identifikovanih izolata u zasadima, kao i skladištima u Srbiji.

4.7. Ispitivanje antifungalnog delovanja etarskih ulja na *M. fructigena*

U radu je ispitivano antifungalno fumigantno dejstvo 16 komercijalno dostupnih etarskih ulja: timijana (*Thymus zygis*) proizvođača Ayus Gmbh Germany, kao i anisa (*Pimpinella anisum*), bergamonta (*Citrus aurantium* spp. *bergamia*), bora (*Pinus silvestris*), bosiljka (*Ocimum basilicum*), cimeta (*Cinnamoni zeylanicum*), čajnog drveta (*Melaleuca alternifolia*), eukaliptusa (*Eucaliptus globulus*), geranijuma (*Pelargonium graveolens*), kedra (*Cedrus atlantica*), kleke (*Juniperus communis*), limuna (*Citrus limonum*), morača (*Foeniculum vulgare*), pitome nane (*Menta piperita*), pomorandže (*Citrus aurantium*) i terpentina (*Pinus terebinta*) proizvođača BeoLab Srbija, na porast kolonija izolata MFSRB-1 vrste *M. fructigena*. Izolat je održavan na KDA podlozi pri 4°C. Etarska ulja koja su ispoljila najjače antifungalno delovanje u preliminarnom ogledu su dataljnije ispitivana kontaktnom i fumigantnom primenom u *in vitro* i *in vivo* uslovima prema *M. fructigena*.

Preliminarno *in vitro* delovanje etarskih ulja

Preliminarno ispitivanje obuhvatilo je fumigantno delovanje etarskih ulja na porast micelije patogena u *in vitro* uslovima. Fragmenti micelije gljive stare sedam dana, prečnika 6 mm, zasejani su u Petri kutije (R=9 cm) na KDA podlogu. Kap ispitivanog etarskog ulja (10 µl) pipetom je postavljena na središnji deo unutrašnje strane poklopca, a zatim su kutije zatvorene parafilmom, postavljene u obrnuti položaj i inkubirane pri 25°C sedam dana. Kao negativna kontrola korišćena je kap sterilne destilovane vode (10 µl). Uticaj isparljivih komponenti etarskih ulja ispitivan je u koncentraciji 0,1565 µl / ml vazduha. Posle sedam dana inkubacije meren je porast micelije i izračunat % inhibicije prema sledećoj formuli: % inhibicije=[(DC-DT) / DC] x 100 [DC-porast micelije gljive kontrolnog tretmana (mm); DT-porast micelije gljive kod tretmana (mm)]. Kod tretmana koji su u potpunosti inhibirali porast micelije način

delovanja etarskog ulja određivan je prebacivanjem fragmenta micelije na novu KDA podlogu. Posle sedam dana inkubacije, ako nije došlo do porasta micelije delovanje je označeno kao fungicidno, a ako se micelija razvijala kao fungistatično.

***In vitro* fumigantno delovanje etarskih ulja**

In vitro fumigantno delovanje etarskih ulja ispitivano je na porast micelije i klijanje konidija. Fragmenti micelije gljive stare sedam dana, prečnika 6 mm, zasejani su u Petri kutije (R=9 cm) na KDA podlogu. Na središnji deo poklopca Petri kutija pipetiranjem su postavljene različite zapremine etarskog ulja: 1 μ l, 3 μ l, 5 μ l, 7 μ l i 10 μ l. Na ovaj način dobijene su koncentracije od: 0,02, 0,05, 0,08, 0,110 i 0,156 μ l / ml vazduha. Petri kutije su zatim zatvorene, oplepljene parafilmom i inkubirane tokom sedam dana pri 25°C. Kontrolni tretman je bio bez etarskog ulja. Antifungalno delovanje izraženo je procentom inhibicije porasta micelije, kao i proverom fungicidnog odnosno fungistatičnog dejstva ulja. Minimalna koncentracija etarskog ulja pri kojoj izolat nije rastao označavana je kao minimalna inhibitorna koncentracija (MIC).

Ispitivanje fumigantnog delovanja etarskih ulja na klijanje konidija i porast inicijalnih hifa obavljeno je na vodenom agaru. Postupak iniciranja sporulacije izolata gljive urađeno je na V8 podlozi, a zatim je suspenzija spora proceđena kroz sloj filter papira. Po 100 μ l suspenzije spora koncentracije 10^5 konidija / ml je razliveno na VA podloge. Na središnji deo poklopca Petri kutija su zatim pipetiranjem postavljene različite zapremine etarskog ulja: 1 μ l, 3 μ l, 5 μ l, 7 μ l i 10 μ l. Na ovaj način dobijene su koncentracije od: 0,02, 0,05, 0,08, 0,110 i 0,156 μ l / ml vazduha. Kutije su oplepljene parafilmom, okrenute u obrnutom položaju i inkubirane 24 h pri 25°C. Nakon inkubacije određen je % proklijalih konidija i meren porast inicijalnih hifa u tretmanima i kontroli, a zatim izračunat % inhibicije. Procenat inhibicije klijanja konidija određen je prema formuli: % inhibicije = $[(KC-KT) / KC] \times 100$ [KC-klijale konidije u kontroli (%); KT-klijale konidije u tretmanu (%)]. Procenat inhibicije porasta inicijalnih hifa urađeno je prema formuli: % inhibicije = $[(HC-HT) / HC] \times 100$ [HC-porast inicijalnih hifa u kontroli (μ m); HT-porast inicijalnih hifa u tretmanu (μ m)].

***In vitro* kontaktno delovanje etarskih ulja**

In vitro kontaktno delovanje etarskih ulja ispitivano je na porast micelije i klijanje konidija. Kontaktno dejstvo etarskih ulja ispitivano je dodavanjem različitih zapremina etarskih ulja u KDA podlogu za ispitivanje delovanja na porast micelije ili u VA podlogu za ispitivanje delovanja ulja na klijanje konidija. U 1,5 ml sterilnog 0,1% Tween 20 dodavano je: 1 μ l, 3 μ l, 5 μ l, 7 μ l i 10 μ l etarskog ulja i dobro promućkano na vorteksu. Ovako pripremljena razređenja etarskih ulja sipana su u po 13,5 ml prohlađene KDA podloge. Dobijene koncentracije etarskih ulja su iznosile 0,67 μ l / ml, 0,47 μ l / ml, 0,33 μ l / ml, 0,2 μ l / ml i 0,07 μ l / ml podloge. Kontrolni tretman sadržao je samo 1,5 ml 0,1% rastvora Tween 20 bez dodatka etarskog ulja. Fragmenti micelije gljive stare sedam dana, prečnika 6 mm, zasejani su u Petri kutije (R=9 cm) na ovako pripremljene KDA podloge. Kulture su inkubirane pri temperaturi od 25°C i posle sedam dana izmeren je porast micelije. Antifungalno delovanje izraženo je procentom inhibicije porasta micelije, kao i proverom fungicidnog odnosno fungistatičnog dejstva prema opisanom postupku. Minimalna koncentracija etarskog ulja pri kojoj izolat nije rastao označavana je kao minimalna inhibitorna koncentracija (MIC).

Postupak iniciranja sporulacije izolata gljive obavljen je na V8 podlozi, a zatim je suspenzija spora procedena kroz sloj filter papira. Po 100 μ l suspenzije spora koncentracije 10^5 konidija / ml je razliveno na VA podloge. Petri kutije su oblepljene parafilmom i inkubirane pri 25°C. Nakon inkubacije određen je % proklijalih konidija i meren je porast inicijalnih hifa. Procentat inhibicije klijanja konidija određen je prema formuli: % inhibicije = $[(KC-KT) / KC] \times 100$ [KC-klijale konidije u kontroli (%); KT-klijale konidije u tretmanu (%)]. Procentat inhibicije porasta inicijalnih hifa izračunat je prema formuli: % inhibicije = $[(HC-HT) / HC] \times 100$ [HC-porast inicijalnih hifa u kontroli (μ m); HT-porast inicijalnih hifa u tretmanu (μ m)].

***In vivo* fumigantno delovanje etarskih ulja**

In vivo fumigantno delovanje etarskih ulja ispitivano je na razvoj oboljenja na veštački inokulisanim plodovima jabuke i to: protektivno (4 h pre inokulacije) i kurativno delovanje ulja (4 h nakon inokulacije).

Plodovi jabuke sorte Ajdared prvo su površinski dezinfikovani potapanjem u 1% rastvoru NaOCl u trajanju od 1 min, a zatim isprani dva puta u sterilnoj destilovanoj

vodi i ostavljeni da se prosuše na vazduhu. Na plodovima su prvo napravljene po dve povrede prečnika 4 mm i dubine 4 mm, a zatim su plodovi postavljeni u plastične posude ($V=2400$ ml), a između plodova su postavljena sahatna stakla u koje je nanešeno etarsko ulje. Fumigantno protektivno delovanje ulja ispitivano je nanošenjem na sahatna stakla različitih zapremina etarskog ulja: 240 μ l i 2400 μ l. Dobijene koncentracije ulja su iznosile 0,01% i 0,1% u zapremini vazduha. Kutije su odmah oblepljene parafilmom u cilju spečavanja izlaska isparljivih komponenti i plodovi su izlagani parama ulja tokom 2 h. Nakon završenog tretmana sahatna stakla sa uljima su uklonjena i kutije sa plodovima su proventrene 30 min u laminarnoj komori. Inokulacija plodova je obavljena posle 4 h od provetravanja kutija, nanošenjem 30 μ l suspenzije spora koncentracija 2×10^4 konidija / ml u povrede na plodovima. Plodovi inokulisani samo suspenzijom spora su bili pozitivna kontrola, dok su plodovi izlagani samo isparljivim komponentama ulja bili negativna kontrola. Tretirani plodovi, pozitivne i negativne kontrole inkubirani su u plastičnim kontejnerima pri 25°C tokom šest dana. Po tri ploda je korišćeno u svakom tretmanu, kao i kontrolama. Posle šest dana meren je prečnik pega u tretmanima kao i pozitivnoj kontroli, a procenat inhibicije razvoja oboljenja određen je prema formuli: % inhibicije= $[(BC-BT) / BC] \times 100$ [BC-prečnik pega u kontroli (mm); BT-prečnik pega u tretmanu (mm)].

Za *in vivo* ispitivanja fumigantnog kurativnog delovanja etarskih ulja plodovi su inokulisani nanošenjem 30 μ l suspenzije spora i koncentracije 2×10^4 konidija / ml u povrede plodova, postavljeni u plastične Petri kutije i inkubirani 4 h na sobnoj temperaturi. Zatim je na sahatna stakla u kutijama nanešeno po 240 i 2400 μ l etarskih ulja i dobijene su koncentracije 0,01% i 0,1% po zapremini vazduha. Kutije su odmah oblepljene parafilmom u cilju spečavanja izlaska isparljivih komponenti van kutija i plodovi su izlagani parama ulja tokom 2 h. Nakon tretmana sahatna stakla sa uljima su uklonjena i kutije proventrene 30 min u laminarnoj komori. Tretirani plodovi, kao i pozitivne i negativne kontrole inkubirani su u plastičnim kontejnerima pri 25°C tokom šest dana. Po tri ploda je korišćeno u svakom tretmanu, kao i kontrolama. Posle šest dana meren je prečnik pega u tretmanima kao i pozitivnoj kontroli, a procenat inhibicije razvoja oboljenja određen je prema formuli: % inhibicije= $[(BC-BT) / BC] \times 100$ [BC-prečnik pega u kontroli (mm); BT-prečnik pega u tretmanu (mm)].

***In vivo* kontaktno delovanje etarskih ulja**

In vivo delovanje kontaktne faze etarskih ulja ispitivano je na razvoj oboljenja na veštački inokulisanim plodovima jabuke. Ogled je obuhvatio ispitivanje protektivnog i kurativnog dejstva kontaktne faze ulja. U ogledu su ispitivana i dva načina tretmana uljima na povređenim plodovima jabuke: potapanjem plodova u emulziju ulja i nanošenje emulzije ulja direktno na povredu.

Plodovi jabuke su površinski dezinfikovani potapanjem u 1% rastvoru NaOCl u trajanju od 1 min, a zatim dva puta isprani u sterilnoj destilovanoj vodi i ostavljeni da se prosuše na vazduhu. Na plodovima su sterilnim bušačem napravljene po dve povrede prečnika 4 mm i dubine 4 mm. Emulzije ulja su pripremane tako što su u 0,1% sterilnom rastvoru Tween 20 dodavana ulja, a potom promešana na magnetnoj mešalici (Biosan Sia, Latvia) u trajanju od 3 min u cilju ravnomernog dispergovanja ulja u tečnosti. Koncentracije ispitivanih ulja nakon dispergovanja u Tween-u bile su 0,01%, 0,1% i 0,5%. Kontaktno protektivno delovanje etarskih ulja ispitivano je potapanjem plodova u emulzije ulja u trajanju od 30 s ili je 30 µl emulzije ulja nanošeno direktno u povrede na plodovima. Plodovi su inkubirani u plastičnim kutijama 4 h pri 25°C. Nakon inkubacije, plodovi su inokulisani nanošenjem po 30 µl suspenzije spora koncentracije 2×10^4 konidija / ml u povrede na plodovima. Plodovi su zatim inkubirani šest dana pri 25°C u plastičnim kutijama. Plodovi inokulisani samo suspenzijom spora bili su pozitivna kontrola, dok su plodovi tretirani samo emulzijama ulja korišćeni kao negativna kontrola. Po tri ploda je korišćeno u svakom tretmanu, kao i u kontrolama. Posle šest dana meren je prečnik pega u tretmanima i pozitivnoj kontroli, a inhibicija razvoja oboljenja određena je kao % inhibicije prema formuli $\% \text{ inhibicije} = [(BC - BT) / BC] \times 100$ [BC-prečnik pega u kontroli (mm); BT-prečnik pega u tretmanu (mm)].

Za *in vivo* ispitivanja kontaktnog kurativnog delovanja etarskih ulja plodovi su prvo inokulisani nanošenjem po 30 µl suspenzije spora koncentracije od 2×10^4 konidija / ml u povrede na plodovima. Plodovi su zatim postavljeni u plastične kutije i inkubirani 4 h pri 25°C u plastičnim kutijama. Nakon inkubacije plodovi su potapani u emulzije ulja u trajanju od 30 s ili je po 30 µl emulzije ulja nanošeno direktno u povrede na plodovima i inkubirani šest dana pri 25°C u plastičnim kutijama. Plodovi inokulisani samo suspenzijom spora bili su pozitivna kontrola, dok su plodovi tretirani emulzijama ulja korišćeni kao negativna kontrola. Po tri ploda je korišćeno u svakom tretmanu i

kontrolama. Posle šest dana meren je prečnik pega u tretmanima i pozitivnoj kontroli, a inhibicija razvoja oboljenja izražena je kao % inhibicije prema formuli: % inhibicije = $[(BC-BT) / BC] \times 100$ [BC-prečnik pega u kontroli (mm); BT-prečnik pega u tretmanu (mm)].

Određivanje organoleptičkih osobina plodova nakon tretmana

Određivanje organoleptičkih osobina je urađeno prema metodi **Karacay and Ayhan (2010)** gde su ocenjivani izgled plodova (5-odličan svež; 4-dobar; 3-prihvatljiv; 2-loš; 1-vrlo loš), aroma (5-prirodna; 4-gubitak arome; 3-nema arome; 2-blago sumnjiva; 1-jako nepoznata aroma), čvrstoća (5-odlična; 4-čvrsta / sočna, 3-prihvatljiva; 2-tvrda; 1-vrlo tvrda), kiselost (5-vrlo dobra; 4-dobra; 3-prihvatljiva; 2-kisela; 1-prekisela), slatkoća (5-veoma slatka; 4-slatka; 3-prihvatljiva; 2-slabo slatka; 1-bljutava), prihvatljivost (5-vrlo dobra; 4-dobra; 3-prihvatljiva; 2-slabo prihvatljiva; 1-neprihvatljiva) od strane sedmoro ljudi.

Analiza hemijskog sastava etarskih ulja pitome nane, geranijuma i timijana

Kvalitativna i kvantitativna analiza uzoraka etarskih ulja vršena je gasnohromatografski uz korišćenje dva tipa detektora. Gasnohromatografska analiza (GC) urađena je na Agilent Technologies gasnom hromatografu, model 7890A, opremljenom split-splitless injektorom povezanim sa HP-5 kolonom (30 m x 0,32 mm, debljine filma 0,25 µm) i plameno-jonizujućim detektorom (FID). Kao noseći gas korišćen je vodonik (1 ml / min / 210°C). Temperatura injektora iznosila je 250°C, detektora 280°C, dok je temperatura kolone menjana u linearnom režimu temperaturskog programiranja od 40-260°C (4°C / min). Isti analitički uslovi korišćeni su i u analizi gasna hromatografija – masena spektrometrija (GC-MS), koja je rađena na HP G 1800C Series II GCD analitičkom sistemu, upotrebom HP-5MS kolone (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), a kao noseći gas korišćen je helijum. Temperatura transfer linije iznosila je 260°C. Maseni spektri snimani su u EI režimu (70 eV), u opsegu m / z 40-400. U svim slučajevima etanolni rastvori uzoraka etarskih ulja (1 µl) injektirani su u split-režimu (1:30). Identifikacija pojedinačnih komponenata vršena je masenospektrometrijski i preko Kovačevih indeksa, uz korišćenje različitih baza masenih spektara (NIST / Wiley), različitih načina pretrage (PBM / NIST / AMDIS) i

raspoloživih literaturnih podataka (Adams, 2007). Za kvantifikacione svrhe procenti površina pikova dobijeni integracijom sa odgovarajućih hromatograma (GC-FID) uzeti su kao osnova.

4.8. Ispitivanje antifungalnog delovanja isparljivih sastojaka tkiva biljaka familije *Brassicaceae* na *Monilinia* spp.

Priprema biljnog materijala

U ispitivanjima su korišćene različite vrste i kultivari biljaka familije *Brassicaceae*: bela slačica (*Sinapis alba* L.), karfiol (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L. cv. Snežna grudva), keleraba (*B. oleracea* var. *gongyloides* L. cv. Bečka plava), kupus (*B. oleracea* var. *capitata* L. cv. Slava), crna rotkva (*Raphanus sativus* L. cv. Zimska crna), bela rotkva (*Raphanus sativus* L. cv. Zimska bela) i brokoli (*B. oleracea* var. *botrytis* L. cv. Korvet).

Setva svih vrsta i sorti je obavljena 15.05.2011. godine u sterilnom supstratu u plastičnim kontejnerima na dubini od oko 0,5 cm. Posejane biljke su gajene u uslovima staklenika i zalivane svakodnevno. Žetva biljnog materijala urađena je dve nedelje posle setve, a zatim su nadzemni delovi biljaka stavljani u obeležene kese i u ručnom frižideru transportovani do laboratorije. U cilju onemogućavanja gubitaka isparljivih komponenti, biljni materijal je smrznut u tečnom azotu i do postupka liofilizacije čuvan pri temperaturi od -80°C. Liofilizovan biljni materijal je mlevenjem u mlinu pretvoren u prah i čuvan u staklenim teglama pri sobnoj temperaturi na tamnom mestu.

Izolati gljiva

U istraživanjima korišćeni su izolati MFSRB-1 *M. fructigena*, MPSRB-20 *M. polystroma*, MFC-1 *M. fructicola* i MLX-13 *M. laxa*. Takođe, testirani su i izolati drugih patogenih prouzrokovaca truleži voća i povrća: *C. acutatum*, *C. gloeosporoides*, *P. expansum*, *B. cinerea* i *Alternaria* sp. iz Laboratorije za postžetvenu fitopatologiju, Katedre za fitopatologiju, Univerziteta u Beogradu-Poljoprivrednog fakulteta u Zemunu.

Ispitivanje antifungalnog delovanja na porast micelije i klijanje konidija

Ispitivanje antifungalnog delovanja isparljivih sastojaka tkiva familije *Brassicaceae* posmatrano je na porast micelije, klijanje konidija i dužinu inicijalnih hifa. Na KDA podloge postavljani su fragmenti micelije ispitivanih izolata gljiva prečnika 5 mm, uzeti sa oboda kolonije starosti pet dana. Na poklopac Petri kutija je zatim nanoseno po 500 mg liofilizovanog biljnog materijala i dodato 3 ml sterilne destilovane vode. Petri kutije su odmah obalepljene sa dva sloja parafilma i inkubirane okrenute na poklopcu pri temperaturi od 27°C. Kontrolni tretman sadržao je sterilnu destilovanu vodu. Porast micelije meren je posle sedam dana. Svaki tretman urađen je u pet ponavljanja. Uticaj isparljivih sastojaka oslobođenih hidrolizom biljnog materijala različitih vrsta i kultivara familije *Brassicaceae* na porast micelije predstavljen je procentom inhibicije prema opisanom postupku.

Ispitivanje antifungalnog delovanja isparljivih sastojaka na klijanje konidija urađeno je na VA podlozi. Nakon iniciranja sporulacije na V8 podlozi, po 100 µl suspenzije spora koncentracije 10^5 konidija / ml je razliveno na VA podlogu, dok je u poklopac Petri kutija nanoseno po 500 mg liofilizovanog biljnog materijala i 3 ml sterilne destilovane vode. Petri kutije su odmah obalepljene sa dva sloja parafilma i inkubirane okrenute na poklopcu pri temperaturi od 27°C. Kontrolni tretman sadržao je samo sterilnu destilovanu vodu. Tretmani, kao i kontrole inkubirani su tokom 24 h pri 27°C, a zatim je određen procenat prokljalih konidija i meren porast inicijalnih hifa. Procenat inhibicije klijanja konidija određen je prema formuli: $\% \text{ inhibicije} = [(KC - KT) / KC] \times 100$ [KC-klijale konidije u kontroli (%); KT-klijale konidije u tretmanu (%)]. Procenat inhibicije porasta inicijalnih hifa određen je prema formuli: $\% \text{ inhibicije} = [(HC - HT) / HC] \times 100$ [HC-porast inicijalnih hifa u kontroli (µm); HT-porast inicijalnih hifa u tretmanu (µm)].

Morfološke promene *Monilinia* spp. pod uticajem isparljivih sastojaka biljnog tkiva familije *Brassicaceae*

Promene u morfologiji hifa odabranih izolata (MFSRB-1 vrste *M. fructigena* i MFC-1 vrste *M. fructicola*) ispitivan je pod uticajem isparljivih sastojaka hidrolize tkiva karfiola i kupusa. Isečki kolonije izolata zasejani su na KDA podlogu i inkubirani četiri dana pri 25°C. Na poklopac Petri kutija je zatim nanoseno po 500 mg liofilizovanog

biljnog materijala i dodato 3 ml sterilne destilovane vode. Petri kutije su odmah oblepljene sa dva sloja parafilma i inkubirane okrenute na poklopcu pri temperaturi od 27°C. Kontrolni tretman sadržao je sterilnu destilovanu vodu. Mikroskopske morfološke odlike posmatrane su svetlosnim mikroskopom Leica DMLS opremljenim digitalnom kamerom Leica DC 300 i softverom IM1000 i skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM). Postupak pripreme uzoraka urađen je prema opisanom postupku (Soylu et al., 2006). Takođe, posmatrane su i morfološke promene na inicijalnim hifama konidija proklizalih pod dejstvom isparljivih sastojaka kupusa pod svetlosnim mikroskopom.

Analiza hemijskog sastava biljnog tkiva vrsta familije *Brassicaceae*

Priprema uzoraka

Autoliza glukozinolata i drugih sastojaka prisutnih u tkivu vrsta familije *Brassicaceae* je vršena po proceduri koju su opisali Radulović et al. (2011). Uzorci svežeg i liofilizovanog biljnog materijala su homogenizovani sa dovoljnom količinom destilovane vode kako bi se dobila polutečna konzistencija smeše. Dietil-etar (20 ml) je dodat svakom uzorku, zatim je nakon zatvaranja staklenih posuda, njihov sadržaj mešan na 200 obrtaja / min u toku 8 h na 25°C. Nakon izvršene hidrolize je dodat natrijum-hlorid i sadržaj je ponovo mešan. Etarski sloj je zatim odvojen od izoljenog vodenog sloja i biljnih ostataka i filtriran kroz Whatman No. 1 filter papir. Ostatak biljne mase je još tri puta ekstrahovan dietil-etrom. Spojeni ekstrakti su sušeni preko anhidrovanog magnezijum-sulfata i koncentrovani u vakumu.

GC-FID i GC-MS analiza

Analiza hemijskog sastava dobijenih autolizata urađena je primenom GC-FID i GC-MS metada. Gasno-hromatografska analiza (GC-FID) autolizata izvršena je na aparatu HP 6890N, na HP-5MS ili DB5 kapilarnoj koloni (5% fenilmetilsiloksan, 30 m × 0,25 mm, debljina filma 0,25 µm, Agilent Technologies, SAD), opremljenim FID detektorom. Kao noseći gas, korišćen je helijum, sa konstantnim protokom od 1 ml / min. Temperaturni uslovi: radna temperatura injektora i detektora 250°C, odnosno 320°C; linearni temperaturni program kolone u opsegu od 70°C-290°C, sa temperaturnim povećanjem od 5°C / min, a zatim izotermalno u trajanju od 10 minuta.

Kao nosiči gas korišćen je helijum 1 ml / min. Injektirano je 1 μ l rastvora uzorka u etru (1 mg u 1 ml dietil-etra) (1:100), u pulsnom “split” modu (40:1), pri protoku od 1,5 ml / min u prvih 30 sekundi, a zatim 1 ml / min do kraja analize. GC-MS analiza je rađena pod istim eksperimentalnim uslovima kao GC-FID analiza. Jonizacija je vršena elektronima energije 70 eV, sa akvizicijom u m / z opsegu 35–650 i skeniranjem na 0,32 s. Procentualni sastav pojedinih komponenata određen je na osnovu površine hromatografskih pikova, bez korišćenja korekcionih faktora. Linearni retencioni indeksi su izračunati u odnosu na retenciono vreme C₉–C₃₀ n-alkana u DB-5MS koloni.

Podaci su obrađeni pomoću MSD ChemStation softvera (ver. D.03.00.611, Agilent Technologies, SAD) u kombinaciji sa AMDIS (ver. 2.68) i NIST MS Search programskim paketom (ver. 2.0d, Nacionalni institut za standarde i tehnologiju (NIST), SAD). AMDIS je korišćen za dekonvoluciju masenih spektara, tj. ekstrakciju čistih masenih spektara iz preklapljenih pikova, dok je NIST MS Search obezbedio algoritam za pretragu biblioteka masenih spektara. Hemijski sastav ispitivanih uzoraka određen je upoređivanjem dobijenih linearnih retencionih indeksa pojedinih komponenata (**Adams, 2007**), izračunatih (**van den Dool et al., 1963**), sa literaturnim vrednostima, poređenjem masenih spektara sa spektrima poznatih jedinjenja iz biblioteka Wiley Registry of Mass Spectral Data 6th Edition, NIST / EPA / NIH Mass Spectral Library 05, Mass Finder 2.3, Adams (Adams, 2007) i lične MS biblioteke (prof. dr. Niko Radulović, Prirodno matematički fakultet, Univerzitet u Nišu), kao i koinjektiranjem standardnih supstanci (alkani, nekoliko terpenoida i aromatična jedinjenja, sintetisana jedinjenja).

4.9. Antagonisti *Monilinia* spp.

4.9.1. Izolacija i identifikacija

Iz dva ploda jabuke, sorte Ajdared i Zlatni Delišeš, obavljena je izolacija gljive na KDA podlogu. Plod jabuke sorte Ajdared poreklom iz Bele Crkve, iz kog je prethodno dobijen izolat MPSRB-21 vrste *M. polystroma*, posle tri meseca čuvanja promenio je izgled od simptoma smeđe truleži i bio potpuno crne boje. Plod jabuke sorte Zlatne Delišeš iz kog je obavljena izolacija bio je poreklom iz Grocke i ispoljavao je simptom smeđe truleži. Za izolaciju, plodovi su površinski sterilisani 70% etanolom, a zatim su fragmenti tkiva iz tkiva ispod pokožice ploda prebacivani na KDA podlogu i inkubirani pri 25°C sedam dana u uslovima veštačke smene svetla i tame (12 h svetlo / 12 h tama). Čiste kulture izolata su dobijene presejavanjem fragmenata podloge sa micelijom na nove KDA podloge.

Provera patogenosti dobijenih izolata obavljena je veštačkom inokulacijom plodova jabuke sorte Ajdared prema opisanom postupku. Sa veštački inokulisanih plodova jabuke na kojima su se pojavili simptomi smeđe truleži reizolovana je gljiva na KDA podlogu, a zatim su dobijene kulture vrha hife.

Identifikacija dobijenih izolata urađena je na osnovu makroskopskih morfoloških osobina (izgled kolonija, obod, boja, kao i pigmentacija podloge) na KDA podlozi u uslovima veštačke smene svetla i tame (12 h svetlo / 12 h tama) pri 25°C posle 10 dana inkubacije. Za identifikaciju izolata do nivoa roda korišćen je ključ prema **Dumont (1971)**.

Molekularna identifikacija dobijenih izolata urađena je na osnovu ITS1-5.8S-ITS2 rDNA regiona. Ekstrakcija nukleinskih kiselina ispitivanih izolata urađena je po metodi **Day and Shattock (1997)** iz sedam dana starih kultura gajenih na KDA podlozi. PCR metoda je urađena korišćenjem univerzalnih ITS1 / ITS4 prajmera (**White et al., 1990**). Dobijeni amplikoni su prečišćeni korišćenjem mi-PCR Purification Kit (Metabion International AG, Germany) po uputstvu proizvođača. Prečišćeni PCR produkti su sekvencirani u oba smera (<http://dna.macrogen.com>, Korea) i dobijene sekvence su spojene u programu Pregap4 u okviru Staden paketa (**Staden et al., 2000**), posle čega su im određene konzensus nukleotidne sekvence. Poređenje sličnosti dobijenih sekvenci sa sekvencama u NCBI bazi podataka urađena je korišćenjem

MegaBlast algoritma. Dobijene sekvence su deponovane u GenBank bazu podataka gde su im dodeljeni pristupni brojevi.

4.9.2. Ispitivanje antagonističkog dejstva dobijenih izolata prema *Monilinia* spp.

Postupak ispitivanja antagonističkog dejstva dobijenih izolata gljiva prema odabranim izolatima *Monilinia* spp. urađen je na KDA podlozi. Iz 5 dana starih kultura, na KDA podloge nanošena su dva fragmenta kolonije, jedan ispitivanog izolata antagoniste i drugi izolata *Monilinia* vrste. Fragmenti su bili veličine 6 mm i postavljeni su na udaljenosti od 55 mm. Kontrola je sadržala samo fragment kolonije izolata *Monilinia* spp. Posle sedam dana inkubacije meren je prečnik kolonije izolata *Monilinia* spp. Procenat inhibicije porasta micelije izolata *Monilinia* spp. pod uticajem ispitivanih izolata gljiva u odnosu na kontrolu izračunavan je prema formuli (Skidmore et al., 1976; loc cit Koersten et al., 1995) $\% \text{ inhibicije} = [(KR - R1) / KR] \times 100$ [KR-poluprečnik kolonije od ivice fragmenta do oboda kolonije u kontroli (mm); R1-poluprečnik kolonije od ivice fragmenta do oboda kolonija u pravcu kolonije antagoniste (mm)]. Antagonističko delovanje dobijenih izolata gljiva prema izolatima *Monilinia* spp. posmatrano je i makroskopski posle tri nedelje inkubacije.

Upotrebom skenirajuće elektronske mikroskopije posmatrane su promene u morfologiji hifa izolata antagonista i izolata *Monilinia* spp. gajenih zajedno na KDA podlozi. Za ova ispitivanja fragmenti micelije izolata antagonista i *Monilinia* spp. veličine 5 mm postavljeni su Petri kutije sa KDA podlogom na međusobnoj udaljenosti od 30 mm. Posle inkubacije od sedam dana pri 22°C fragmenti micelije su isecani i pripremljeni za posmatranje skenirajućim elektronskim mikroskopom po postupku opisanom u poglavlju: „Proučavanje morfoloških osobina izolata *Monilinia* spp.“.

4.9.3. Ispitivanje ekoloških, odgajivačkih i patogenih osobina dobijenih izolata

Kod dobijenih izolata ispitivane su ekološke osobine na osnovu brzine porasta kolonija u različitim uslovima osvetljenja i pri različitim temperaturama. Među odgajivačkim osobinama ispitivana je brzina porasta kolonija izolata na različitim hranljivim podlogama i na podlogama različite pH vrednosti, dok je od patogenih osobina ispitivana virulentnost izolata na plodovima različitih sorti jabuke.

Ispitivanje uticaja različitih uslova osvetljenja na porast kolonije izolata

Uticaj različitih uslova osvetljenja na porast ispitivanih izolata proučavan je pri sledećim uslovima: a) 12 svetlo h / 12 h tama; b) 12 h UV svetlo / 12 h tama; c) tama. Za ova ispitivanja u centar Petri kutije sa KDA podlogom zasejan je isečak kolonije prečnika 5 mm. Korišćene su pet dana stare kulture ispitivanih izolata gajene na KDA podlozi. Porast je praćen svakodnevno u periodu od sedam dana, merenjem prečnika kolonije i izračunat je prosečan dnevni porast. Ogled je postavljen u pet ponavljanja.

Ispitivanje uticaja temperature na porast kolonije izolata

Za ispitivanje uticaja temperature na porast kolonija izolata korišćene su kulture stare pet dana gajene na KDA podlozi. U centar Petri kutije sa KDA podlogom zasejavan je isečak kolonije izolata prečnika 5 mm i zatim su inkubirane pri temperaturama od 5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C i 30°C u tami. Porast kolonije pri različitim temperaturama praćen je svakodnevno merenjem prečnika kolonije, u periodu od sedam dana i izračunavan je kao prosečan dnevni porast. Zasejane podloge su inkubirane pri sobnoj temperaturi u tami. Ogled je postavljen u pet ponavljanja.

Ispitivanje uticaja različitih podloga na porast kolonije izolata

Uticaj različitih podloga na porast i sporulaciju izolata antagonista proučavan je na podlogama MEA, AJA, KDA, CYA i V8 podlozi. Zasejavanje podloga urađeno je nanošenjem isečaka kolonija izolata prečnika 5 mm iz pet dana starih kultura gajenih na KDA podlozi, u centar Petri kutije. Porast kolonija na različitim hranljivim podlogama praćen je svakodnevno, merenjem prečnika kolonije u periodu od sedam dana i izračunavan je prosečan dnevni porast. Zasejane podloge su inkubirane pri sobnoj temperaturi u tami. Ogled je postavljen u pet ponavljanja.

Ispitivanje uticaja pH vrednosti podloge na porast kolonije izolata

Ispitivanje uticaja pH vrednosti podloge na porast ispitivanih izolata, proučavano je na KDA podlozi čija je pH posle sterilizacije, sa 0,1N HCl i 0,1N NaOH podešena do vrednosti pH 3, 4, 5, 6, 7, 8 i 9. Očitavanje i podešavanje pH vrednosti podloge vršena su pomoću pH-metra (Universalindikator, pH 0-14 Merck, Germany). Zasejavanje izolata na ovako pripremljenu podlogu urađeno je prenošenjem isečaka

micelije prečnika 5 mm uzetih sa oboda kolonija iz pet dana gajenih na KDA podlozi, u centar Petri kutija. Zasejane podloge su inkubirane pri sobnoj temperaturi u tami. Ogled je postavljen u pet ponavljanja.

Proučavanje virulentosti ispitivanih izolata

Virulentnosti ispitivanih izolata obavljeno je veštačkom inokulacijom plodova jabuke sorti: Ajdared, Zlatni Delišeš i Greni Smit prema metodi **van Leeuwen et al. (2002)**. Za inokulaciju su korišćeni izolati odgajeni pet dana na KDA podlozi u uslovima tame. Plodovi jabuke su prvo površinski dezinfikovani potapanjem u 1% rastvoru NaOCl u trajanju od 1 min, a zatim su isprani dva puta u sterilnoj destilovanoj vodi i ostavljeni da se prosuše na vazduhu. Na površini ploda sterilnim bušačem su napravljene povrede (prečnika 6 mm i dubine 5 mm), a zatim su isečci micelije zajedno sa podlogom prečnika 5 mm uzeti sa oboda kultura i uneseni u otvore na plodovima i zatvoreni isečkom ploda. Kontrolni plodovi inokulisani su isečkom sterilne KDA podloge. Inokulisani i kontrolni plodovi inkubirani su u plastičnim kontejnerima pri temperaturi od 22°C u uslovima visoke relativne vlažnosti (95-100%) i veštačke smene svetla i tame (14 h svetlo / 10 h tama). Prečnik pega meren je posle pet dana inkubacije. Korišćeno je po šest plodova po sorti i po izolatu za inokulaciju i u kontroli.

4.10. Statistička analiza

Razlika u porastu micelije ispitivanih vrsta testirane su jednofaktorskom analizom varijanse i Student t-testom, dok su razlike u porastu micelije izolata testirane Tukey HSD testom. Ispitivanje uticaja podloge na kojoj su odgajani izolati (V8 podloga i inokulisani plodovi jabuke) na dužinu i širinu konidija urađeno je multivariacionom analizom. Razlike u dužini i širini konidija između vrsta testirane Student-t testom, a razlike u dužini i širini između izolata Tukey HSD testom. Razlike u ukupnoj dužini inicijalnih hifa i dužini inicijalnih hifa do prvog grananja između vrsta testirane su jednofaktorskom analizom varijanse i Student-t testom, dok su razlike između izolata testirane Tukey HSD testom. Razlike između izolata u odgajivačkim i ekološkim osobinama testirane su jednofaktorskom analizom varijanse i Tukey HSD testom, dok su vrednosti intenziteta sporulacije prvo transformisane u logaritme, a zatim statistički obrađene na isti način. Virulentnost je testirana dvofaktorskom analizom varijanse,

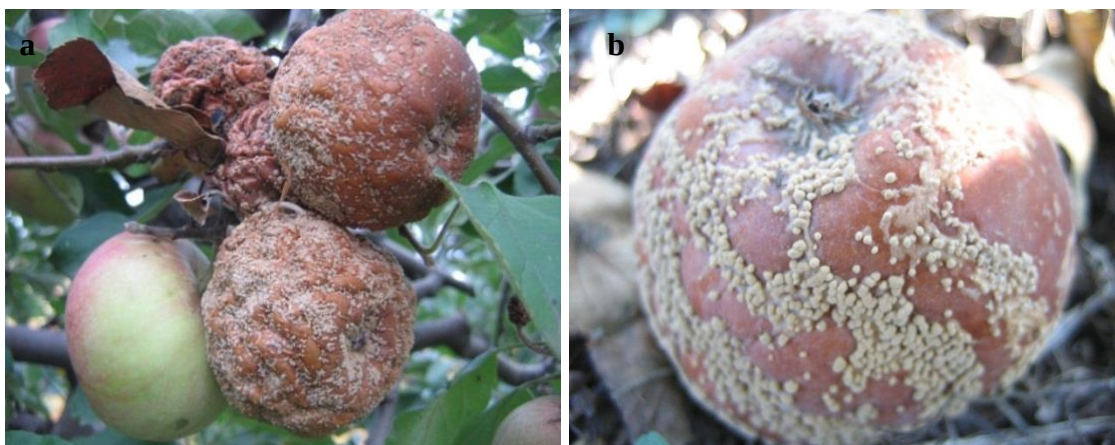
ispitujući uticaj sorte i vrste na veličinu pege inokulisanih plodova. Za ispitivanje intenziteta sporulacije na inokulisanim plodovima dobijene vrednosti su prvo pretvorene u logaritme, a zatim statistički obrađene jednofaktorskom analizom varijanse i Tukey HSD testom. Ispitivanje antifungalnog delovanja ulja, tkiva biljaka porodice *Brassicaceae* kao i delovanja antagonističkih gljiva urađeno je jednofaktorskom analizom varijanse i Tukey HSD testom. Ispitivanje antifungalnog delovanja tkiva ispitivanih vrsta porodice *Brassicaceae* na klijanje konidija, kao i porasta micelije izolata urađeno je jednofaktorskom analizom varijanse i Student-t testom. Dobijene vrednosti su prvo transformisane u arkus sinus (arcsin), a zatim statistički obrađene. Dodatno ispitivanje uticaja sastojaka nastalih hidrolizom tkiva ispitivanih vrsta porodice *Brassicaceae* na klijanje konidija, kao i porasta micelije izolata obavljeno je multivariacionom analizom. Statistička analiza je urađena korišćenjem programa SPSS, ver 17.0 programa, STATGRAPHICS Centurion, StatPoint, 2005 i XLSTAT Program (version 2009.3.02. Addinsoft, Thierry Fahmy, France). Statistička analiza svih podataka je urađena na nivou značajnosti $p < 0,001$ i $p < 0,05$.

5. REZULTATI

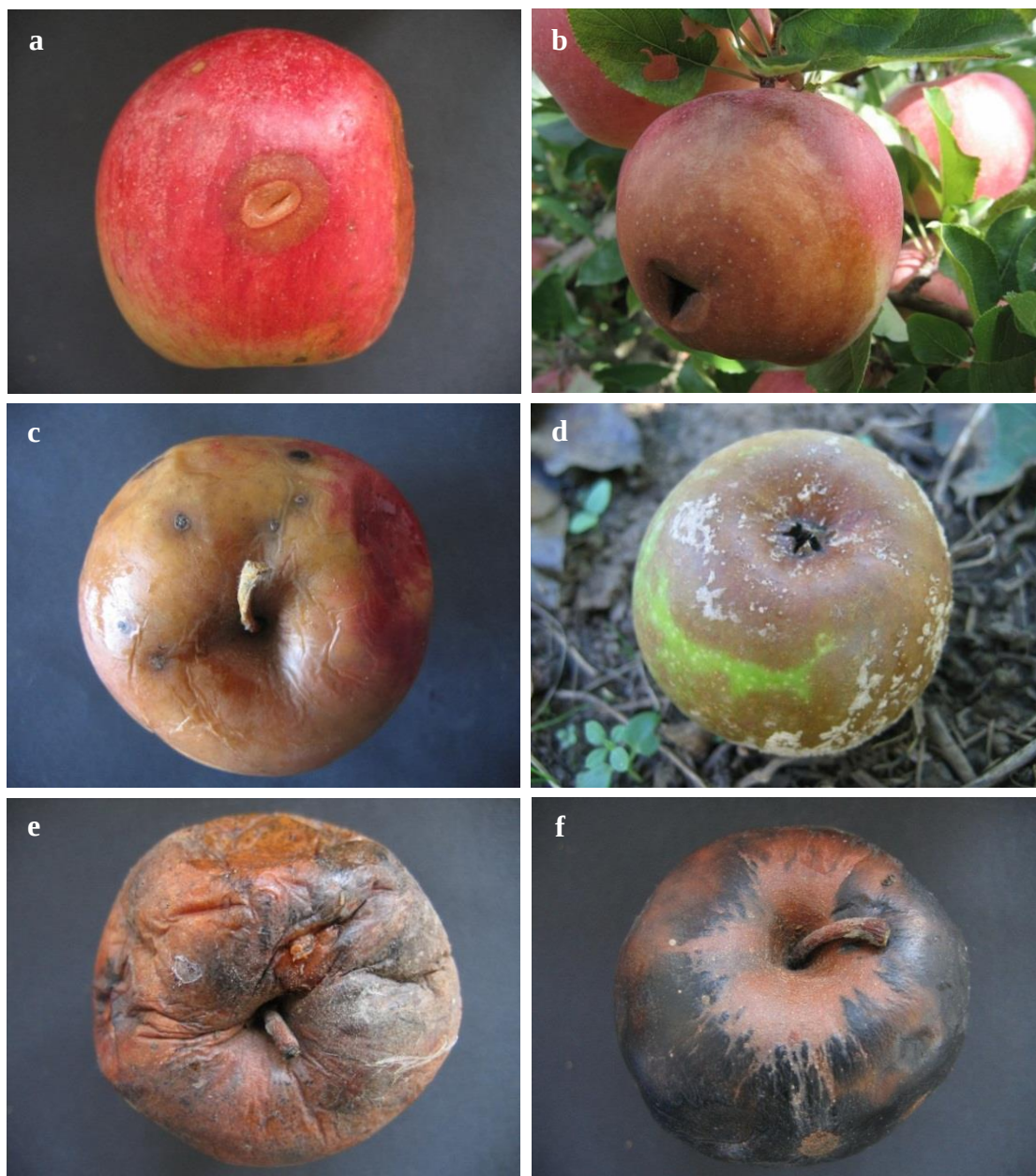
5.1. Simptomi bolesti

Simptomi bolesti na plodovima prikupljenim u voćnjaku

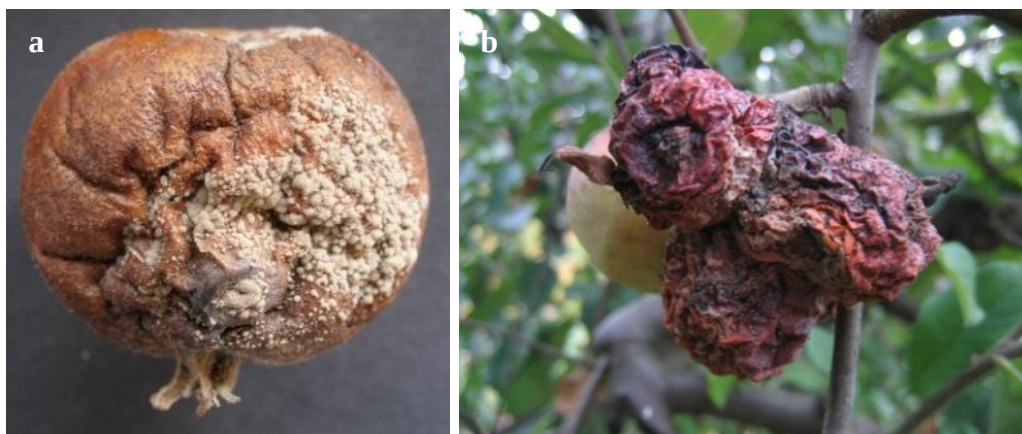
Najkarakterističniji i najučestaliji simptom na sakupljenim plodovima jabuke bio je smeđa trulež koja je potpuno zahvatila plod sa obrazovanim sporodohijama svetložute boje na površini zaraženog tkiva (Slika 2 a, b i Slika 4 a). Simptomi na plodovima su bili i u vidu pega smeđe boje i ravnog oboda (Slika 3 a), smeđe truleži koja je delimično ili potpuno zahvatila plod, bez vidljivih znakova oboljenja na površini zaraženog tkiva (Slika 3 b, c). Na plodovima potpuno zahvaćenim oboljenjem uočena je i pojava beličaste micelije na površini zaraženog tkiva (Slika 3 d). Na nekim sakupljenim plodovima gde je smeđa trulež potpuno zahvatila tkivo uočena je i sporadična pojava crnila (Slika 3 e), ili su zaraženi plodovi bili potpuno crne boje (Slika 3 f). U voćnjacima uočeni su i mumificirani plodovi jabuka (Slika 4 b).



Slika 2. Smeđa truleži sa prisustvom sporodohija na plodovima jabuke sorte Ajdared (a) i Zlatni Delišeš (b).



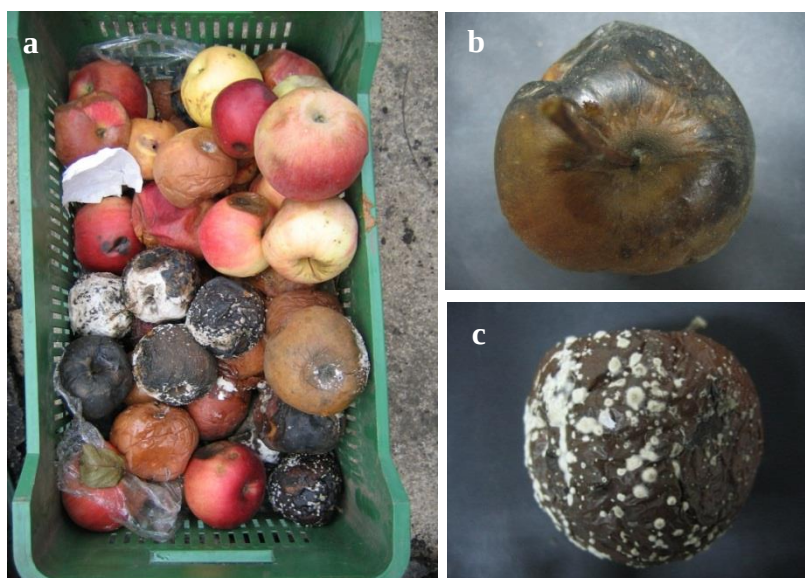
Slika 3. Simptomi bolesti na plodovima jabuka sakupljenim u voćnjacima: a-početna faza bolesti u vidu pege smeđe boje i pravilnih ivica na sorti Ajdared; b-trulež smeđe boje je zahvatila polovinu ploda sorte Ajdared; c-trulež smeđe boje je zahvatila ceo plod sorte Ajdared; d-trulež smeđe boje je zahvatila ceo plod sorte Greni Smit; e-trulež smeđe boje je zahvatila ceo plod sorte Ajdared uz sporadičnu pojava simptoma crnila; f-crni plodovi sorte Ajdared.



Slika 4. Intenzivno formiranje masa spora kremaste boje raspoređenih na površini potpuno zaraženih plodova jabuka sorte Elstar (a) i mumificirani plodovi jabuke sorte Ajdared (b).

Simptomi bolesti na plodovima prikupljenim u skladištu

Najčešći simptom bolesti plodova jabuke u skladištima bila je pojava crnih plodova (Slika 5 a, b, c). Osim ovog simptoma, plodovi su ispoljavali i simptome smeđe do tamno smeđe truleži. Na površini zaraženog tkiva bile su uočljive micelijske skupine bele boje ili beličasta micelija koja je delimično ili potpuno prekrivala plod (Slika 5 a, c).



Slika 5. Crnilo i smeđa trulež na plodovima jabuke tokom čuvanja u skladištima (a, c- sorta Ajdared; b-sorta Zlatni Delišes).

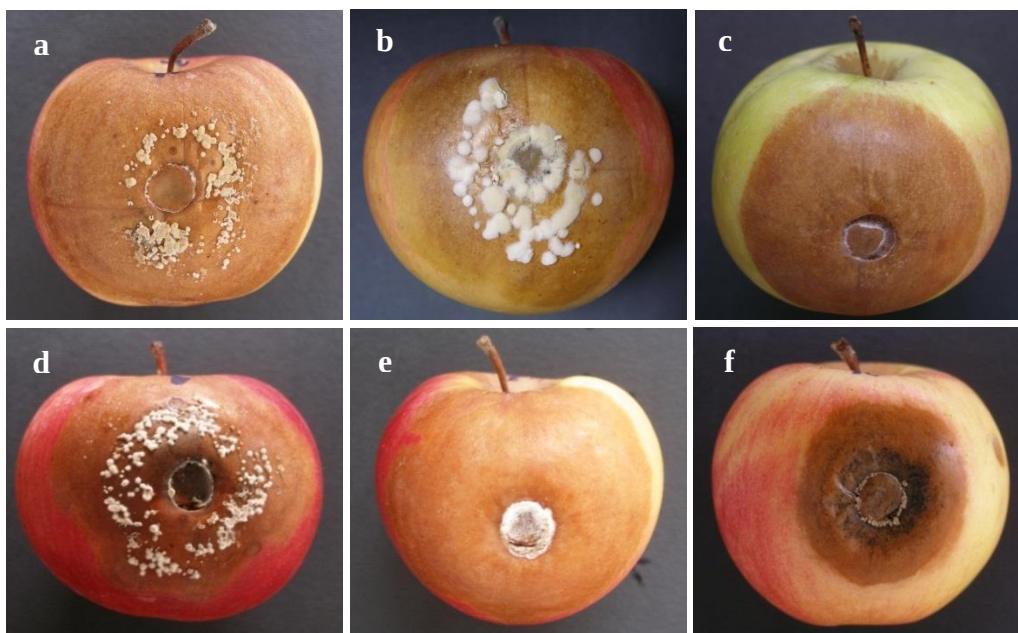
5.1.1. Dobijeni izolati *Monilinia* spp. i provera patogenosti

Iz sakupljenih plodova jabuke sa simptomima smeđe truleži i crnila iz voćnjaka i skladišta dobijeni su izolati gljiva koji su nakon izolacije na KDA podložili ispoljili morfološke karakteristike *Monilinia* vrsta. Ukupno je dobijeno 349 izolata, od toga 291 izolat iz vegetacije i 58 izolata iz skladišta (Tabela 7).

Tabela 7. Dobijeni izolati *Monilinia* spp. iz voćnjaka i skladišta plodova jabuke

Lokalitet	Broj dobijenih izolata	
	Vegetacija	Skladište
Svilajnac	71	15
Topola	22	0
Bela Crkva	65	9
Ruma	49	0
Grocka	27	13
Smederevo	57	21
Ukupno	291	58
	349	

Na svim plodovima jabuke sorte Ajdared inokulisanim izolatima *Monilinia* spp. pojavili su se simptomi u vidu pege smeđe boje oko mesta inokulacije (Slika 6 a-f). Pega je bila okruglog oblika, ravnog do blago talasastog oboda sa prisustvom micelije ili reproduktivnih struktura gljiva. Na inokulisanim plodovima na površini zaraženog tkiva pojavile su se sporodohije žućkaste boje (Slika 6 a, b, d) ili su se obrazovale sakupine micelije beličaste boje sa oskudnom sporulacijom patogena oko mesta inokulacije (Slika 6 e). Neki izolati su obrazovali mase spora sivkaste boje oko mesta inokulacije, koje je bilo crne boje (Slika 6 f). Na kontrolnim plodovima nije došlo do pojave simptoma.



Slika 6. Simptomi smeđe truleži na plodovima jabuke sorte Ajdared inokulisanim izolatima *Monilinia* spp.: a, b, d-sporodohije na inokulisanim plodovima; c-simptom truleži na inokulisanom plodu; e-micelija patogena oko mesta inokulacije; f-sporulacija oko mesta inokulacije.

5.1.2. Morfološka identifikacija

Nakon reizolacije dobijeni su monosporijalni izolati. Na V8 podlozi kod većine izolata uočeno je obrazovanje jednoćelijskih konidija u lancima. Na osnovu ispoljenih morfoloških makroskopskih osobina na KDA podlozi dobijeni izolati su svrstani u pet grupa.

Prva grupa od 236 monosporijalnih izolata obrazovala je beličastu oskudno razvijenu vazдушnu miceliju, ravnog do talasastog oboda. U kulturama ove grupe izolata nije uočena sporulacija (Slika 7 a-c). Na naličju Petri kutija kolonija je bila beličasto do braonkasto obojena (Slika 7 d-f).

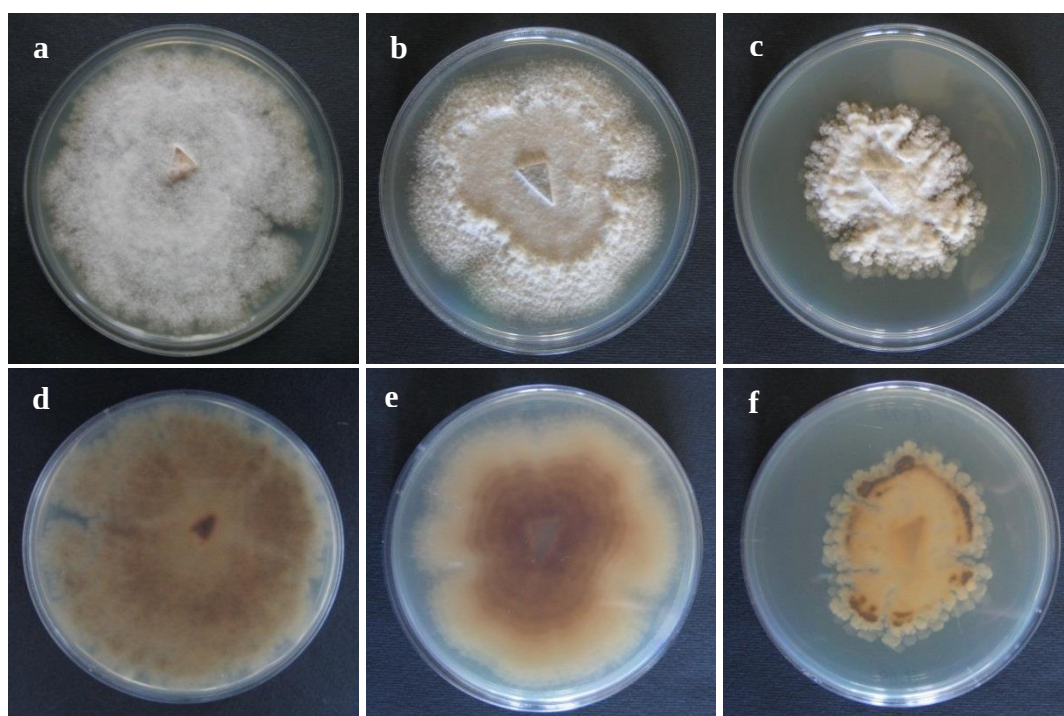
Druga grupa od 33 izolata obrazovala je beličastu do sivkastu koloniju ravnog oboda, dok je vazдушna micelija bila oskudno razvijena. U kulturama ove grupe izolata nije uočena sporulacija (Slika 8 a-c). Na naličju Petri kutija uočeno je tamnjenje micelije i sporadično obrazovanje stromatičnih tvorevina crne boje (Slika 8 d-f).

Treća grupa od 50 izolata obrazovala je sivkastu koloniju ravnog oboda, dok je vazдушna micelija bila oskudno razvijena. U kulturama ove grupe izolata nije uočena sporulacija (Slika 9 a-c). Na naličju Petri kutija uočeno je tamnjenje micelije i

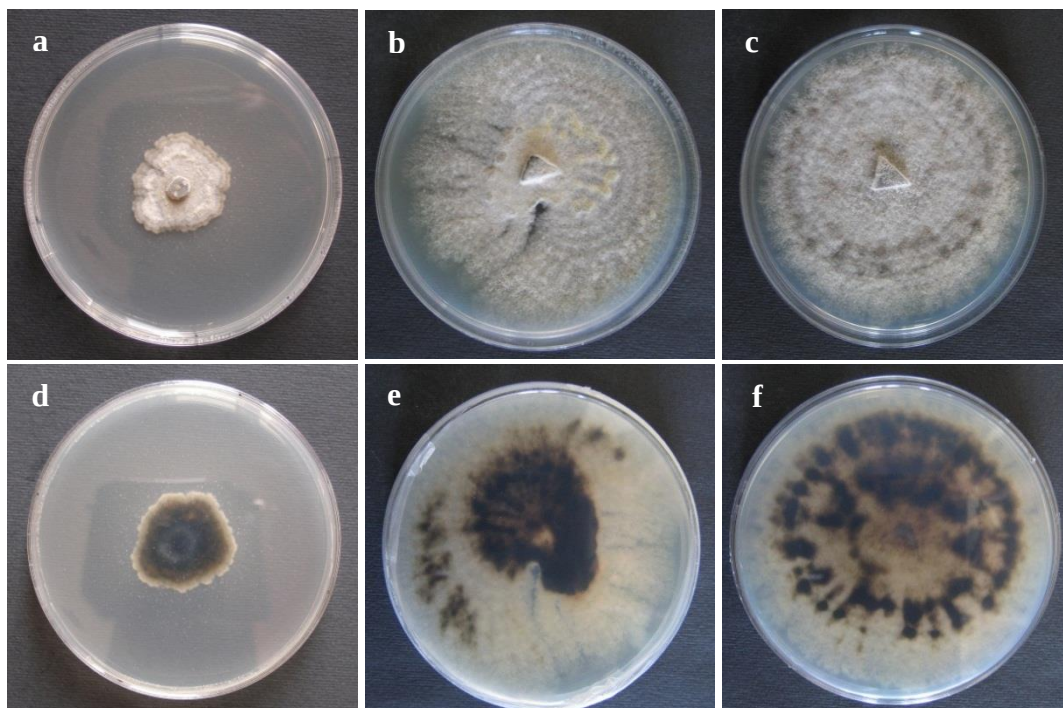
intenzivno obrazovanje stromatičnih tvorevina crne boje raspoređenih u pravilnim koncentričnim krugovima (Slika 9 d-f).

Četvrta grupa od 19 izolata obrazovala je beličastu do sivkastu vazдушnu miceliju oblika rozete i reznjevitog oboda. U kulturama ove grupe izolata nije uočena sporulacija (Slika 10). Na naličju Petri kutija uočeno je blago tamnjenje micelije bez formiranja stromatičnih tvorevina patogene.

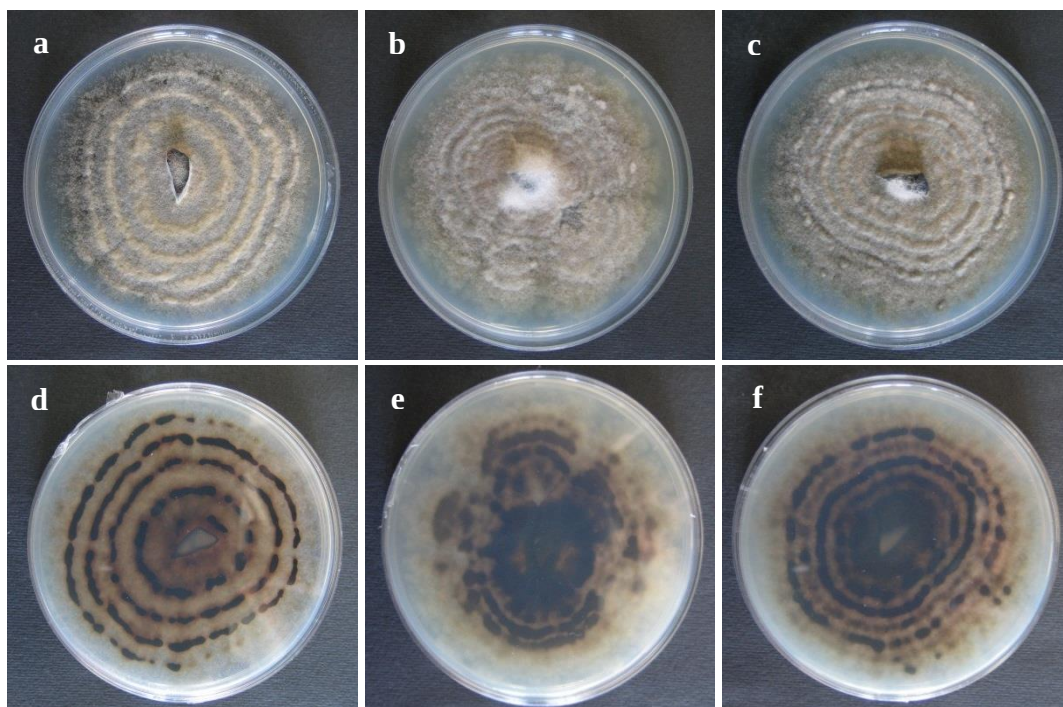
Peta grupa od 13 izolata obrazovala je kolonije kremaste boje, ravnih ivica, dok su mase spora sivkaste boje bile obrazovane na vazdušnoj miceliji kolonije (Slika 11 a, b). Na naličju kolonija nije uočena pigmentacija i obrazovanje stromatičnih tvorevina (Slika 11 c, d).



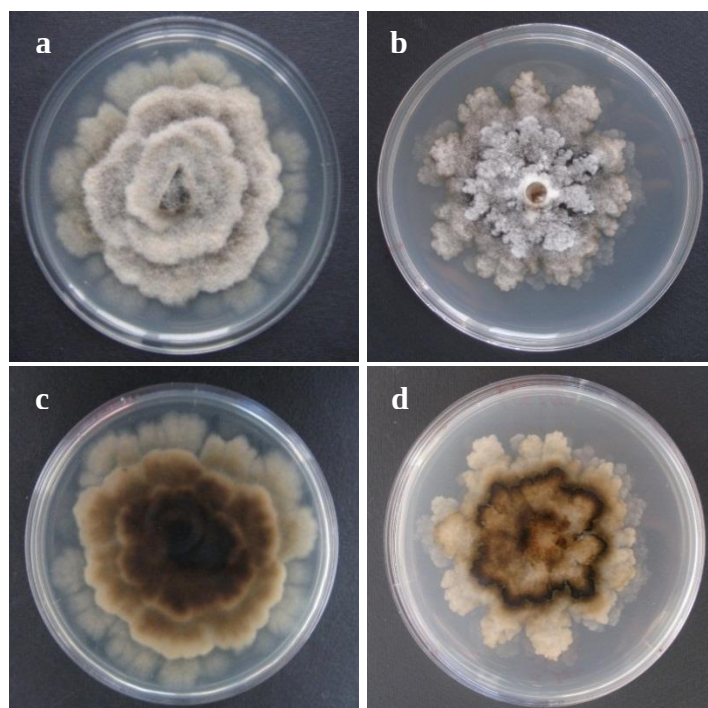
Slika 7. Izgled kolonija prve grupe izolata na KDA podlozi (a, b, c-lice kolonija; b, e, f-naličje kolonija).



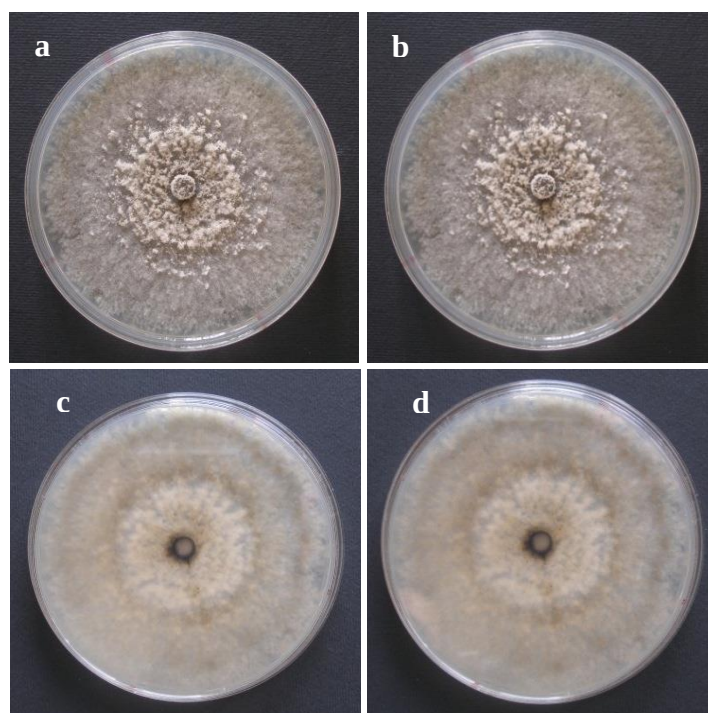
Slika 8. Izgled kolonija izolata druge grupe izolata na KDA podlozi (a, b, c-lice kolonija; d, e, f-naličje kolonija).



Slika 9. Izgled kolonija treće grupe izolata na KDA podlozi (a, b, c-lice kolonija; d, e, f-naličje kolonija).



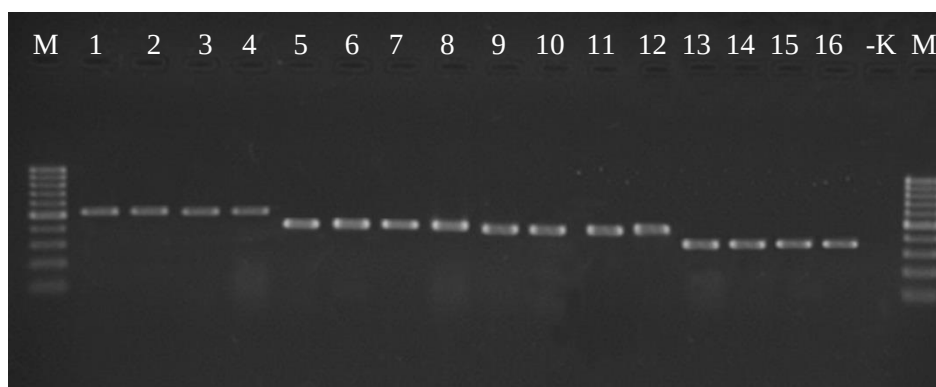
Slika 10. Izgled kolonija četrte grupe izolata na KDA podlozi (a, b-lice kolonija; c, d-naličje kolonija).



Slika 11. Izgled kolonija pete grupe izolata na KDA podlozi (a, b-lice kolonija; c, d-naličje kolonija).

5.1.3. Molekularna detekcija izolata *Monilinia* spp.

Primenom Multiplex PCR metode ampliconi veličine oko 402 bp specifični za *M. fructigena* dobijeni su kod izolata prve i druge grupe, dok su ampliconi veličine 425 bp specifični za vrstu *M. polystroma* dobijeni kod izolata treće grupe. Ampliconi veličine oko 351 bp specifični za vrstu *M. laxa* dobijeni su kod izolata četvrte grupe, dok su ampliconi veličine oko 535 bp specifični za vrstu *M. fructicola* dobijeni kod izolata pete grupe (Slika 12). Kod negativne kontrole nije došlo do amplifikacije.



Slika 12. 1,5 % agarozni gel sa ampliconima veličine 535, 425, 402 i 351 bp dobijenih Multiplex PCR metodom (Cote et al., 2004). M-marker 100 bp; 1, 2, 3, 4-izolati *M. fructicola*; 5, 6, 7, 8-izolati *M. polystroma*; 9, 10, 11, 12-izolati *M. fructigena*; 13, 14, 15, 16-izolati *M. laxa*; -K-negativna kontrola.

Izolati koji su po makroskopskim morfološkim odlikama svrstani u prvu i drugu grupu na osnovu molekularnih osobina identifikovani su kao *M. fructigena*, izolati treće grupe kao *M. polystroma*, izolati četvrte grupe kao *M. laxa*, a izolati pete grupe kao *M. fructicola*.

5.1.4. Odabir izolata *Monilinia* spp. za dalja proučavanja

Za dalju karakterizaciju odabrani su izolati *Monilinia* spp. na osnovu različitog geografskog porekla, variranja u morfološkim osobinama, kao i pripadnosti vrstama (Tabela 8). Takođe, uključeni su i referentni izolati *M. fructigena* (MCG), *M. laxa* (C-28 i PD20.96), *M. fructicola* (a-100) i *M. polystroma* (0603202046).

Tabela 8. Odabrani izolati *Monilinia* spp. iz plodova jabuke.

Vrsta	Oznaka izolata	Lokalitet	Sorta	Godina izolacije
<i>M. fructigena</i>	MFSRB-1	Svilajnac	Zlatni Delišeš	2010
<i>M. fructigena</i>	MFSRB-10	Bela Crkva	Zlatni Delišeš	2011
<i>M. fructigena</i>	MFSRB-17	Grocka	Ajdared	2011
<i>M. fructigena</i>	MFSRB-2	Grocka	Zlatni Delišeš	2010
<i>M. fructigena</i>	MFSRB-32	Svilajnac	Ajdared	2011
<i>M. fructigena</i>	MFSRB-6	Svilajnac	Ajdared	2011
<i>M. fructigena</i>	MFSRB-3	Topola	Zlatni Delišeš	2011
<i>M. fructigena</i>	MFSRB-22	Bela Crkva	Zlatni Delišeš	2011
<i>M. fructigena</i>	MFSRB-6SD	Smederevo	Zlatni Delišeš	2011
<i>M. fructigena</i>	MFSRB-8SD	Smederevo	Zlatni Delišeš	2011
<i>M. polystroma</i>	MPSRB-20	Bela Crkva	Ajdared	2011
<i>M. polystroma</i>	MPSRB-2G	Bela Crkva	Greni Smit	2012
<i>M. polystroma</i>	MPSRB-13	Bela Crkva	Zlatni Delišeš	2011
<i>M. polystroma</i>	MP-13	Bela Crkva	Ajdared	2011
<i>M. polystroma</i>	MPSRB-3	Bela Crkva	Ajdared	2011
<i>M. polystroma</i>	MPSRB-2	Bela Crkva	Ajdared	2011
<i>M. polystroma</i>	MPSRB-36	Bela Crkva	Ajdared	2011
<i>M. polystroma</i>	MPSRB-6	Bela Crkva	Ajdared	2012
<i>M. polystroma</i>	MPSRB-21	Bela Crkva	Ajdared	2011
<i>M. laxa</i>	MLX-SV1	Svilajnac	Ajdared	2010
<i>M. laxa</i>	MLX-7	Svilajnac	Ajdared	2011
<i>M. laxa</i>	MLX-13	Smederevo	Zlatni Delišeš	2011
<i>M. laxa</i>	MLX-24	Ruma	Elstar	2011
<i>M. fructicola</i>	MFC-1	Smederevo	Zlatni Delišeš	2011
<i>M. fructicola</i>	MFC-28	Ruma	Elstar	2011
<i>M. fructicola</i>	MFC-20	Grocka	Zlatni Delišeš	2011
<i>M. fructigena</i> *	MCG	Italija	kruška	nd
<i>M. polystroma</i> *	0603202046	Japan	jabuka	nd
<i>M. laxa</i> *	PD20.96	Holandija	šljiva	1996
<i>M. laxa</i> *	C-28	Italija	breskva	nd
<i>M. fructicola</i> *	a-100	Italija	breskva	nd

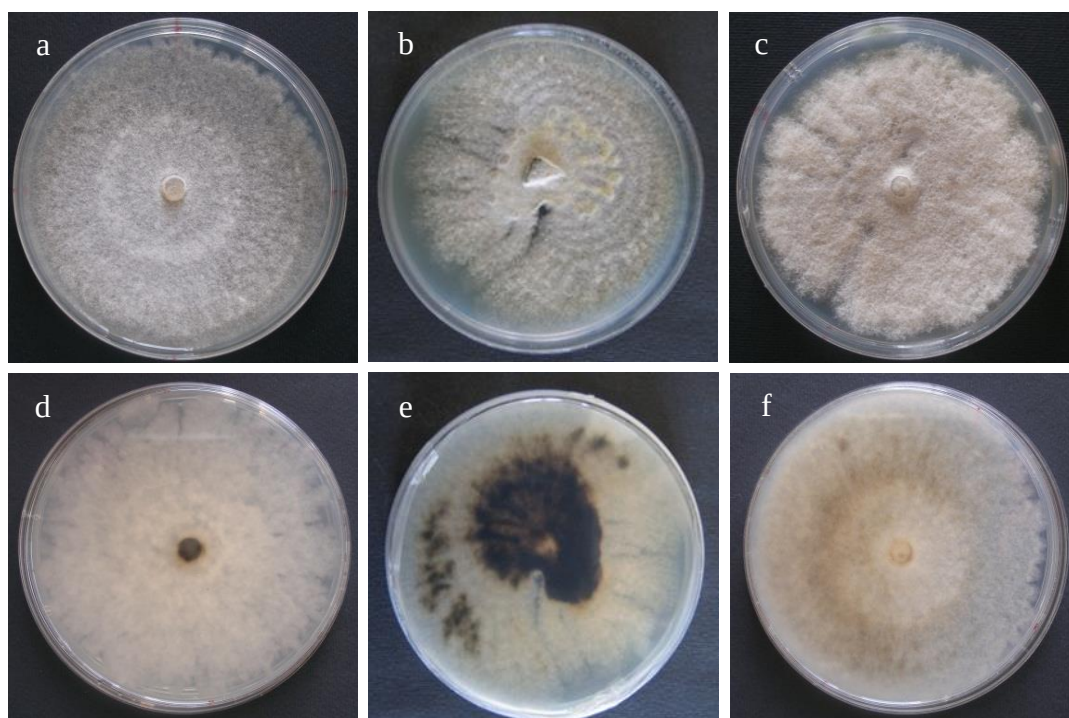
*Referentni izolati iz različitih domaćina.

5.2. Morfološka karakterizacija izolata *Monilinia* spp.

5.2.1. Makroskopske osobine i brzina porasta kolonije *Monilinia* spp.

Kolonije *M. fructigena* su bile beličaste do sivkaste boje, ravnog do blago talasastog oboda bez vidljive sporulacije gljive, dok je vazдушna micelija bila oskudno razvijena na KDA podlozi (Slika 13 a, b, c). Na naličju Petri kutija kolonije nisu imale pigmentaciju (Slika 13 d). Kolonije izolata MFSRB-6, MFSRB-32 i MFSRB-6SD su

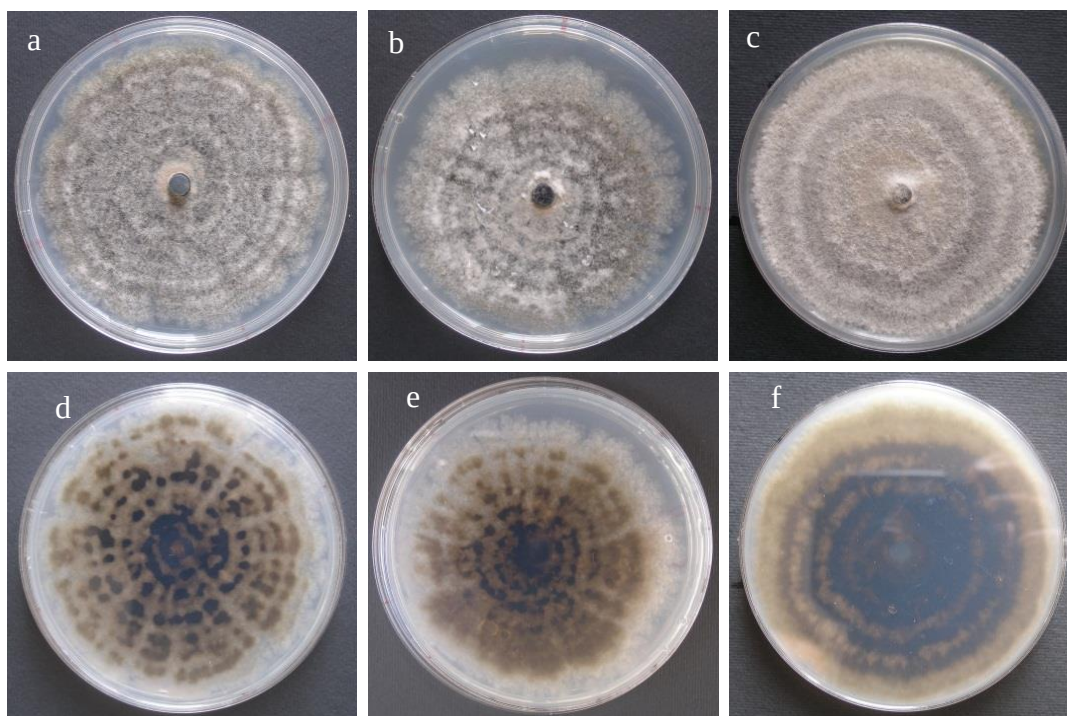
ispoljile variranje u odnosu na ostale izolate, jer su na naličju Petri kutija kolonije bile crno obojene i obrazovale su se neravno raspoređene stromatične tvorevine (Slika 13 e). Referentni izolat MCG, poreklom iz Italije, obrazovao je koloniju sličnog izgleda kao i izolati poreklom iz Srbije, bez formiranja stromatičnih tvorevinama u kulturi (Slika 13 c, f). Prosečan dnevni porast kolonije za vrstu iznosio je 6,84 mm, međutim izolati su ispoljili značajno variranje u porastu. Najsporiji prosečni dnevni porast micelije od 1,63 mm ispoljio je izolat MPSRB-6, dok je najbrži prosečan dnevni porast od 11,67 mm ispoljio je izolat MFSRB-17. Prosečni dnevni porast ostalih izolata iznosio je od 3,5-10,62 mm, a referentnog izolata MCG iznosio je 13,19 mm.



Slika 13. Kolonije izolata *M. fructigena* na KDA podlozi: izolat MFSRB-1 (a-lice, d-naličje), izolat MFSRB-6 (b-lice, e-naličje) i referentni izolat MCG (c-lice kultura, f-naličje).

Izolati *M. polystroma* nisu ispoljili variranje u izgledu kolonija na KDA podlozi (Slika 14). Kolonije su bile sivkasto obojene, dok je obod bio ravni ivica, bez vidljive sporulacije. Vazдушna micelija je bila oskudno razvijena i bila je vidljiva zoniranost kolonije, dok je supstratna micelija bila gusto isprepletana i konzistentne strukture (Slika 14 a, b i Slika 15). U centralnom delu kolonija na naličju Petri kutija posle šest do osam dana inkubacije uočeno je tamnjenje micelije i formiranje sitnih stromatičnih

tvorevina obliku koncentričnih krugova (Slika 14 d, e). Referentni izolat 0603202046 je obrazovao koloniju sličnog izgleda kao i izolati poreklom iz Srbije (Slika 14 c, f). Prosečan dnevni porast kolonija za vrstu iznosio je 7,79 mm. Najsporiji prosečni porast kolonije od 4,83 mm ispoljio je izolat MPSRB-21, dok je najbrži prosečan dnevni porast micelije od 9,5 mm ispoljio izolat MPSRB-2. Prosečan dnevni porast ostalih izolata iznosio je od 6,75-8,91 mm. Prosečan dnevni porast micelije referentnog izolata iznosio je 11,25 mm.

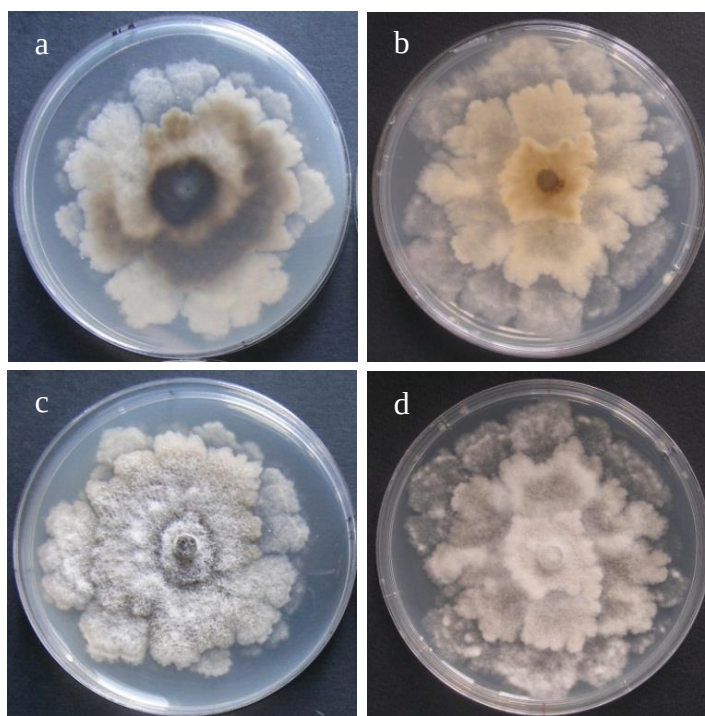


Slika 14. Kolonije izolata *M. polystroma* na KDA podlozi: izolat MPSRB-20 (a-lice, d-naličje), MPSRB-2 (b-lice, e-naličje), referentni izolat 0603202046 (c-lice, f-naličje).



Slika 15. SEM mikrografija supratne micelije izolata MPSRB-20 vrste *M. polystroma* u kulturi odgajanoj na KDA podlozi.

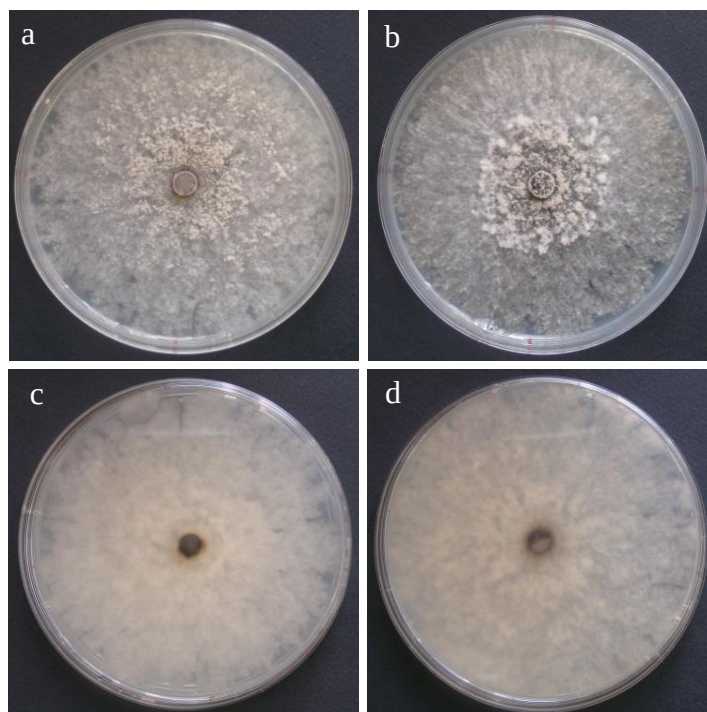
Izolati *M. laxa* su obrazovali kolonije koje su bile sivkasto obojene, dok je vazдушna micelija bila oskudno razvijena podlozi (Slika 16). Karakterističan je bio neravnomeran porast kolonija i njihov talasast obod, dok su posle četiri do šest dana imale režnjeviti obod i izgled rozete. Na naličju Petri kutija kolonije su ispoljile blagu pigmetaciju u vidu braonkaste boje. Referentni izolati C-28 i PD20.96 su obrazovali kolonije sličnog izgleda kao i izolati poreklom iz Srbije. Prosečan dnevni porast kolonija za vrstu je iznosio 8,15 mm. Najsporiji prosečni porast kolonije od 6,08 mm ispoljio je izolat MLX-7, dok je najbrži prosečan porast micelije od 10,5 mm ispoljio izolat MLX-24. Presečni dnevni porast ostalih izolata iznosio je od 6,25-9,75 mm. Prosečan dnevni porast micelije izolata C-28 je iznosio 6,87 mm, dok je kod izolata PD20.96 iznosio 4,42 mm.



Slika 16. Kolonije izolata *M. laxa* na KDA podlozi: MLX-7 (a-lice c-naličje), referentni izolat C-28 (b-lice, d-naličje).

Izolati *M. fructicola* nisu ispoljili variranje u izgledu kolonija na KDA podlozi (Slika 17). Kolonije su bile sivkasto obojene, ravnog oboda sa prisutnom masom spora na vazdušnoj miceliji. Mase spora bile su kremasto obojene, raspoređene u vidu koncentričnih krugova na površini kolonija. Na naličju Petri kutija nije bila izražena pigmentacija kolonija. Referentni izolat a-100 je obrazovao koloniju sličnog izgleda kao i izolati poreklom iz Srbije. Prosečan dnevni porast kolonija za vrstu je iznosio 12,61

mm. Najsporiji prosečni dnevni porast kolonije od 11,58 mm ispoljio je izolat MFC-20, zatim 12,42 mm izolat MFC-28, dok je najbrži prosečan porast kolonije od 13,83 mm imao izolat MFC-1. Prosečni dnevni porast micelije referentnog izolata iznosio je 13,51 mm.



Slika 17. Kolonije izolata *M. fructicola* na KDA podlozi: izolat MFC-1 (a-lice, c-naličje), referentni izolat-100 (b-lice, d-naličje).

Međusobnim poređenjem prosečnog dnevnog porasta vrsta je utvrđen najbrži porast kod *M. fructicola*, dok se prosečni dnevni porast kolonije *M. polystroma*, *M. fructigena* i *M. laxa* nije statistički značajno razlikovao (Tabela 9).

Tabela 9. Statističko poređenje porasta kolonija vrsta *M. fructigena* (MF), *M. polystroma* (MP), *M. fructicola* (MFC) i *M. laxa* (MLX) na KDA podlozi.

(I) Klasa vrsta	(J) Klasa vrsta	Razlika srednjih vrednosti (I-J)	SE	p
MF	MP	-0,4072	0,66175	0,927
	MLX	0,4305	0,80048	0,950
	MFC	-5,0917*	0,92536	0,000
MP	MF	0,4072	0,66175	0,927
	MLX	0,8377	0,81196	0,731
	MFC	-4,6845*	0,93531	0,000
MLX	MF	-0,4305	0,80048	0,950
	MP	-0,8377	0,81196	0,731
	MFC	-5,5222*	1,03810	0,000
MFC	MF	5,0917*	0,92536	0,000
	MP	4,6845*	0,93531	0,000
	MLX	5,5222*	1,03810	0,000

Legenda* Postoji statistički značajna razlika Tukey HSD testom ($p < 0,001$); SE-standardna greška sredine; p-statistička značajnost.

Međusobnim poređenjem prosečnog dnevnog porasta izolata, najbrži prosečni dnevni porast ispoljili su izolati *M. fructicola* (Tabela 10). Uočeno je variranje u prosečnom dnevnom porastu posebno kod izolata *M. fructigena*, ali i kod izolata *M. polystroma* i *M. laxa*. Izolati *M. fructigena* (MFSRB-1, MFSRB-10, MFSRB-17 i MCG), referentni izolat *M. polystroma*, izolat *M. laxa* (MLX-SV1) su ispoljili prosečni dnevni porast slične brzine kao i izolati *M. fructicola*. Najsporiji prosečni dnevni porast imali su izolati *M. fructigena* (MFSRB-2, MFSRB-32, MFSRB-6 i MFSRB-8SD), *M. polystroma* (MFSRB-21) i referentni izolat *M. laxa* (PD20.96).

Tabela 10. Prosečni dnevni porast kolonija izolata *Monilinia* spp. na KDA podlozi.

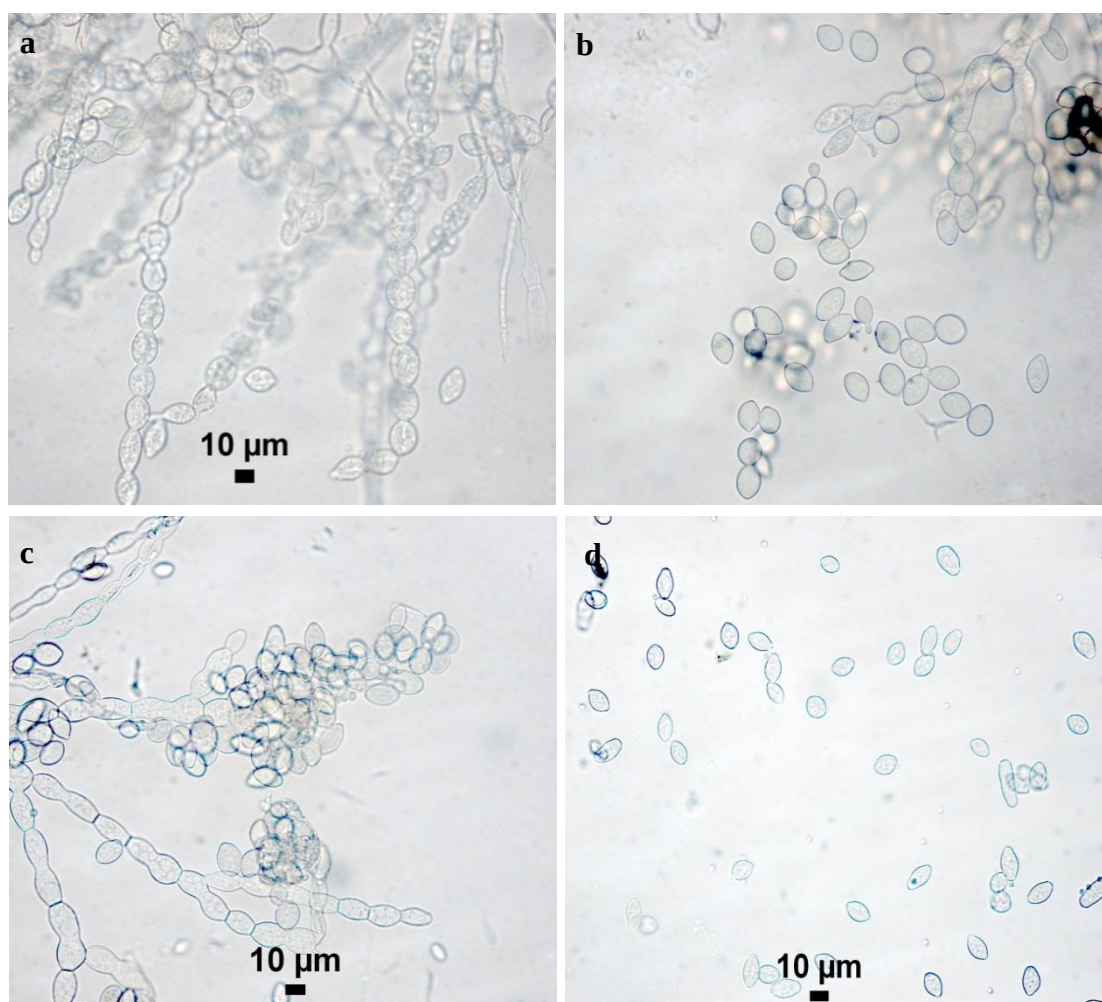
Vrsta	Izolat	Porast kolonije izolata (mm / dan)			
		Min	Max	Prosek	Standardna greška
<i>M. fructigena</i>	MFSRB-1	8,75	11,5	10,62hijkl	0,64
	MFSRB-10	9,75	11,33	10,21fghijkl	0,38
	MFSRB-17	10	12,75	11,67ijkl	0,85
	MFSRB-2	3,38	4	3,5ab	0,85
	MFSRB-32	3,23	7,38	4,61abcd	0,26
	MFSRB-6	0,75	2,75	1,63a	0,38
	MFSRB-3	5,5	6,13	6,04bcdef	0,59
	MFSRB-22	7,5	9	7,75bcdefghi	0,29
	MFSRB-6SD	4,5	10,5	6,83bcdefgh	0,85
	MFSRB-8SD	3,75	8	5,5abcde	0,28
	Ukupno	0,75	12,75	6,84	0,54
<i>M. polystroma</i>	MPSRB-2G	5	7,5	6,75bcdefgh	0,12
	MPSRB-20	8,57	9	8,77defghij	0,88
	MPSRB-13	7,25	8,25	7,75bcdefghi	0,12
	MP-13	8	9,16	8,91defghijk	0,37
	MPSRB-3	8,25	8,75	8,44cdefghij	0,45
	MPSRB-2	8,75	10	9,5efghijkl	0,08
	MPSRB-36	6,16	8,67	7,83bcdefghi	0,38
	MPSRB-6	5	10	7,33bcdefghi	0,7
	MPSRB-21	3,5	6,75	4,83abcd	0,26
	Ukupno	3,5	10	7,79	0,37
<i>M. laxa</i>	MLX-SV1	8,75	10,75	9,75efghijkl	0,8
	MLX-7	5	8,25	6,25bcdefg	0,58
	MLX-13	5	7	6,08bcdef	0,64
	MLX-24	8,25	11,75	10,5ghijkl	0,13
	Ukupno	5	11,75	8,15	0,54
<i>M. fruticola</i>	MFC-1	13,5	14,5	13,83l	0,33
	MFC-28	10,75	13,5	12,42jkl	0,85
	MFC-20	10,25	13,25	11,58ijkl	0,88
	Ukupno	10,25	14,5	12,61	0,69
Referentni izolati	MCG ¹	12	15,75	13,19kl	0,19
	0603202046 ²	10	12,77	11,25ijkl	0,98
	PD20.96 ³	4,25	4,75	4,42abc	0,17
	C-28 ³	5,6	8,6	6,87bcdefgh	0,9
	a-100 ⁴	13	13,75	13,5l	0,25

Legenda: Min-najmanja izmerena veličina; Max-najveća izmerena veličina; ¹*M. fructigena*, ²*M. polystroma*, ³MLX-*M. laxa* i ⁴MFC-*M. fruticola*; Istim slovima su označene grupe između kojih nije uočena statistički značajna razlika Tukey HSD testom ($p < 0,001$).

5.2.2. Mikroskopske osobine izolata *Monilinia* spp.

Mikroskopske osobine sa ploda jabuke

Izolati *Monilinia* spp. obrazovali su jednoćelijske, hijalinske konidije, limunastog oblika u lancima na plodovima jabuke (Slika 18). Veličine konidija *Monilinia* spp. obrazovanih na plodu jabuke prikazane su u Tabeli 11 i Graficima 1, 2, 3 i 4.



Slika 18. Lanci konidija i pojedinačne konidije izolata MFSRB-3 *M. fructigena* (a), izolata MPSRB-6 *M. polystroma* (b), izolata MLX-13 *M. laxa* (c) i izolata MFC-28 *M. fructicola* (d).

Dužina i širina konidija izolata *M. fructigena* iznosila je od 10,89-27,33 x 7,99-22,91 μm (prosek=18,73 x 11,76 μm). Izolati *M. fructigena* varirali su u dužini i širini konidija. Konidije najmanje prosečne dužine od 17,04 μm obrazovao je izolat MFSRB-32, dok je izolat MFSRB-3 formirao najduže konidije od 20,60 μm . Ostali izolati obrazovali su konidije prosečnih dužina od 17,88–19,71 μm . Referentni izolat MCG formirao je konidije prosečne dužine od 18,36 μm . Prosečne širine konidija ostalih izolata iznosile su od 11,12-12,71 μm . Prosečna širina izolata MCG iznosila je 10,70 μm . Izolat MFSRB-17 nije sporulisao.

Dužina i širina konidija izolata *M. polystroma* iznosila je od 10,85-23,85 x 7,55-15,52 μm (prosek=15,78 x 10,82 μm). Izolati *M. polystroma* ispoljili su variranje u dužini i širini konidija. Konidije najmanje prosečne dužine od 14,42 μm obrazovao je izolat MPSRB-36, dok je najduže konidije od 17,06 μm obrazovao izolat MPSRB-21. Ostali izolati obrazovali su konidije prosečnih dužina od 15,41-16,71 μm . Dužina konidija referentnog izolata 0603202046 iznosila je 18,68 μm . Prosečne širine konidija ostalih izolata iznosile su od 10,27–11,06 μm . Prosečna širina konidija referentnog izolata 0603202046 iznosila je 11,91 μm .

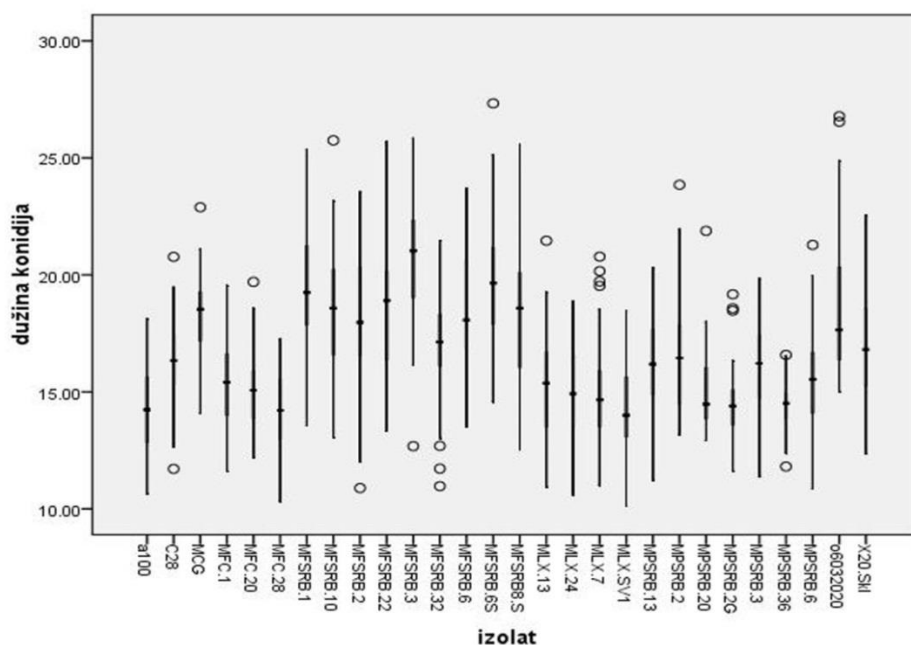
Dužina i širina konidija izolata *M. laxa* iznosila je od 10,14-21,46 x 6,99-13,33 μm (prosek=14,89 x 10,02 μm). Prosečna dužina konidija izolata *M. laxa* iznosila je od 14,28-15,26 μm . Referentni izolat C-28 obrazovao je nešto duže konidije, prosečne veličine od 16,37 μm . Sporulacija referentnog izolata PD20.96 se nije inicirala na inokulisanim plodovima jabuke. Prosečna širina konidija izolata *M. laxa* iznosila je od 9,66–10,29 μm . Prosečna širina konidija referentnog izolata C-28 iznosila je 9,69 μm .

Dužina i širina konidija izolata *M. fructicola* iznosila je 10,31-19,70 x 6,49–13,88 μm (prosek=14,88 x 9,56 μm). Prosečna dužina konidija izolata iznosila je od 14,23-15,32 μm , dok je prosečna dužina konidija referentnog izolata a-100 iznosila 14,33 μm . Prosečne širine konidija ostalih izolata iznosile su od 9,14–10,38 μm . Referentni izolat a-100 je obrazovao konidije prosečne širine od 9,80 μm .

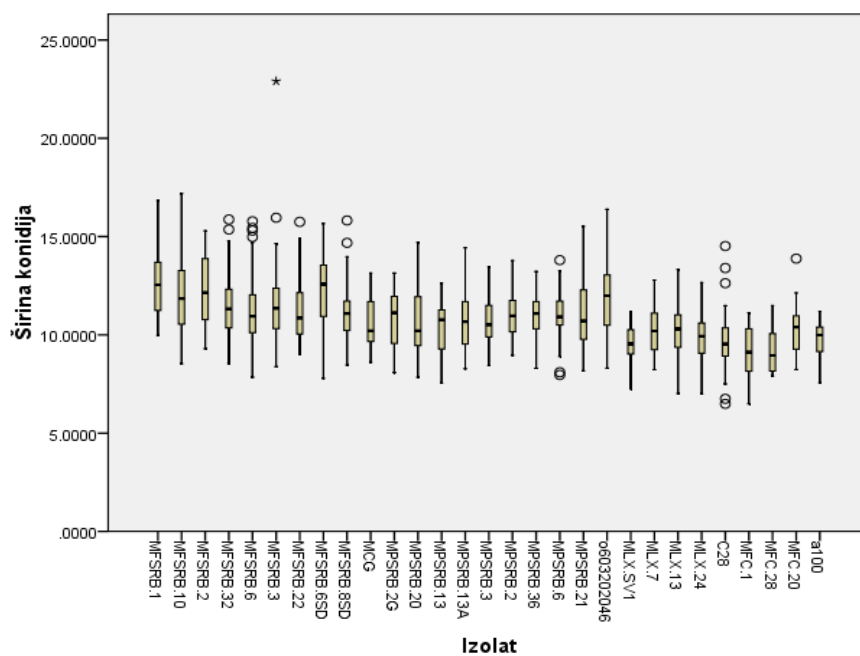
Tabela 11. Veličina konidija izolata *M. fructigena*, *M. polystroma*, *M. fructicola* i *M. laxa* dobijenih sa inokulisanih plodova jabuke.

Vrsta	Izolat	Veličina konidija (µm)					
		Dužina			Širina		
		Min	Max	Prosek±SE	Min	Max	Prosek±SE
<i>M. fructigena</i>	MFSRB-1	13,56	25,37	19,62±0,43ij	9,96	16,83	12,71±0,30k
	MFSRB-10	13,06	25,75	18,62±0,34ghij	8,54	17,19	11,99±0,25hijk
	MFSRB-17	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	MFSRB-2	10,89	23,55	17,88±0,39efghi	9,3	15,29	12,24±0,24ijk
	MFSRB-32	10,97	21,47	17,04±0,27cdefgh	8,55	15,87	11,46±0,23fghijk
	MFSRB-6	13,51	23,7	18,57±0,39ghij	7,85	15,78	11,17±0,27efghij
	MFSRB-3	12,68	25,84	20,60±0,34j	8,38	22,91	11,69±0,28ghijk
	MFSRB-22	13,32	25,69	18,37±0,35fghi	9,01	15,75	11,20±0,2efghij
	MFSRB-6SD	14,57	27,33	19,71±0,44ghij	7,79	15,66	12,31±0,31jk
	MFSRB-8SD	12,53	25,56	18,16±0,35fghi	8,47	15,82	11,12±0,17defghij
	Ukupno	10,89	27,33	18,73±0,37	7,79	22,91	11,76±0,25
<i>M. polystroma</i>	MPSRB-2G	11,63	19,17	14,50±0,26ab	8,08	13,14	10,79±0,22bcdefgh
	MPSRB-20	12,92	21,88	15,35±0,72abcd	7,85	14,7	10,67±0,53bcdefgh
	MPSRB-13	11,22	19,92	16,10±0,33abcde	7,55	12,62	10,27±0,22abcdef
	MP-13	13,47	20,3	16,59±0,40cdefg	8,28	14,43	10,85±0,3bcdefgh
	MPSRB-3	11,38	19,84	15,90±0,28abcde	8,44	13,45	10,70±0,19bcdefgh
	MPSRB-2	13,16	23,85	16,71±0,39cdefgh	8,96	13,77	11,06±0,18defghij
	MPSRB-36	11,81	16,58	14,42±0,15ab	8,3	13,22	10,92±0,17bcdefgh i
	MPSRB-6	10,85	21,28	15,41±0,23abcd	7,96	13,80	11,06±0,13defghij
	MPSRB-21	12,34	22,55	17,06±0,28defgh	8,17	15,52	11,04±0,2cdefghij
	Ukupno	10,85	23,85	15,78±0,34	7,55	15,52	10,82±0,24
<i>M. laxa</i>	MLX-SV1	10,14	18,46	14,28±0,24a	7,25	11,17	9,66±0,11ab
	MLX-7	11	20,78	15,01±0,35abc	8,23	12,79	10,29±0,17abcdef
	MLX-13	10,94	21,46	15,26±0,33abcd	7,02	13,33	10,19±0,19abcdef
	MLX-24	10,6	18,87	15,00±0,33abc	6,99	12,66	9,95±0,23abcde
	Ukupno	10,14	21,46	14,89±0,31	6,99	13,33	10,02±0,17
<i>M. fructicola</i>	MFC-1	11,61	19,54	15,32±0,34abcd	6,49	11,12	9,14±0,26a
	MFC-28	10,31	17,25	14,23±0,50a	7,91	11,48	9,16±0,18a
	MFC-20	12,19	19,7	15,1±0,42abcd	8,24	13,88	10,38±0,27abcdefg
	Ukupno	10,31	19,7	14,88±0,42	6,49	13,88	9,56±0,24
Referentni izolati	MCG ¹	14,09	22,89	18,36±0,45fghi	8,61	13,14	10,70±0,30bcdefgh
	0603202046 ²	15,02	26,78	18,68±0,44hij	8,31	16,39	11,91±0,27hijk
	PD20.96 ³	nt	nt	nt	nt	nt	nt
	C-28 ³	11,71	20,77	16,37±0,28bcdef	6,49	14,52	9,69±0,25abc
	a-100 ⁴	10,64	18,12	14,33±0,38ab	7,56	11,20	9,8±0,28abcd

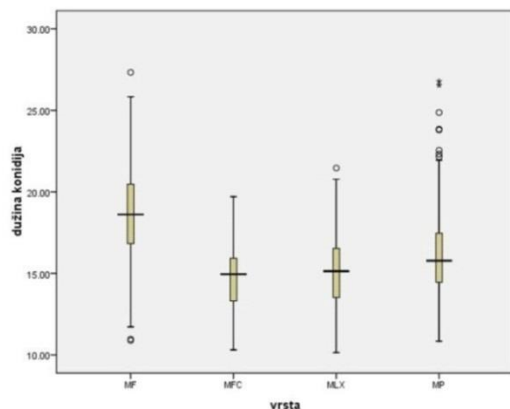
Legenda: Min-najmanja izmerena veličina; Max-najveća izmerena veličina; ns-nije sporulisao; nt-nije testiran; ¹*M. fructigena*, ²*M. polystroma*, ³*M. laxa* i ⁴*M. fructicola*; Istim slovima su označene grupe u kolonama između kojih nije uočena statistički značajna razlika Tukey HSD test ($p < 0,001$); SE-standardna greška sredine.



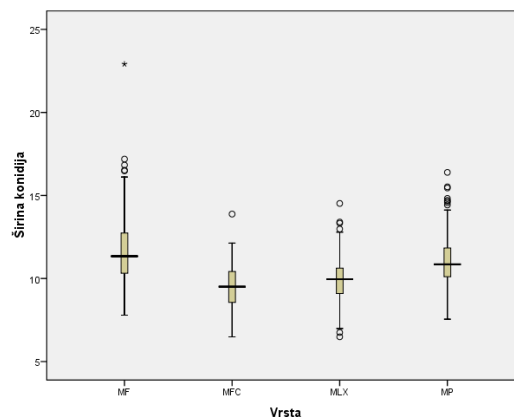
Grafik 1. Dužina konidija izolata *M. fructigena*, *M. polystroma*, *M. fructicola* i *M. laxa* poreklom sa inokulisanih plodova jabuke.



Grafik 2. Širina konidija vrsta *M. fructigena*, *M. polystroma*, *M. fructicola* i *M. laxa* poreklom sa inokulisanih plodova jabuke.



Grafik 3. Dužina konidija vrsta *M. fructigena* (MF), *M. fructicola* (MFC), *M. laxa* (MLX) i *M. polystroma* (MP) sa inokulisanih plodova jabuke.



Grafik 4. Širina konidija vrsta *M. fructigena* (MF), *M. fructicola* (MFC), *M. laxa* (MLX) i *M. polystroma* (MP) sa inokulisanih plodova jabuke.

Međusobnim poređenjem dužina konidija sa inokulisanih plodova jabuke utvrđena je statistički značajna razlika ($p < 0,001$) između ispitivanih *Monilinia* vrsta. (Tabela 12). *M. fructigena* je obrazovala najduže konidije, zatim *M. polystroma*, dok su konidije *M. laxa* i *M. fructicola* bile najkraće i nisu se statistički značajno razlikovale ($p = 0,816$). Međusobnim poređenjem širina konidija utvrđena je statistički značajna razlika ($p < 0,001$) između ispitivanih vrsta *Monilinia* spp., osim između *M. fructicola* i *M. laxa* ($p = 0,137$) (Tabela 13). *M. fructigena* je obrazovala konidije najveće prosečne širine, zatim *M. polystroma*, dok su konidije najmanje prosečne širine obrazovale *M. fructicola* i *M. laxa*.

Tabela 12. Statističko poređenje dužina konidija vrsta *M. fructigena* (MF), *M. polystroma* (MP), *M. fructicola* (MFC) i *M. laxa* (MLX) sa inokulisanih plodova jabuke.

(I) klasa vrste	(J) klasa vrste	Razlika srednjih vrednosti (I-J)	SE	p
MF	MP	2,53846*	0,16519	0
	MLX	3,54235*	0,19982	0
	MFC	3,80671*	0,27564	0
MP	MF	-2,53846*	0,16519	0
	MLX	1,00388*	0,20488	0
	MFC	1,26825*	0,27933	0
MLX	MF	-3,54235*	0,19982	0
	MP	-1,00388*	0,20488	0
	MFC	0,26436	0,30111	0,816
MFC	MF	-3,80671*	0,27564	0
	MP	-1,26825*	0,27933	0
	MLX	-0,26436	0,30111	0,816

Legenda: *Postoji statistički značajna razlika Tukey HSD testom ($p < 0,001$); SE-standardna greška sredine; p-statistička značajnost.

Tabela 13. Statističko poređenje širina konidija vrsta *M. fructigena* (MF), *M. polystroma* (MP), *M. fructicola* (MFC) i *M. laxa* (MLX) sa inokulisanih plodova jabuke.

(I) klasa vrste	(J) klasa vrste	Razlika srednjih vrednosti (I-J)	SE	p
MF	MP	0,679*	0,103	0
	MLX	1,701*	0,125	0
	MFC	2,111*	0,175	0
MP	MF	-0,679*	0,103	0
	MLX	1,022*	0,128	0
	MFC	1,432*	0,177	0
MLX	MF	-1,701*	0,125	0
	MP	-1,022*	0,128	0
	MFC	0,41	0,19	0,137
MFC	MF	-2,111*	0,175	0
	MP	-1,432*	0,177	0
	MLX	-0,41	0,19	0,137

Legenda: *Postoji statistički značajna razlika Tukey HSD testom ($p < 0,001$); SE-standardna greška sredine; p-statistička značajnost.

Izolati *M. fructigena* formirali su najduže konidije na plodovima jabuke u poređenju sa drugim izolatima *Monilinia* spp. (Tabela 11). Između izolata *M. fructicola* i *M. laxa* nije uočena značajna razlika u dužini konidija. Variranje u dužini konidija uočeno je kod izolata *M. polystroma*. Tri izolata *M. polystroma* (MP-13, MPSRB-2 i MPSRB-21) i referentni izolat obrazovali su konidije koje se po dužini nisu razlikovale od većine izolata *M. fructigena*. Dužine konidija ostalih izolata *M. polystroma* se nisu značajno razlikovale od dužina konidija izolata *M. fructicola* i *M. laxa*. Izolati *M. fructigena* su obrazovali nešto šire konidije od izolata *M. laxa* i *M. fructicola* (Tabela 11). Širine konidija izolata *M. polystroma* se nisu značajno razlikovale od širine konidija većine izolata *M. fructigena*. Jedino izolat MPSRB-13 *M. polystroma* je imao širinu koja se nije razlikovala od širine konidija izolata *M. fructicola* i *M. laxa*.

Mikroskopske osobine konidija sa V8 podloge

Svi ispitivani izolati *Monilinia* spp. su obrazovali jednoćelijske, hijalinske konidije, limunastog oblika u lancima na V8 podlozi. Dužina i širina konidija *Monilinia* spp. obrazovanih na V8 podlozi prikazana je u Tabeli 14 i Graficima 5, 6, 7 i 8.

Dužina i širina konidija *M. fuctigena* iznosila je od 10,35-26,23 x 7,05-18,95 μm (prosek=17,17 x 11,46 μm). Konidije najmanje prosečne dužine od 13,98 μm obrazovao je izolat MFSRB-6, dok je izolat MFSRB-2 formirao najduže konidije prosečne širine od 21,29 μm . Prosečna dužina konidija ostalih izolata iznosila je od 14,95-19,82 μm . Prosečna dužina konidija referentnog izolata MCG iznosila je 13,76 μm . Konidije najmanje prosečne širine od 10,26 μm obrazovao je izolat MFSRB-6, dok je najšire konidije izolata od 13,88 μm obrazovao izolat MFSRB-8SD. Prosečna širina konidija referentnog izolata MCG iznosila je 11,22 μm .

Dužina i širina konidija *M. polystroma* iznosila je 9,81-19,17 x 7,41-17,42 μm (prosek=13,97 x 10,33 μm). Prosečne dužine konidija izolata iznosile su 13,41-14,55 μm . Konidije referentnog izolata 0603202046 su bile nešto duže od ostalih izolata *M. polystroma* poreklom iz Srbije i iznosile su 16,49 μm . Prosečne širine konidija izolata iznosile su od 9,56-11,28 μm . Prosečna širina konidija referentnog izolata 0603202046 iznosila je 10,35 μm .

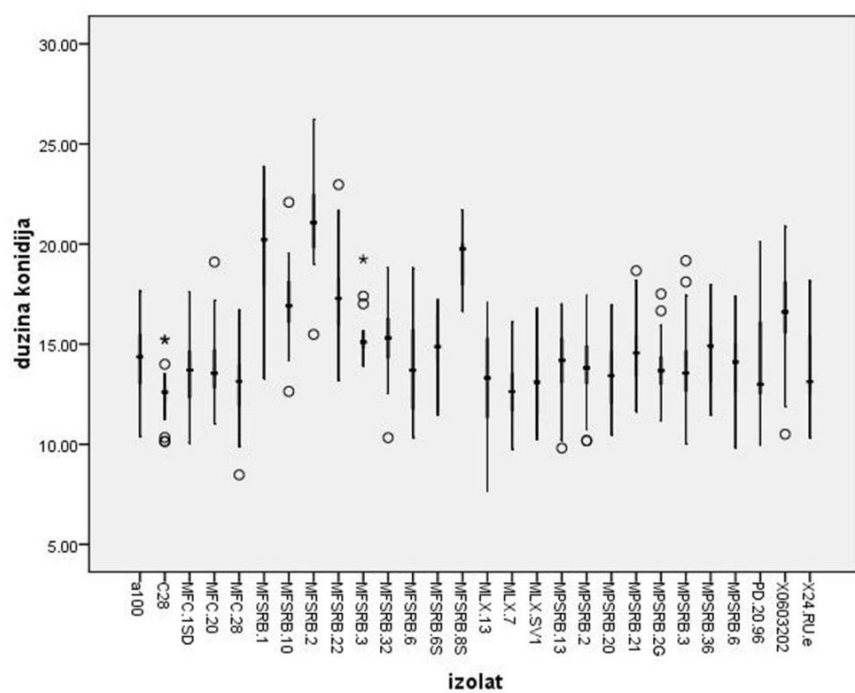
Dužina i širina konidija *M. laxa* iznosila je 7,65-18,16 x 4,59-11,36 μm (prosek=13,2 x 7,41). Prosečne dužine konidija izolata iznosile su 12,70-13,75 μm , dok je prosečna dužina konidija referentnog izolata C-28 iznosila 12,53 μm i izolata PD20.96 14,15 μm . Prosečne širine konidija izolata iznosile su od 6,89-7,62 μm . Prosečna širina izolata C-28 iznosila je 7,63 μm , a izolata PD20.96 iznosila je 7,44 μm .

Dužina i širina konidija *M. fructicola* iznosila je 8,47-19,10 x 5,90-11,27 μm (prosek=13,55 x 8,62 μm). Prosečne dužine konidija izolata iznosile su od 13,18–13,89 μm . Referentni izolat a-100 je formirao konidije prosečne dužine od 14,18 μm . Prosečne širine konidija izolata iznosile su od 8,46–8,81 μm , dok je referentni izolat a-100 formirao konidije prosečne širine od 9,54 μm .

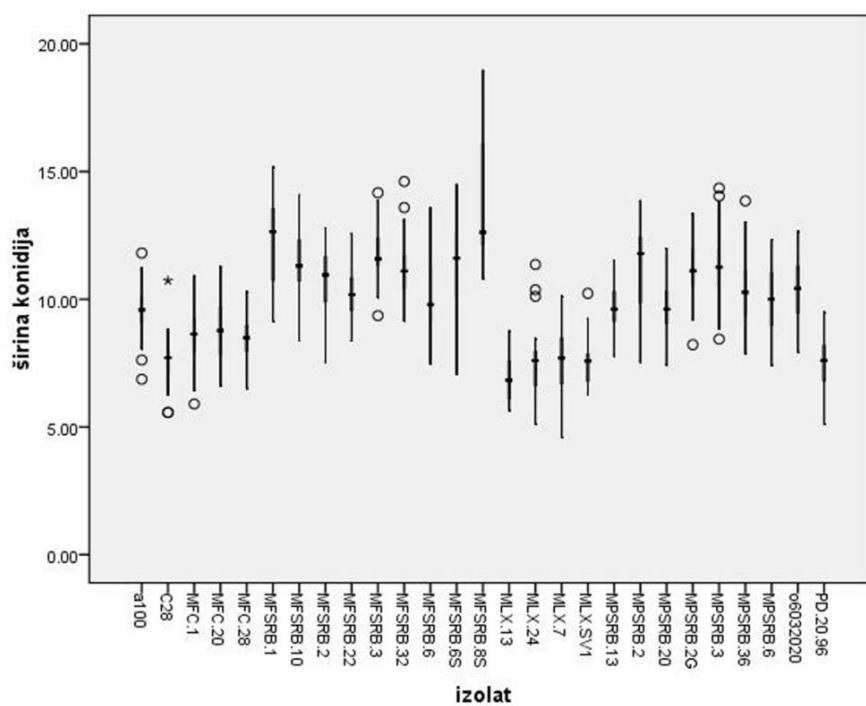
Tabela 14. Veličina konidija izolata *M. fructigena*, *M. polystroma*, *M. fructicola* i *M. laxa* poreklom sa V8 podloge.

Vrsta	Izolat	Veličina konidija (µm)					
		Dužina			Širina		
		Min	Max	Prosek±SE	Min	Max	Prosek±SE
<i>M. fructigena</i>	MFSRB-1	13,3	23,87	19,82±0,77ij	10,28	15,02	12,25±0,47l
	MFSRB-10	12,64	22,09	17,05±0,34gh	8,38	14,01	11,57±0,25jkl
	MFSRB-17	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	MFSRB-2	12,79	26,23	21,29±0,47j	7,55	15,5	10,75±0,27ghijk
	MFSRB-32	12,79	18,84	15,38±0,17defg	9,17	14,64	11,11±0,11hijkl
	MFSRB-6	10,35	18,79	13,98±0,68abcde	7,48	13,16	10,26±0,47fghi
	MFSRB-3	13,92	19,24	15,54±0,42efgh	9,36	14,12	11,71±0,38kl
	MFSRB-22	13,2	22,97	17,28±0,28h	8,37	12,56	10,27±0,13fghi
	MFSRB-6SD	11,48	17,21	14,95±0,30cdef	7,05	14,48	11,33±0,37ijkl
	MFSRB-8SD	16,67	21,71	19,21±0,47i	10,82	18,95	13,88±0,87m
	Ukupno	10,35	26,23	17,17±0,43	7,05	18,95	11,46±0,37
<i>M. polystroma</i>	MPSRB-2G	11,19	17,51	13,76±0,18abcde	8,82	13,35	11,22±0,17ijkl
	MPSRB-20	10,49	16,95	13,41±0,38abc	8,76	11,99	10,01±0,21efgh
	MPSRB-13	9,81	16,99	14,04±0,25abcde	7,88	11,52	9,56±0,14defg
	MP-13	11,29	16,26	14,07±0,23abcde	8,83	11,48	9,86±0,13efg
	MPSRB-3	10,04	19,17	13,76±0,25abcde	7,55	17,42	11,26±0,18ijkl
	MPSRB-2	10,18	17,42	13,9±0,34abcde	8,96	13,84	11,28±0,34ijkl
	MPSRB-36	11,48	17,98	14,55±0,25bcde	7,86	13,85	10,38±0,19fghij
	MPSRB-6	9,84	17,4	13,67±0,34abcd	7,41	12,33	9,95±0,22efgh
	MPSRB-21	11,65	18,67	14,54±0,30bcde	7,43	11,17	9,43±0,17def
	Ukupno	9,81	19,17	13,97±0,28	7,41	17,42	10,33±0,19
<i>M. laxa</i>	MLX-SV1	10,23	16,78	13,07±0,43ab	6,29	10,23	7,62±0,22abc
	MLX-7	9,77	16,12	12,7±0,21a	4,59	10,12	7,61±0,18ab
	MLX-13	7,65	17,06	13,29±0,54abc	5,65	8,75	6,89±0,19a
	MLX-24	10,34	18,16	13,75±0,56abcde	5,12	11,36	7,53±0,38ab
	Ukupno	7,65	18,16	13,2±0,44	4,59	11,36	7,41±0,24
<i>M. fructicola</i>	MFC-1	10,07	17,61	13,59±0,20abcd	5,90	10,91	8,58±0,12bcd
	MFC-28	8,47	16,7	13,18±0,17abc	6,52	10,3	8,46±0,09bcd
	MFC-20	11,02	19,1	13,89±0,21abcde	6,62	11,27	8,81±0,15cde
	Ukupno	8,47	19,10	13,55±0,19	5,90	11,27	8,62±0,12
Referentni izolati	MCG ¹	11,19	17,51	13,76±0,18abcde	8,22	13,35	11,22±0,17ijkl
	0603202046 ²	10,5	20,88	16,49±0,30fgh	7,93	12,67	10,35±0,15fghi
	PD20.96 ³	10	20,11	14,15±0,56abcde	5,12	9,51	7,44±0,25ab
	C-28 ⁴	10,13	15,23	12,53±0,31a	5,56	10,73	7,63±0,26abc
	a-100 ⁴	10,39	17,66	14,18±0,25abcde	6,87	11,81	9,54±0,12def

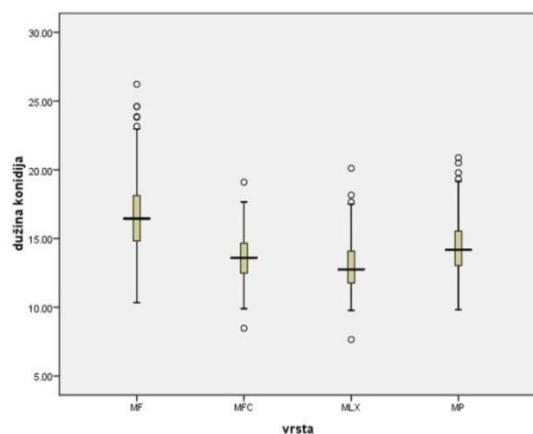
Legenda: Min-najmanja izmerena veličina; Max-najveća izmerena veličina; ns- nije sporulisao; nt-nije testirano; ¹*M. fructigena*, ²*M. polystroma*, i ³*M. laxa* i ⁴*M. fructicola*; SE-standardna greška sredine; Istim slovima su označene grupe u kolonama između kojih nije uočena statistički značajna razlika Tukey HSD testom ($p < 0,001$).



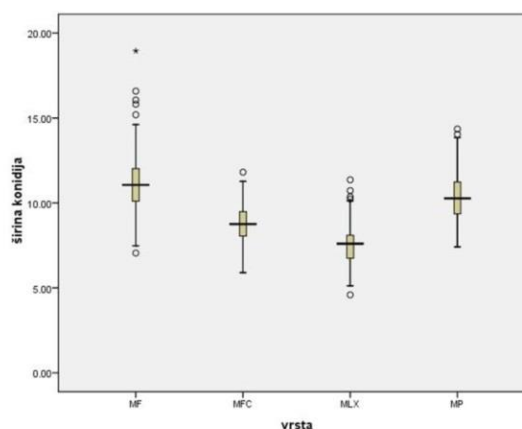
Grafik 5. Dužina konidija izolata *Monilinia* spp. poreklom sa V8 podloge.



Grafik 6. Širina konidija izolata *Monilinia* spp. poreklom sa V8 podloge.



Grafik 7. Prikaz dužine konidija vrsta *M. fructigena* (MF), *M. fructicola* (MFC), *M. laxa* (MLX) i *M. polystroma* (MP) poreklom sa V8 podloge.



Grafik 8. Prikaz širine konidija vrsta *M. fructigena* (MF), *M. fructicola* (MFC), *M. laxa* (MLX) i *M. polystroma* (MP) poreklom sa V8 podloge.

Međusobnim poređenjem dužina konidija poreklom sa V8 podloge utvrđena je statistički značajna razlika ($p < 0,001$) između ispitivanih *Monilinia* vrsta, osim između *M. fructicola* i *M. laxa* ($p = 0,109$) (Tabela 15). *M. fructigena* je obrazovala konidije najveće prosečne dužine, zatim *M. polystroma*, a konidije najmanje prosečne dužine obrazovale su *M. fructicola* i *M. laxa*. Međusobnim poređenjem širina konidija utvrđena je statistički značajna razlika ($p < 0,001$) između ispitivanih vrsta *Monilinia* spp. (Tabela 16). *M. fructigena* je obrazovala konidije najveće prosečne širine, zatim *M. polystroma* i *M. fructicola*. Konidije najmanje prosečne širine obrazovala je *M. laxa*.

Tabela 15. Statističko poređenje dužine konidija vrsta *M. fructigena* (MF), *M. polystroma* (MP), *M. fructicola* (MFC) i *M. laxa* (MLX) sa V8 podloge.

(I) klasa vrste	(J) klasa vrste	Razlika srednjih vrednosti (I-J)	SE	p
MF	MP	2,40343*	0,16888	0
	MLX	3,58147*	0,21934	0
	MFC	3,08657*	0,18561	0
MP	MF	-2,40343*	0,16888	0
	MLX	1,17804*	0,20522	0
	MFC	0,68315*	0,16868	0
MLX	MF	-3,58147*	0,21934	0
	MP	-1,17804*	0,20522	0
	MFC	-0,4949	0,21919	0,109
MFC	MF	-3,08657*	0,18561	0
	MP	-0,68315*	0,16868	0
	MLX	0,4949	0,21919	0,109

Legenda: *Postoji statistički značajna razlika Tukey HSD testom ($p < 0,001$); SE-standardna greška sredine; p-statistička značajnost.

Tabela 16. Statističko poređenje širine konidija vrsta *M. fructigena* (MF), *M. polystroma* (MP), *M. fructicola* (MFC) i *M. laxa* (MLX) poreklom sa V8 podloge.

(I) klasa vrste	(J) klasa vrste	Razlika srednjih vrednosti (I-J)	SE	p
MF	MP	0,76344*	0,10483	0
	MLX	3,67791*	0,13575	0
	MFC	2,37866*	0,11487	0
MP	MF	-0,76344*	0,10483	0
	MLX	2,91447*	0,12726	0
	MFC	1,61522*	0,10471	0
MLX	MF	-3,67791*	0,13575	0
	MP	-2,91447*	0,12726	0
	MFC	-1,29925*	0,13565	0
MFC	MF	-2,37866*	0,11487	0
	MP	-1,61522*	0,10471	0
	MLX	1,29925*	0,13565	0

Legenda: *Postoji statistički značajna razlika Tukey HSD testom ($p < 0,001$); SE-standardna greška sredine; p-statistička značajnost.

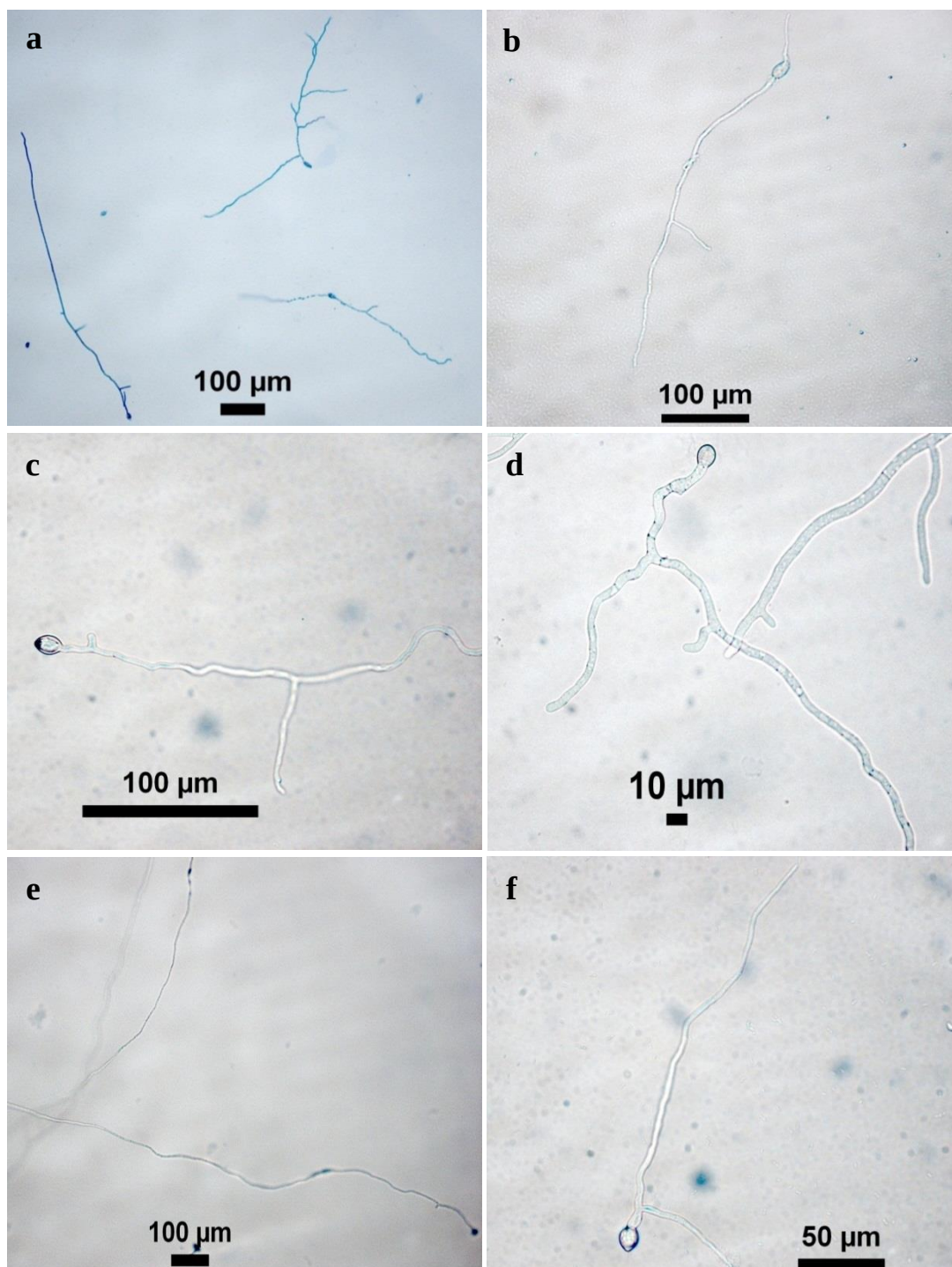
Međusobnim poređenjem dužina konidija poreklom sa V8 podloge svih ispitivanih izolata utvrđena je statistički značajna razlika ($p < 0,001$) između izolata *Monilinia* spp. (Tabela 14). Najduže konidije na V8 podlozi obrazovala je *M. fructigena*. Izuzetak je bio izolat MFSRB-6 čija se dužina nije statistički značajno razlikovala od izolata *M. polystroma*, *M. fructicola* i *M. laxa*. Dva izolata *M. polystroma* (MPSRB-36 i MPSRB-21) su obrazovali konidije čija se dužina nije značajno razlikovala u odnosu na izolate *M. fructigena*. Ostali izolati *M. polystroma* su formirali kraće konidije koje se nisu razlikovale od izolata *M. laxa* i *M. fructicola*. Međusobnim poređenjem na osnovu širine konidija utvrđena je značajna razlika između izolata vrsta roda *Monilinia* (Tabela 14). Izolati *M. laxa* su obrazovali nešto uže konidije od svih ostalih izolata. Nešto šire konidije obrazovali su izolati *M. fructicola*. Međutim, takođe je uočeno da su izolati *M. polystroma* (MPSRB-20, MPSRB-13, MP-13 i MPSRB-21) obrazovali konidije sličnih širina kao i izolati *M. fructicola*. Sa druge strane, većina izolata *M. fructigena* i *M. polystroma* su obrazovali konidije sličnih širina.

Uticaj supstrata na veličinu konidija izolata *Monilinia* spp.

Izolati *Monilinia* spp. su obrazovali veće konidije na inokulisanim plodovima jabuke nego na V8 podlozi ($F(52,4422)=38,501$, $p<0,0001$ Vilksov $\lambda=0,474$, parcijalni eta kvadrat=0,312 za izolat i $F(2,1118)=169,617$, $p<0,0001$, Vilksov $\lambda=0,867$, parcijalni eta kvadrat=0,133 za podlogu).

Klijanje konidija i dužine inicijalnih hifa izolata *Monilinia* spp.

Konidije izolata *Monilinia* spp. su klijale u jednu ili dve inicijalne hife (Slika 19; Tabela 17). Konidije izolata *M. fructigena* klijale su u jednu ili dve inicijalne hife i to 51,84% konidija je obrazovalo jednu inicijalnu hifu, dok je 48,16% konidija obrazovalo dve inicijalne hife. Konidije izolata *M. polystroma* klijale su jednu ili dve inicijalne hife, od čega 60,99% konidija je obrazovalo jednu inicijalnu hifu, a 39,01% je obrazovalo dve inicijalne hife. Konidije izolata *M. laxa* i *M. fructicola* su klijale u jednu inicijalnu hifu. Inicijalne hife izolata *M. fructigena*, *M. polystroma* i *M. fructicola* su bile prave, dok su inicijalne hife *M. laxa* bile blago savijene (Slika 19).



Slika 19. Klijanje konidija *Monilinia* spp. na VA podlozi posle 18 h: izolat MFSRB-1 *M. fructigena* (a, b), izolat MPSRB-2G *M. polystroma* (c), izolat MLX-13 *M. laxa* (d), izolat MFC-28 *M. fructicola* (e) i izolat MFC-1 *M. fructicola* (f).

Tabela 17. Procenat obrazovanih inicijalnih hifa po konidiji izolata *M. fructigena*, *M. polystroma*, *M. laxa* i *M. fructicola*.

Vrsta	Izolat	Procenat obrazovanih inicijalnih hifa po konidiji	
		1 inicijalna hifa	2 inicijalne hife
<i>M. fructigena</i>	MFSRB-1	70,37	29,63
	MFSRB-10	37,5	62,5
	MFSRB-17	nt	nt
	MFSRB-2	40,74	59,26
	MFSRB-32	42,5	57,5
	MFSRB-6	36,36	63,64
	MFSRB-3	69,62	30,38
	MFSRB-22	46,67	53,33
	MFSRB-6SD	58,62	41,38
	MFSRB-8SD	64,17	35,83
	Prosek	51,84	48,16
<i>M. polystroma</i>	MPSRB-2G	75	25
	MPSRB-20	74,17	25,83
	MPSRB-13	74,89	25,11
	MP-13	58,85	41,15
	MPSRB-3	37,25	62,75
	MPSRB-2	41,51	58,49
	MPSRB-36	63,77	36,23
	MPSRB-6	62,5	37,5
	MPSRB-21	nt	nt
	Prosek	60,99	39,01
<i>M. laxa</i>	MLX-SV1	100	0
	MLX-7	100	0
	MLX-13	100	0
	MLX-24	100	0
	Prosek	100	0
<i>M. fructicola</i>	MFC-1	100	0
	MFC-28	100	0
	MFC-20	100	0
	Prosek	100	0
Referentni izolati	MCG ¹	nt	nt
	0603202046 ²	46,44	53,68
	PD20.96 ³	100	0
	C-28 ³	100	0
	a-100 ⁴	100	0

Legenda: nt-nije testirano; ¹*M. fructigena*, ²*M. polystroma*, ³*M. laxa* i ⁴*M. fructicola*.

Ukupna dužina inicijalnih hifa izolata *Monilinia* spp. prikazana je u Tabeli 18 i Grafcima 9 i 10. Ukupna prosečna dužina inicijalnih hifa vrste *M. fructigena* iznosila je 723,81 μm . Izolat MFSRB-1 obrazovao je najkraće inicijalne hife prosečne dužine 658,81 μm , dok je izolat MFSRB-32 obrazovao najduže inicijalne hife prosečne dužine 804,43 μm . Ostali izolati su obrazovali inicijalne hife prosečne dužine od 685,47-757,42 μm .

Ukupna prosečna dužina inicijalnih hifa vrste *M. polystroma* iznosila je 622,52 μm . Najkraće inicijalne hife prosečne dužine od 512,06 μm obrazovao je izolat MPSRB-6, dok je najduže inicijalne hife prosečne dužine od 668,44 μm obrazovao izolat MPSRB-13. Ukupna dužina inicijalnih hifa ostalih izolata iznosila je od 547,60-677,43 μm , dok je prosečna dužina inicijalnih hifa referentnog izolata 0603202046 iznosila 583,68 μm .

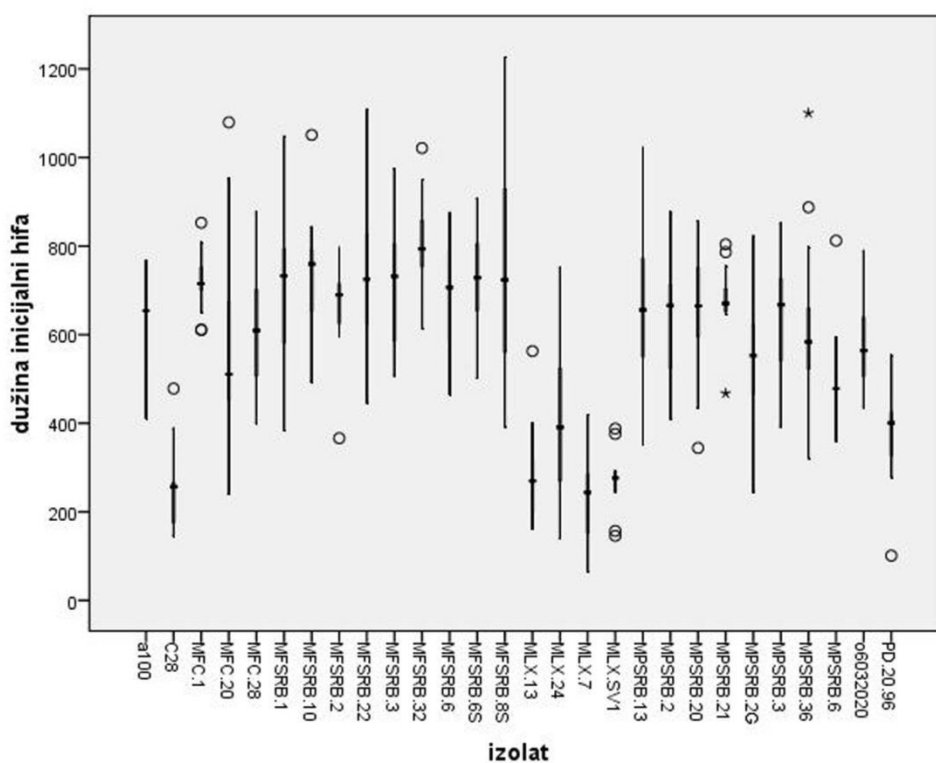
Ukupna prosečna dužina inicijalnih hifa vrste *M. laxa* iznosila je 292,07 μm . Izolat MLX-7 obrazovao je najkraće inicijalne hife prosečne dužine 225,19 μm , dok je izolat MLX-24 obrazovao najduže inicijalne hife, prosečne veličine 403,53 μm . Ukupna prosečna dužina inicijalnih hifa referentnog izolata C-28 iznosila je 256,36 μm , dok je kod referentnog izolata PD20.96 iznosila 376,04 μm .

Ukupna prosečna dužina inicijalnih hifa vrste *M. fructicola* iznosila je 624,14 μm . Izolat MFC-20 je obrazovao najkraće inicijalne hife prosečne dužine 544,83 μm , dok je izolat MFC-1 formirao inicijalne hife prosečne dužine od 722,74 μm . Ukupna prosečna dužina inicijalnih hifa referentnog izolata a-100 iznosila je 628,16 μm .

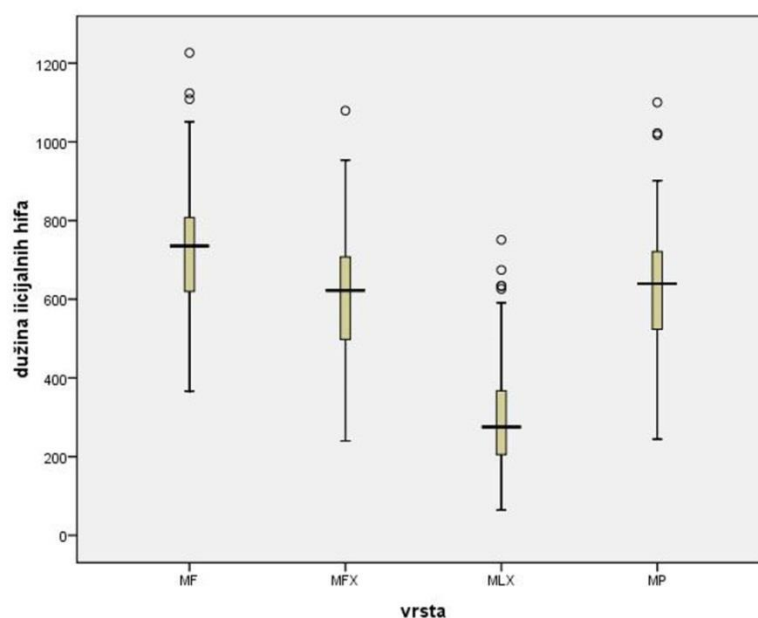
Tabela 18. Ukupna dužina inicijalnih hifa izolata *M. fructigena*, *M. polystroma*, *M. fructicola* i *M. laxa*.

Vrsta	Izolat	Dužina inicijalnih hifa (µm)			
		Min	Max	Prosečna vrednost	Standardna greška
<i>M. fructigena</i>	MFSRB-1	383,1	1047,65	693,13fghi	33,03
	MFSRB-10	493,37	1050,99	732,16ghi	29,35
	MFSRB-2	366,32	796,28	658,81efghi	34,15
	MFSRB-17	nt	nt	nt	nt
	MFSRB-32	614,55	1021,3	804,43i	27,01
	MFSRB-6	465,45	875,34	685,47fghi	29,86
	MFSRB-3	507,26	975,2	715,48ghi	34,07
	MFSRB-22	446,36	1108,51	743,56ghi	35,35
	MFSRB-6SD	502,14	907,45	723,81ghi	31,5
	MFSRB-8SD	391,67	1226,38	757,42hi	58
	Ukupno	366,32	1226,38	723,81	34,7
<i>M. polystroma</i>	MPSRB-2G	244,38	822,42	547,6def	23,01
	MPSRB-20	344,31	857,13	664,57efghi	16,81
	MPSRB-13	453,34	865,56	668,44efghi	22,99
	MP-13	353,6	1022,32	644,53efghi	29,36
	MPSRB-3	391,51	851,59	647,81efghi	18,11
	MPSRB-2	408,74	876,76	643,41efghi	27,66
	MPSRB-36	321,56	1100,33	596,83efgh	22,56
	MPSRB-6	359,79	812,2	512,06cde	33,73
	MPSRB-21	467,67	804,13	677,43fghi	17,64
	Ukupno	244,38	1022,32	622,52	8,17
<i>M. laxa</i>	MLX-SV1	145,68	387,9	270,58ab	27,53
	MLX-7	64,54	419,03	225,19a	13,53
	MLX-13	161,11	562,97	268,98ab	13,15
	MLX-24	139,08	750,9	403,53bcd	25,1
	Ukupno	64,54	750,9	292,07	11,64
<i>M. fructicola</i>	MFC-1	610,76	852,67	722,74ghi	20
	MFC-28	400,54	876,9	604,84efgh	30,13
	MFC-20	239,77	1079,39	544,83def	33,8
	Ukupno	239,77	1079,39	624,14	22,08
Referentni izolati	MCG ¹	nt	nt	nt	nt
	0603202046 ²	435,76	789,12	583,68efg	24,95
	PD20.96 ³	101,23	553,32	376,04abc	33,2
	C-28 ³	145,8	478,4	256,36ab	25,79
	a-100 ⁴	411,5	767,5	628,16efgh	31,29

Legenda: Min-najmanja izmerena veličina; Max-najveća izmerena veličina; nt-nije testiran; ¹*M. fructigena*, ²*M. polystroma*, ³*M. laxa* i ⁴*M. fructicola*; Istim slovima su označene grupe u kolonama između kojih nije uočena statistički značajna razlika Tukey HSD testom ($p < 0,001$).



Grafik 9. Ukupna dužina obrazovanih inicijalnih hifa izolata *M. fructigena*, *M. polystroma*, *M. fructicola* i *M. laxa*.



Grafik 10. Ukupna dužina obrazovanih inicijalnih hifa vrsta *M. fructigena* (MF), *M. fructicola* (MFX), *M. laxa* (MLX) i *M. polystroma* (MP).

Međusobnim poređenjem ukupnih dužina inicijalnih hifa utvrđena je statistički značajna razlika ($p < 0,001$) između ispitivanih *Monilinia* vrsta. Ukupna dužina inicijalnih hifa je bila najduža kod *M. fructigena*, najkraća kod *M. laxa*, dok se dužina nije statistički značajno razlikovala kod *M. polystroma* i *M. fructicola* ($p = 0,579$) (Tabela 19).

Tabela 19. Statistički značajna razlika ukupnih dužina inicijalnih hifa vrsta *M. fructigena* (MF), *M. polystroma* (MP), *M. laxa* (MLX) i *M. fructicola* (MFC).

(I) Klasa vrste	(J) Klasa vrste	Razlika srednjih vrednosti (I-J)	SE	p
MF	MP	96,67594*	14,03073	0
	MLX	426,20933*	15,91799	0
	MFC	119,92734*	19,73934	0
MP	MF	-96,67594*	14,03073	0
	MLX	329,53340*	14,00204	0
	MFC	23,25141	18,22954	0,579
MLX	MF	-426,20933*	15,91799	0
	MP	-329,53340*	14,00204	0
	MFC	-306,28199*	19,71895	0
MFC	MF	-119,92734*	19,73934	0
	MP	-23,2514	18,22954	0,579
	MLX	306,28199*	19,71895	0

Legenda: * Postoji statistički značajna razlika Tukey HSD testom ($p < 0,001$); SE- standardana greška sredine; p-statistička značajnost.

Međusobnim poređenjem ukupnih dužina inicijalnih hifa svih testiranih izolata utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika ($p < 0,001$) između izolata *Monilinia* spp. (Tabela 18). Izolati *M. laxa* obrazovali su kraće inicijalne hife od ostalih izolata vrsta *M. fructigena*, *M. fructicola* i *M. polystroma*. Utvrđeno je da većina izolata *M. polystroma* i pojedini izolati *M. fructicola* mogu da obrazuju inicijalne hife dužine kao *M. fructigena*.

Dužine inicijalnih hifa od konidije do mesta grananja izolata *Monilinia* spp.

Dužine inicijalnih hifa od konidije do mesta grananja izolata *Monilinia* spp. prikazane su u Tabeli 20 i Grafiku 11 i 12. Prosečna dužina inicijalnih hifa do prvog grananja ispitivanih izolata *M. fructigena* iznosila je 67,03 μm . Najbliže grananje inicijalnih hifa od 44,03 μm imao je izolat MFSRB-6SD, dok je grananje inicijalnih hifa

izolata MFSRB-22 bilo na najvećoj prosečnoj dužini od 92,55 μm . Grananje inicijalnih hifa ostalih izolata bilo je na udaljenosti od 56,27-77,06 μm .

Prosečna dužina inicijalnih hifa do prvog grananja izolata *M. polystroma* iznosila je 85,87 μm . Izolati *M. polystroma* ispoljili su variranje u udaljenosti obrazovanih bočnih grana na inicijalnim hifama. Najmanja prosečna dužina inicijalnih hifa do prvog grananja iznosila je 72,69 μm i bila je utvrđena kod izolata MPSRB-20, dok je najveća od 105,64 μm bila utvrđena kod izolata MPSRB-3. Grananje inicijalnih hifa ostalih izolata bilo je na udaljenosti od 73,07-102,53 μm . Grananje inicijalnih hifa referentnog izolata 0603202046 bilo je na prosečnoj dužini od 133,21 μm .

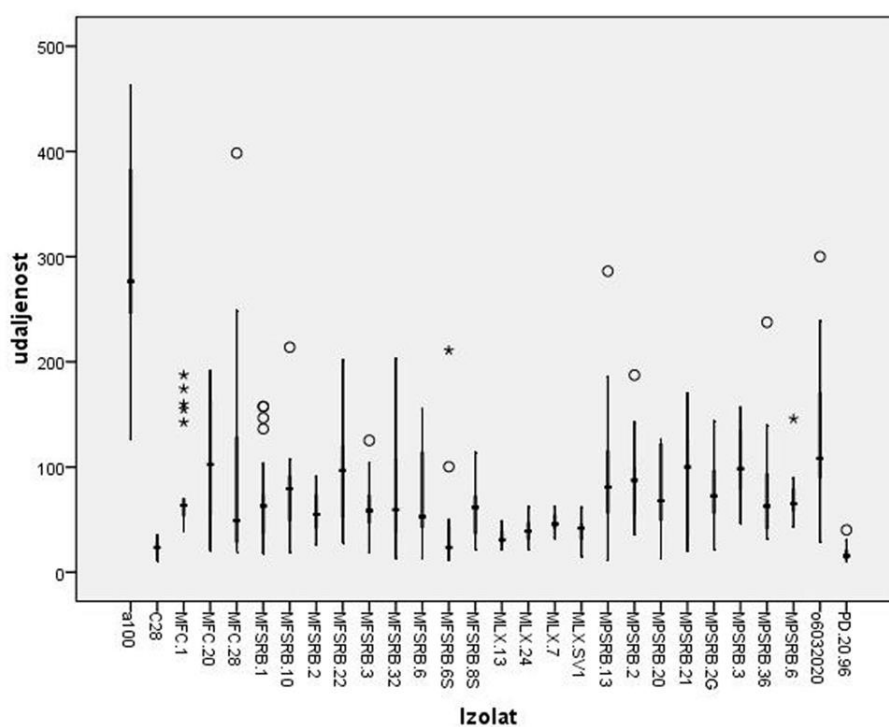
Prosečna dužina inicijalnih hifa do prvog grananja izolata *M. laxa* iznosila je 33,99 μm . Najmanja prosečna dužina inicijalnih hifa do prvog grananja iznosila je 33,13 μm i bila je utvrđena kod izolata MLX-13, dok je najveća od 46,86 μm bila utvrđena kod izolata MLX-7. Grananje inicijalnih hifa ostalih izolata bilo je na prosečnoj udaljenosti od 39,79-40,2 μm . Grananje inicijalnih hifa referentnog izolata C-28, bilo je na prosečnoj dužini od 23,55 μm , a izolata PD20.96 bilo na dužini od 19,07 μm .

Prosečna dužina inicijalnih hifa do prvog grananja izolata *M. fructicola* iznosila je 95,98 μm . Najmanja prosečna dužina inicijalnih hifa do prvog grananja od 82,13 μm je utvrđena kod izolata MFC-1, 100,72 μm kod izolata MFC-20 i najveća od 105,09 μm kod izolata MFC-20. Grananje inicijalnih hifa referentnog izolata a-100 bilo je na prosečnoj dužini od 293,16 μm .

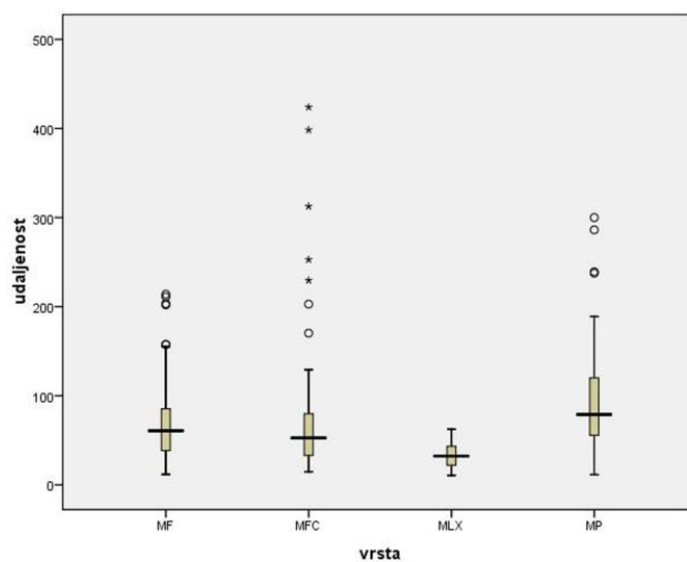
Tabela 20. Dužine inicijalnih hifa od konidija do prvih bočnih grana izolata *M. fructigena*, *M. polystroma*, *M. laxa* i *M. fructicola*.

Vrsta	Dužine inicijalnih hifa do mesta grananja izolata (µm)				
	Izolat	Min	Max	Prosek	Standardna greška
<i>M. fructigena</i>	MFSRB-1	18,17	157,54	65,91abcde	6,14
	MFSRB-10	18,92	213,9	74,74abcde	7,59
	MFSRB-17	nt	nt	nt	nt
	MFSRB-2	26,03	91,01	56,27abcd	6,82
	MFSRB-32	13,56	203,39	73,22abcde	10,68
	MFSRB-6	13,75	155,07	77,06abcde	14,71
	MFSRB-3	18,5	125,33	60,24abcd	4,8
	MFSRB-22	28,34	201,99	92,55bcde	11,15
	MFSRB-6SD	11,74	210,91	44,03abcd	13,16
	MFSRB-8SD	21,48	114,15	59,23abcd	5,33
	Ukupno	11,74	213,9	67,03	2,94
<i>M. polystroma</i>	MPSRB-2G	22,1	143,71	76,45abcde	7,99
	MPSRB-20	13	126,25	72,69abcde	13,36
	MPSRB-13	11,48	286,17	85,90abcde	15,26
	MP-13	43,85	185,86	102,53de	19,03
	MPSRB-3	46,8	156,70	105,64de	12,16
	MPSRB-2	35,64	187,41	87,61abcde	10,75
	MPSRB-36	32,19	237,64	80,19abcde	17,09
	MPSRB-6	43,2	145	73,07abcde	7,57
	MPSRB-21	20	170	88,75bcde	18,94
	Ukupno	11,48	268,17	85,87	4,44
<i>M. laxa</i>	MLX-SV1	15,13	61,87	39,79abcd	4,06
	MLX-7	32,2	62,5	46,86abcd	2,54
	MLX-13	21,5	48,8	33,13abc	2,35
	MLX-24	21,3	62,5	40,2abcd	3,7
	Ukupno	15,13	62,50	33,99	1,73
<i>M. fructicola</i>	MFC-1	29,48	69,65	82,13abcde	10,53
	MFC-28	16,55	398,44	100,72cde	26,72
	MFC-20	14,61	170,25	105,09de	15,13
	Ukupno	14,61	398,44	95,98	17,48
Referentni izolati	MCG ¹	nt	nt	nt	nt
	0603202046 ²	28,83	300	133,21e	18,27
	PD20.96 ³	10,51	40,21	19,07a	2,55
	C-28 ³	10,98	35,15	23,56ab	2,13
	a-100 ⁴	202,8	423,9	293,16f	47,59

Legenda: Min-najmanja izmerena veličina; Max-najveća izmerena veličina; nt-nije testirano; ¹*M. fructigena*, ²*M. polystroma*, ³*M. laxa* i ⁴*M. fructicola*; Istim slovima su označene grupe u kolonama između kojih nije uočena statistički značajna razlika Tukey HSD test (p<0,001).



Grafik 11. Dužina obrazovanih inicijalnih hifa do prvog granja izolata *M. fructigena*, *M. polystroma*, *M. fructicola* i *M. laxa*.



Grafik 12. Dužina inicijalnih hifa do prvog grananja vrsta *M. fructigena* (MF), *M. polystroma* (MP), *M. laxa* (MLX) i *M. fructicola* (MFC).

Međusobnim poređenjem prosečnih dužina inicijalnih hifa do prvih bočnih grana utvrđena je statistički značajna razlika kod svih ispitivanih vrsta ($p < 0,001$) (Tabela 21). Mesto grananja inicijalnih hifa *M. laxa* je bilo na najmanjoj dužini. *M. fructicola* je obrazovala prve bočne grane na najvećoj dužini inicijalnih hifa, a zatim *M. polystroma* i *M. fructigena*.

Tabela 21. Statističko poređenje dužina inicijalnih hifa od konidije do prve bočne grane vrsta *M. fructigena* (MF), *M. polystroma* (MP), *M. laxa* (MLX) i *M. fructicola* (MFC).

(I) Klasa vrste	(J) Klasa vrste	Razlika srednjih vrednosti (I-J)	SE	p
MF	MP	-22,94399*	6,95	0,006
	MLX	33,44561*	8,10485	0
	MFC	-76,06804*	8,38847	0
MP	MF	22,94399*	6,95	0,006
	MLX	56,38960*	8,65075	0
	MFC	-53,12405*	8,91703	0
MLX	MF	-33,44561*	8,10485	0
	MP	-56,38960*	8,65075	0
	MFC	-109,51365*	9,84375	0
MFC	MF	76,06804*	8,38847	0
	MP	53,12405*	8,91703	0
	MLX	109,51365*	9,84375	0

Legenda: *Postoji statistički značajna razlika Tukey HSD testom $p < 0,001$; SE-standardna greška sredine; p-statistička značajnost.

Međusobnim poređenjem prosečnih dužina inicijalnih hifa do prvog grananja utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika ($p < 0,001$) između izolata *Monilinia* spp. (Tabela 20). Izolati *M. laxa*, kao i referentni izolati ove vrste su obrazovali prve bočne grane na najmanjoj dužini inicijalnih hifa. Pojedini izolati *M. fructigena* (MFSRB-6SD, MFSRB-8SD, MFSRB-2 i MFSRB-3) su obrazovali bočne grane inicijalnim hifama na nešto manjoj udaljenosti od konidije, kao i izolati *M. laxa*. Ostali izolati *M. fructigena*, *M. polystroma* i *M. fructicola* su obrazovali bočne grane na većoj udaljenosti. Referentni izolat a-100 je obrazovao bočne grane na najvećoj udaljenosti koja se značajno razlikovala od ostalih izolata *Monilinia* spp. Izolati *M. fructicola* su obrazovali prve bočne grane na inicijalnim hifama na najvećoj udaljenosti od konidije, ali i pojedini izolati *M. polystroma* su obrazovali bočne grane na sličnoj udaljenosti od konidije kao i izolati *M. fructicola*.

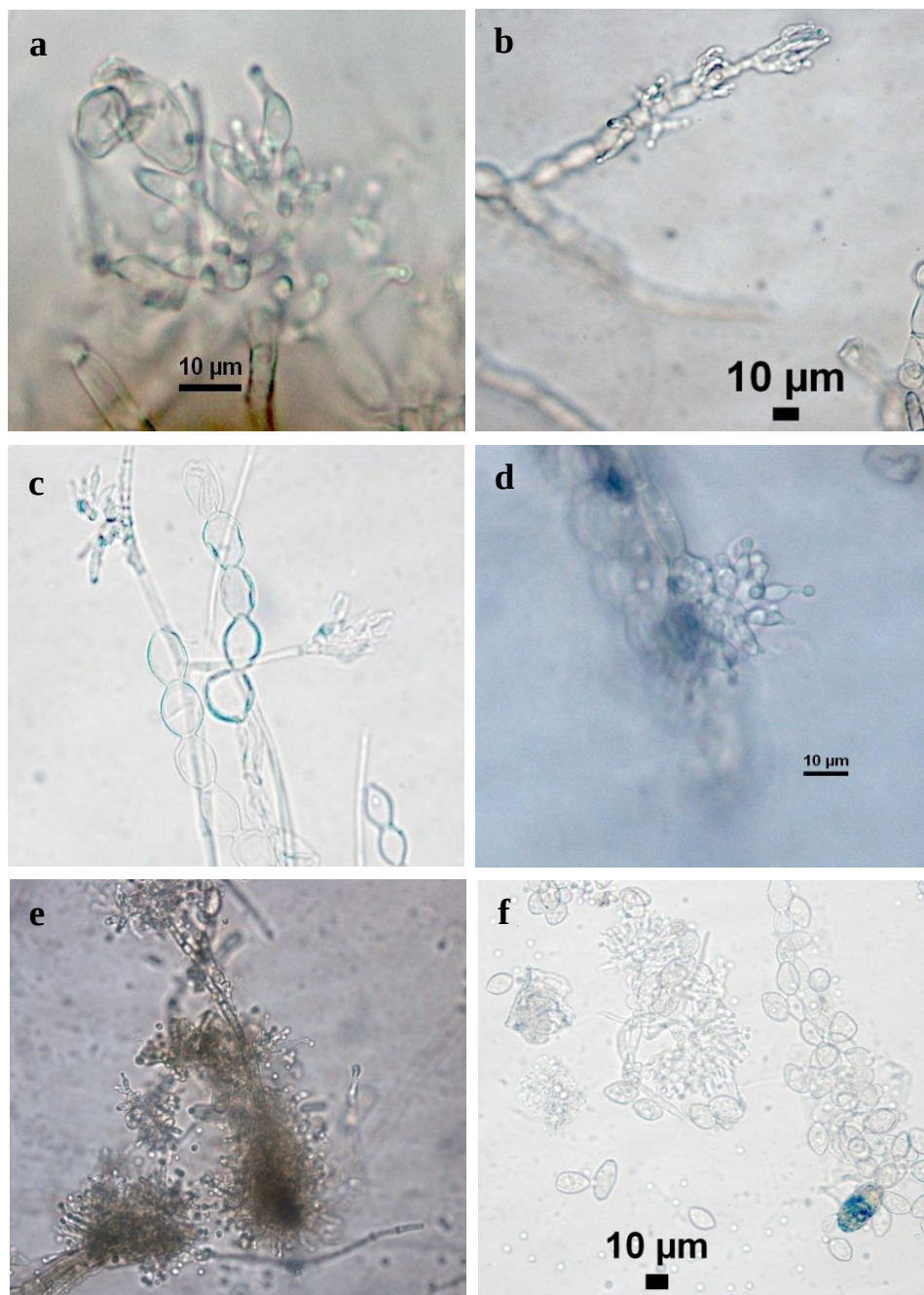
Mikrokonidije izolata *Monilinia* spp.

Većina ispitivanih izolata je nakon tri nedelje inkubacije obrazovala mikrokonidije na hranljivim podlogama. Izolati *M. fructicola* su obrazovali mikrokonidije u vidu grupica crne boje koje su bile neravno raspoređene na površini kolonija odgajanih na KDA podlozi (Slika 20). Za razliku od *M. fructicola*, izolati *M. fructigena*, *M. polystroma* i *M. laxa* su obrazovali mikrokonidije na V8 podlozi, a koje nisu bile vidljive golim okom.

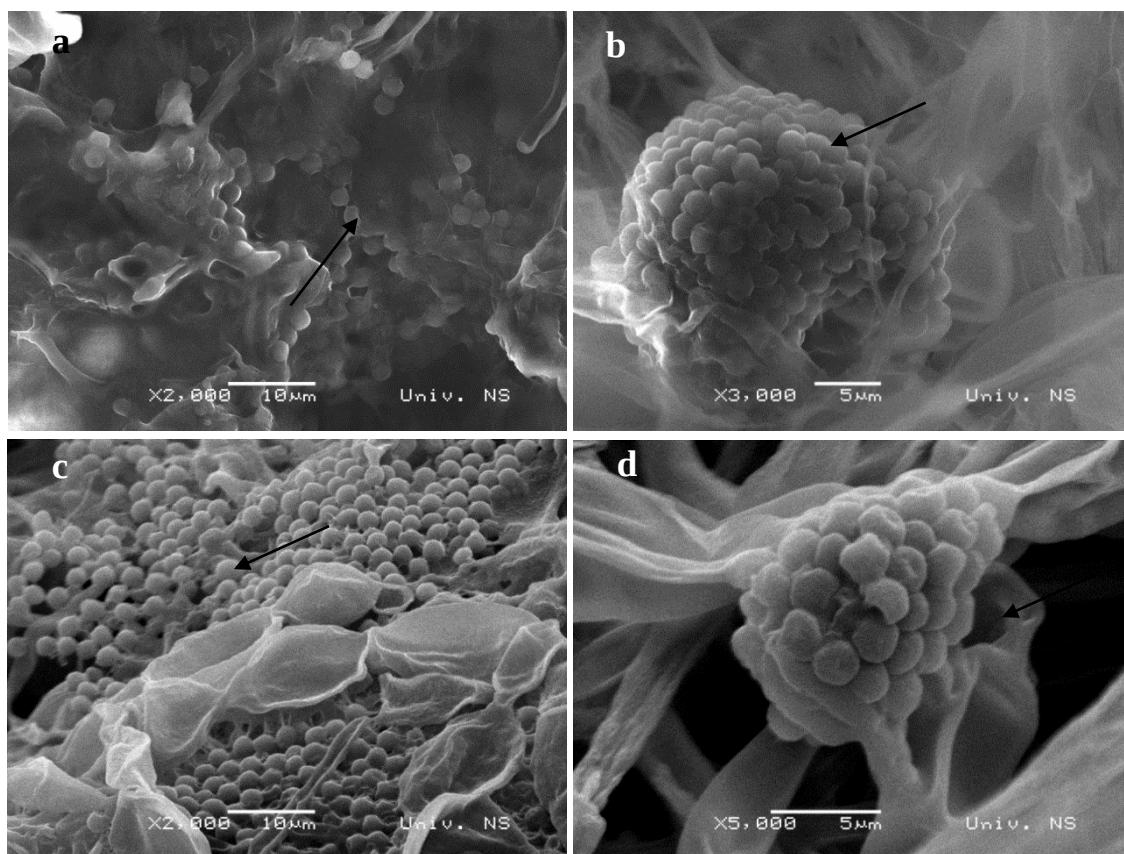


Slika 20. Mikrokonidije izolata MFC-1 vrste *M. fructicola* posle tri nedelje inkubacije na KDA podlozi (Strelice označavaju mesta formiranja mikrokonidija).

Posmatranjem pod svetlosnim i skening elektronskim mikroskopom mikrokonidijski stadijum svih proučavanih izolata se nije morfološki razlikovao (Slika 21 i 22). Mikrokonidije su se formirale na fialidama. Pojedinačne ili grupe fialida su se obrazovale na vegetativnim hifama ili lancima konidija. Fialide su bile flašolike, često asimetrične, a pri vrhu su bile jako sužene, prave do blago povijene. Mikrokonidije su bile jednoćeliške, okruglaste i hijalinske.



Slika 21. Mikrokonidije na fialidama kod *M. fructigena* (a-c), *M. polystroma* (d), *M. laxa* (e) i *M. fructicola* (f).



Slika 22. SEM mikrografija mikrokonidijskog stadijuma izolata MPSRB-3 vrste *M. polystroma* (a, b) i izolata MFSRB-1 vrste *M. fructigena* (c, d) obrazovanih na V8 podlozi u uslovima veštačke smene dana i noći (12 h / 12 h) pri temperaturi od 22°C posle 15 dana inkubacije (Strelice pokazuju obrazovanje individualnih mikrokonidija (a, c) i mikrokonidija formiranih na fijalidama u grupama (b, d).

Veličine mikrokonidija izolata *M. fructigena* iznosile su 2,27-3,56 μm (prosek 2,89 μm), izolata *M. polystroma* 2,19-3,44 μm (prosek 2,73 μm), izolata *M. laxa* 2,18-4,63 μm (prosek 2,99 μm) i izolata *M. fructicola* 2,29-3,84 μm (prosek 2,83 μm) (Tabela 23).

Tabela 22. Veličina mikrokonidija izolata *M. fructigena*, *M. polystroma*, *M. fructicola* i *M. laxa*.

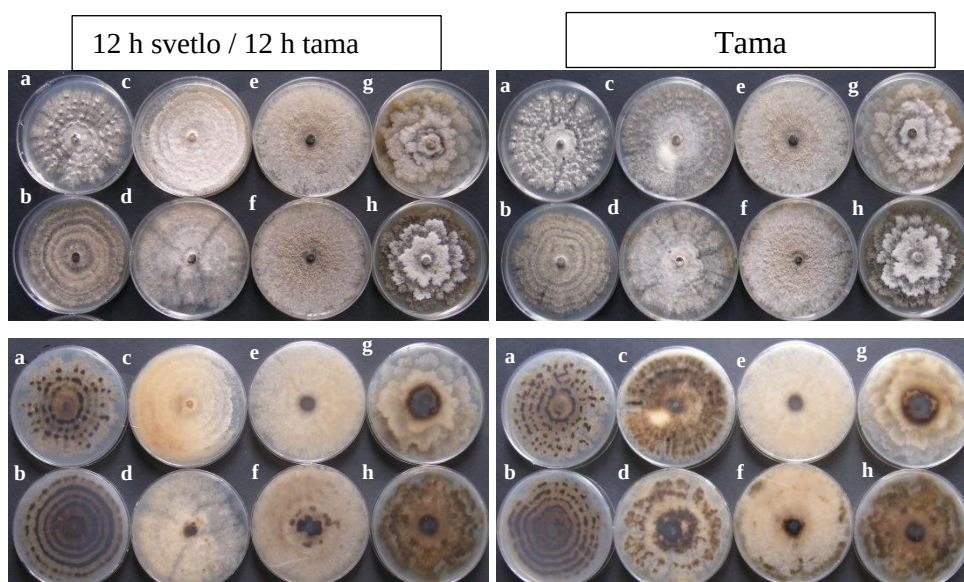
Vrsta	Izolat	Veličine mikrokonidija (μm)			
		Min	Max	Prosek	Standardna greška
<i>M. fructigena</i>	MFSRB-1	2,27	3,22	2,67	0,05
	MFSRB-10	2,51	3,48	2,96	0,04
	MFSRB-17	nt	nt	nt	nt
	MFSRB-2	2,62	3,97	3,12	0,04
	MFSRB-32	2,53	3,48	2,90	0,04
	MFSRB-6	2,36	3,56	2,84	0,05
	MFSRB-3	2,49	3,26	2,88	0,03
	MFSRB-22	2,39	3,42	2,89	0,03
	MFSRB-6SD	nt	nt	nt	nt
	MFSRB-8SD	nt	nt	nt	nt
	Ukupno	2,27	3,97	2,89	0,04
<i>M. polystroma</i>	MPSRB-2G	2,43	3,61	2,79	0,03
	MPSRB-20	2,29	3,46	2,65	0,03
	MPSRB-13	2,38	3,26	2,76	0,04
	MP-13	2,19	3,15	2,64	0,03
	MPSRB-3	2,42	3,57	2,72	0,05
	MPSRB-2	2,39	3	2,66	0,03
	MPSRB-36	2,43	3,26	2,78	0,03
	MPSRB-6	nt	nt	nt	nt
	MPSRB-21	nt	nt	nt	nt
	Ukupno	2,19	3,61	2,71	0,03
<i>M. laxa</i>	MLX-SV1	2,26	3,5	2,88	0,07
	MLX-7	2,31	4,22	3,18	0,06
	MLX-13	2,18	4,63	2,98	0,09
	MLX-24	nt	nt	nt	nt
	Ukupno	2,18	4,63	3,01	0,07
<i>M. fructicola</i>	MFC-1	2,29	3,66	2,79	0,06
	MFC-28	nt	nt	nt	nt
	MFC-20	2,36	3,84	2,87	0,04
	Ukupno	2,29	3,84	2,83	0,05
Referentni izolati	MCG ¹	nt	nt	nt	nt
	0603202046 ²	nt	nt	nt	nt
	PD20.96 ³	nt	nt	nt	nt
	C-28 ³	2,01	3,86	2,84	0,07
	a-100 ⁴	nt	nt	nt	nt

Legenda: Min-najmanja izmerena veličina; Max-najveća izmerena veličina; nt-nije testirano; ¹*M. fructigena*, ²*M. polystroma*, ³*M. laxa* i ⁴*M. fructicola*.

5.3. Ekološke i odgajivačke osobina izolata *Monilinia* spp.

5.3.1. Uticaj svetlosnih režima na porast i sporulaciju izolata *Monilinia* spp.

Različiti svetlosni režimi nisu uticali na promene u morfološkim osobinama izolata *M. fructigena*, *M. polystroma*, *M. fructicola* i *M. laxa* (Slika 23). Osim kod izolata *M. fructigena* kod kojih je uočena intenzivnija stromatizacija kultura inkubiranih u tami.



Slika 23. Kolonija izolata *Monilinia* spp. pri različitim svetlosnim režimima (a-MPSRB-36; b-MPSRB-20; c-MFSRB-17; d-MFSRB-22; e-MFC-1; f-MFC-20; g-MLX-13; h-MLX-24; gornji red-lice kolonija, donji red-naličje kolonija).

Prosečan dnevni porast ispitivanih izolata *Monilinia* spp. prikazan je u Tabeli 23 i Grafiku 13. Kod svih ispitivanih izolata *Monilinia* spp. najsporiji prosečni dnevni porast je bio u svetlosnom režimu 12 h UV / 12 h tama. U svetlosnim režimima 12 h svetlo / 12 h tama i tama nije postojala statistički značajna razlika u porastu kolonija izolata. Osim kod izolata MPSRB-36 koji je imao veći prosečni dnevni porast pri 12 h svetlo / 12 h tama. Od svih ispitivanih izolata jedino izolat MFSRB-6 vrste *M. fructigena* nije ispoljio variranje u prosečnom dnevnom porastu u svim svetlosnim režimima (Tabela 23; Grafik 13). U svim svetlosnim režimima najbrži prosečni dnevni porast su ispoljili izolati *M. fructicola*.

Pri svetlosnom režimu 12 h svetlo / 12 h tama izolati *M. fructigena* su imali prosečan dnevni porast od 1,63-11,67 mm, u tami od 2,88-11,29 mm, u 12 h UV svetlo / 12 h tama od 1,13-2,7 mm.

Pri svetlosnom režimu 12 h svetlo / 12 h tama izolati *M. polystroma* su imali prosečan dnevni porast od 7,78-8,89 mm, u tami od 5,71-8,56 mm, a u režimu 12 h UV svetlo / 12 h tama od 0,59-1,4 mm.

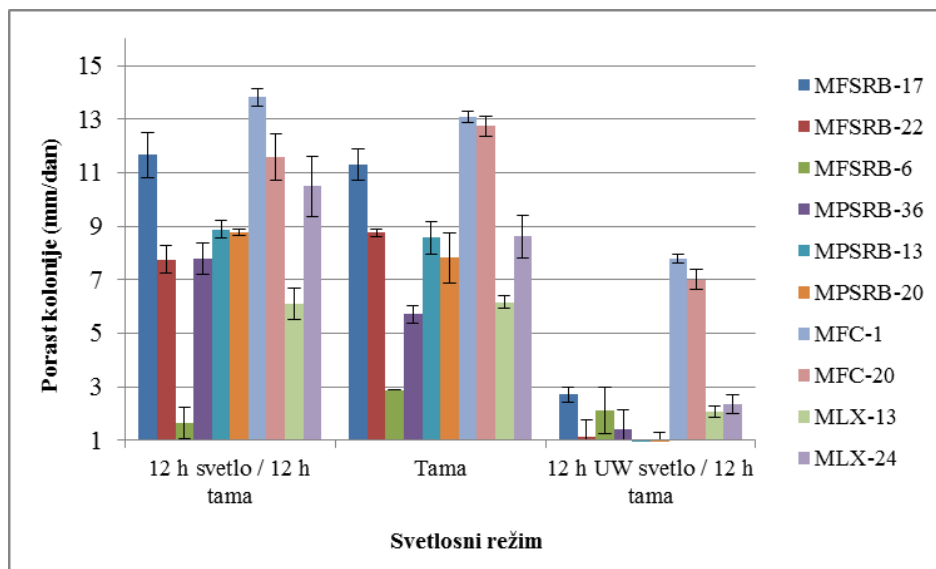
Pri svetlosnom režimu 12 h svetlo / 12 h tama izolati *M. laxa* su imali prosečan dnevni porast od 6,08-10,50 mm, u tami od 6,17-8,62 mm, a u režimu 12 h UV svetlo / 12 h tama od 2,06-2,36 mm.

Pri svetlosnom režimu 12 h svetlo / 12 h tama izolati *M. fructicola* su imali prosečan dnevni porast od 11,58-13,83 mm, u tami od 12,75-13,08 mm / danu, a u režimu 12 h UV svetlo / 12 h tama od 7,01-7,79 mm.

Tabela 23. Uticaj različitih svetlosnih režima na porast kolonija izolata *Monilinia* spp.

Vrsta	Izolat	Prosečni dnevni porast kolonija (mm / dan $\pm$ SE)		
		12 h svetlo / 12 h tama	Tama	12 h UV svetlo / 12 h tama
<i>M. fructigena</i>	MFSRB-17	11,67 $\pm$ 0,85b	11,29 $\pm$ 0,59b	2,7 $\pm$ 0,30a
	MFSRB-22	7,75 $\pm$ 0,51b	8,75 $\pm$ 0,14b	1,13 $\pm$ 0,65a
	MFSRB-6	1,63 $\pm$ 0,59a	2,88 $\pm$ 0,01a	2,11 $\pm$ 0,86a
<i>M. polystroma</i>	MPSRB-36	7,78 $\pm$ 0,58c	5,71 $\pm$ 0,33b	1,4 $\pm$ 0,74a
	MPSRB-13	8,89 $\pm$ 0,32b	8,56 $\pm$ 0,61b	0,59 $\pm$ 0,04a
	MPSRB-20	8,77 $\pm$ 0,12b	7,81 $\pm$ 0,94b	0,65 $\pm$ 0,65a
<i>M. fructicola</i>	MFC-1	13,83 $\pm$ 0,33b	13,08 $\pm$ 0,22b	7,79 $\pm$ 0,17a
	MFC-20	11,58 $\pm$ 0,88b	12,75 $\pm$ 0,37b	7,01 $\pm$ 0,39a
<i>M. laxa</i>	MLX-13	6,08 $\pm$ 0,58b	6,17 $\pm$ 0,22b	2,06 $\pm$ 0,21a
	MLX-24	10,50 $\pm$ 0,95b	8,62 $\pm$ 0,79b	2,36 $\pm$ 0,35a

Legenda: Istim slovima su označene grupe u redovima između kojih nije uočena statistički značajna razlika Tukey HSD testom ($p < 0,05$); SE-standardana greška sredine.



Grafik 13. Uticaj različitih svetlosnih režima na porast kolonija izolata *Monilinia* spp. Legenda: Vertikalni bar označava standardnu grešku sredine. Izolati *M. fructigena*-MFSRB-17, MFSRB-22 i MFSRB-6; Izolati *M. polystroma*: MPSRB-36, MPSRB-13 i MPSRB-20; Izolati *M. fructicola*: MFC-1 i MFC-20; Izolati *M. laxa*: MLX-13 i MLX-24.

Izolati *M. fructigena*, *M. polystroma* i *M. laxa* nisu sporulisali ni u jednom svetlosnom režimu (Tabela 24). Izolati *M. fructicola* su sporulisali u svim testiranim svetlosnim režimima i nije uočena statistički razlika u intenzitetu sporulacije ispitivanih izolata. Intenzitet sporulacije izolata MFC-1 u svetlosnom režimu 12 h svetlo / 12 h tama iznosio je 4,86 log broja konidija / cm² kolonije, a izolata MFC-20 4,89 log broja konidija / cm² kolonije. Intenzitet sporulacije izolata MFC-1 u uslovima tame iznosio je 4,81 log broja konidija / cm² kolonije, a izolata MFC-20 4,76 log broja konidija / cm² kolonije. Intenzitet sporulacije izolata MFC-1 u svetlosnom režimu 12 h UV svetlo / 12 h tama iznosio je 4,91 log broja konidija / cm² kolonije i 4,96 log broja konidija / cm² kolonije izolata MFC-20.

Tabela 24. Uticaj različitih svetlosnih režima na intenzitet sporulacije izolata *Monilinia* spp.

Vrsta	Izolat	Intenzitet sporulacije (log broja spora / cm ² kolonije ± SE)		
		12 h svetlo / 12 h tama	Tama	12 h UV svetlo / 12 h tama
<i>M. fructigena</i>	MFSRB-17	0	0	0
	MFSRB-22	0	0	0
	MFSRB-6	0	0	0
<i>M. polystroma</i>	MPSRB-36	0	0	0
	MPSRB-13	0	0	0
	MPSRB-20	0	0	0
<i>M. fructicola</i>	MFC-1	4,86±0,71a	4,81±0,65a	4,91±0,89a
	MFC-20	4,89±0,42a	4,76±0,78a	4,96±0,59a
<i>M. laxa</i>	MLX-13	0	0	0
	MLX-24	0	0	0

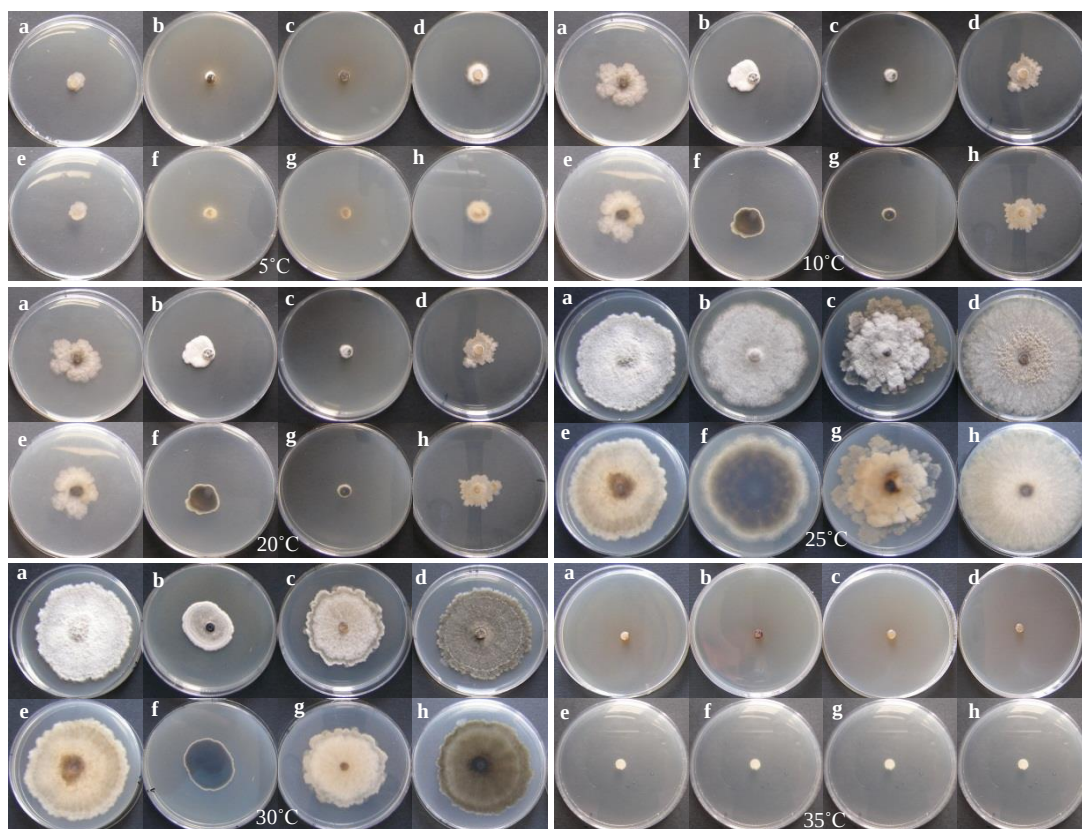
Legenda: Istim slovima su označene grupe u redovima između kojih nije uočena statistički značajna razlika Tukey HSD testom ($p < 0,05$); SE-standardana greška sredine.

5.3.2. Uticaj različitih temperatura na porast i sporulaciju izolata *Monilinia* spp.

Uticaj različitih temperatura na porast i morfološke osobine kolonija izolata *Monilinia* spp. prikazan je u na Slici 24. *M. fructigena* i *M. polystroma* nisu ispoljili variranje u morfološkim osobinama kolonija pri uticaju različitih temperatura (Slika 24).

Izolati *M. laxa* su pri 20°C i 25°C formirali kolonije sivkaste boje, reznjevitog oboda sa izgledom rozete, a pri 5°C, 10°C, 15°C i 30°C kolonije su bile sivkaste boje, blago talasastog oboda i bez izgleda rozete.

Izolati *M. fructicola* su pri 20°C i 25°C formirali kolonije svetlo sive boje, ravnog oboda, dok su mase spora bile obrazovane na vazdušnoj miceliji. Pri 30°C kolonije su bile tamno sive boje i ravnog oboda. Pri temperaturama 5°C, 10°C i 15°C kolonije su bile svetlo sive boje, ali je sporulacija u vidu masa spora raspoređenih na površini vazdušne kolonije bila sporadična.



Slika 24. Uticaj temperatura na porast kolonija izolata *Monilinia* spp. (a, e-MFSRB-17; b, f-MPSRB-36; c, g-MLX-24; d, h-MFC-1; a-d-lice kolonije; e-h-naličje kolonije).

Prosečni dnevni porast izolata *Monilinia* spp. prikazan je u Tabeli 25 i Grafiku 14. Ispitivani izolati *Monilinia* spp. su rasli na svim testiranim temperaturama osim pri 35°C. Najmanji prosečan dnevni porast utvrđen je pri 5°C, a sa povećanjem temperature za 5°C, uočeno je povećanje porasta kolonija izolata. Najpovoljnija temperatura za porast izolata bila je 25°C. Dobar porast kolonija izolata *M. polystroma* uočen je u temperaturnom opsegu od 15-25°C, a kod ostalih *Monilinia* vrsta od 20-30°C. Pri 30°C nešto manji prosečni dnevni porast kolonija imali su izolati *M. polystroma*.

Prosečan dnevni porast izolata *M. fructigena* pri 5°C iznosio je od 0,23-1,24 mm, pri 10°C od 0,57-3,97 mm, pri 15°C od 1,71-5,29 mm, pri 20°C od 2-8,5 mm, pri 25°C od 2,06-9,59 mm i pri 30°C od 1,47-7,69 mm.

Prosečan dnevni porast izolata *M. polystroma* pri 5°C iznosio je od 0,26-2,83 mm, pri 10°C od 1,16-4,67 mm, pri 15°C od 3,9-7,74 mm, pri 20°C od 7,82-7,95 mm, pri 25°C od 7,75-9,28 mm i pri 30°C od 4,21-5,93 mm.

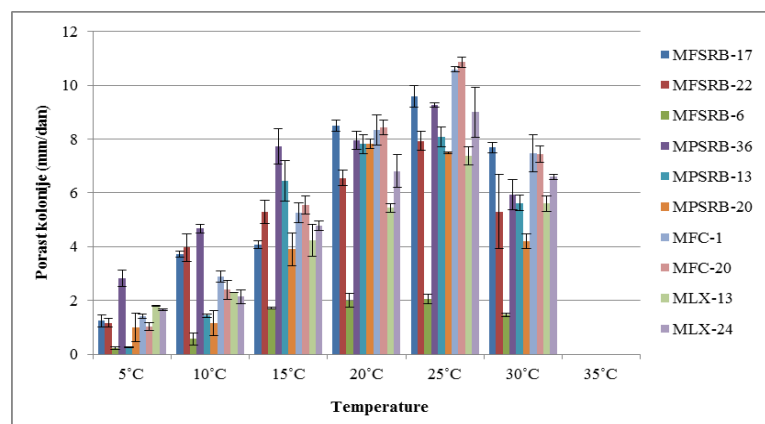
Prosečan dnevni porast izolata *M. laxa* pri 5°C iznosio je od 1,66-1,81 mm, pri 10°C od 2,14-2,28 mm, pri 15°C od 4,24-4,79 mm, pri 20°C od 5,45-6,81 mm, pri 25°C od 7,38-9 mm i pri 30°C od 5,6-6,6 mm.

Prosečan dnevni porast izolata *M. fructicola* pri 5°C iznosio je od 1,02-1,41 mm, pri 10°C od 2,4-2,9 mm, pri 15°C od 5,26-5,55 mm, pri 20°C od 8,35-8,45 mm, pri 25°C od 10,59-10,87 mm i pri 30°C od 7,45-7,47 mm.

Tabela 25. Uticaj različitih temperatura na prosečan dnevni porast kolonija izolata *Monilinia* spp.

Vrsta	Izolat	Prosečni dnevni porast kolonija (mm / dan $\pm$ SE)						
		5°C	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C
<i>M. fructigena</i>	MFSRB-17	1,24 $\pm$ 0,23b	3,73 $\pm$ 0,12c	4,07 $\pm$ 0,15c	8,5 $\pm$ 0,21d	9,59 $\pm$ 0,39e	7,69 $\pm$ 0,19d	0a
	MFSRB-22	1,17 $\pm$ 0,16ab	3,97 $\pm$ 0,52bc	5,29 $\pm$ 0,44cd	6,56 $\pm$ 0,30cd	7,94 $\pm$ 0,36d	5,31 $\pm$ 1,39cd	0a
	MFSRB-6	0,23 $\pm$ 0,04a	0,57 $\pm$ 0,22a	1,71 $\pm$ 0,04ab	2 $\pm$ 0,25b	2,06 $\pm$ 0,18b	1,47 $\pm$ 0,06b	0a
<i>M. polystroma</i>	MPSRB-36	2,83 $\pm$ 0,31b	4,67 $\pm$ 0,17c	7,74 $\pm$ 0,66d	7,95 $\pm$ 0,33d	9,28 $\pm$ 0,08e	5,93 $\pm$ 0,56cd	0a
	MPSRB-13	0,26 $\pm$ 0,02a	1,43 $\pm$ 0,07ab	6,45 $\pm$ 0,76cd	7,82 $\pm$ 0,36d	8,09 $\pm$ 0,37d	5,63 $\pm$ 0,29c	0a
	MPSRB-20	1 $\pm$ 0,53ab	1,16 $\pm$ 0,47ab	3,9 $\pm$ 0,61b	7,82 $\pm$ 0,18de	7,5 $\pm$ 0,03de	4,21 $\pm$ 0,27bc	0a
<i>M. fructicola</i>	MFC-1	1,41 $\pm$ 0,09ab	2,9 $\pm$ 0,21b	5,26 $\pm$ 0,38c	8,35 $\pm$ 0,56d	10,59 $\pm$ 0,10e	7,47 $\pm$ 0,70d	0a
	MFC-20	1,02 $\pm$ 0,15ab	2,4 $\pm$ 0,35ab	5,55 $\pm$ 0,33c	8,45 $\pm$ 0,27de	10,87 $\pm$ 0,19e	7,45 $\pm$ 0,31d	0a
<i>M. laxa</i>	MLX-13	1,81 $\pm$ 0,02b	2,28 $\pm$ 0b	4,24 $\pm$ 0,6c	5,45 $\pm$ 0,16cd	7,38 $\pm$ 0,35e	5,6 $\pm$ 0,30d	0a
	MLX-24	1,66 $\pm$ 0,04a	2,14 $\pm$ 0,25ab	4,79 $\pm$ 0,18bc	6,81 $\pm$ 0,61cd	9 $\pm$ 0,94d	6,6 $\pm$ 1,10cd	0a

Legenda: Istim slovima su označene grupe u redovima između kojih nije uočena statistički značajna razlika Tukey HSD testom ($p < 0,05$); SE-standardna greška sredine.



Grafik 14. Uticaj različitih temperatura na prosečan dnevni porast kolonija izolata *Monilinia* spp. Legenda: Vertikalni bar označava standardnu grešku sredine. Izolati *M. fructigena*-MFSRB-17, MFSRB-22 i MFSRB-6; Izolati *M. polystroma*: MPSRB-36, MPSRB-13 i MPSRB-20; Izolati *M. fructicola*: MFC-1 i MFC-20; Izolati *M. laxa*: MLX-13 i MLX-24.

Izolati *M. fructigena*, *M. polystroma* i *M. laxa* nisu sporulisali ni pri jednoj testiranoj temperaturi. Izolati *M. fructicola* su obrazovali mase spora pri testiranim temperaturama od 5-30°C, pri čemu su slabije sporulisali pri temperaturama od 5°C (1,74-1,97 log broja konidija / cm² kolonije), 10°C (1,98-2,06 log broja konidija / cm² kolonije) i 15°C (2,21-2,27 log broja konidija / cm² kolonije), dok su obilnije sporulisali pri 20°C (4,81-4,99 log broja konidija / cm² kolonije), 25°C (4,86-5,15 log broja konidija / cm² kolonije) i 30°C (4,45-4,65 log broja konidija / cm² kolonije) (Tabela 26).

Tabela 26. Uticaj različitih temperatura na sporulaciju kolonija izolata *Monilinia* spp.

Vrsta	Izolat	Intenzitet sporulacije (log broja spora / cm ² kolonije ± SE)						
		5°C	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C
<i>M. fructigena</i>	MFSRB-17	0	0	0	0	0	0	0
	MFSRB-22	0	0	0	0	0	0	0
	MFSRB-6	0	0	0	0	0	0	0
<i>M. polystroma</i>	MPSRB-36	0	0	0	0	0	0	0
	MPSRB-13	0	0	0	0	0	0	0
	MPSRB-20	0	0	0	0	0	0	0
<i>M. fructicola</i>	MFC-1	1,74±0,12b	1,98±0,19b	2,21±0,22b	4,81±0,72c	4,86±0,82c	4,45±0,92c	0a
	MFC-20	1,97±0,82b	2,06±0,42 b	2,27±0,72bc	4,99±0,87c	5,15±0,97c	4,65±0,43c	0a
<i>M. laxa</i>	MLX-13	0	0	0	0	0	0	0
	MLX-24	0	0	0	0	0	0	0

Legenda: Istim slovima su označene grupe u redovima između kojih nije uočena statistički značajna razlika Tukey HSD testom ($p < 0,05$); SE-standardna greška sredine.

5.3.3. Uticaj različitih hranljivih podloga na porast i sporulaciju izolata *Monilinia* spp.

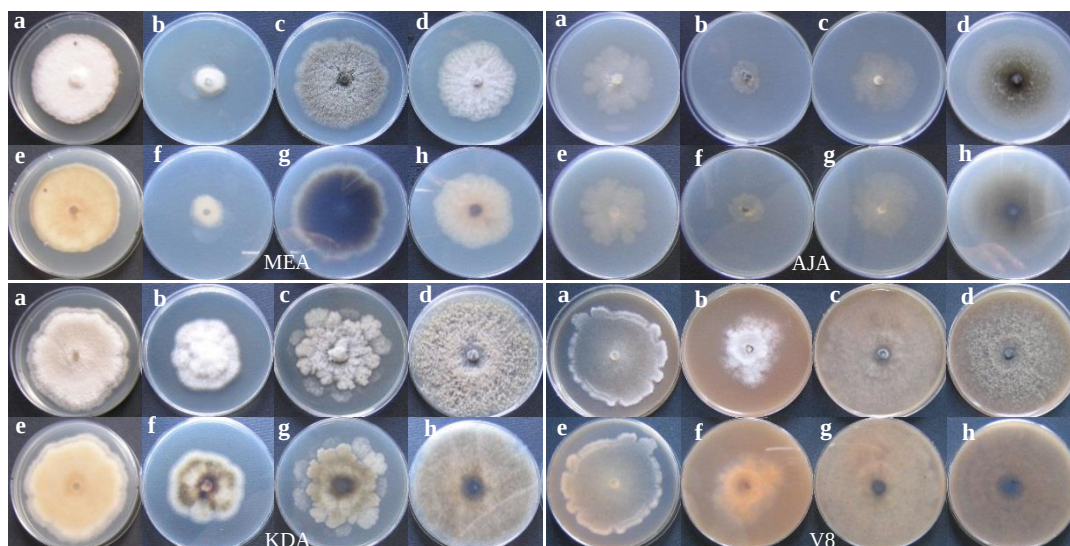
Izolati *Monilinia* spp. su obrazovali kolonije na svim hranljivim podlogama (Slika 25).

Izolati *M. fructigena* su obrazovali kolonije beličaste do sivkaste boje, ravnog oboda na KDA, MEA i V8 podlozi, dok su na AJA i CYA podlozi kolonije bile slabije razvijene.

Izolati *M. polystroma* su obrazovali dobro razvijene kolonije ravnog oboda na KDA, MEA i V8 podlozi, dok su na AJA i CYA podlozi kolonije bile slabije razvijene. Na naličju Petri kutija bila je vidljiva pigmentacija kolonija izolata *M. polystroma* u vidu crne boje.

Izolati *M. laxa* su na KDA i MEA podlozi obrazovali kolonije sive boje, režnjevito oboda i izgleda rozete. Na AJA, CYA i V8 podlozi izolati *M. laxa* obrazovali slabije razvijene kolonije, sive boje i koje nisu bile režnjevito oboda i izgleda rozete.

Izolati *M. fructicola* su obrazovali karakteristične kolonije sive boje ravnog oboda na KDA, MEA i V8 podlozi sa obilnom sporulacijom, dok su na AJA i CYA podlozi kolonije bile slabije razvijene.



Slika 25. Uticaj hranljivih podloga na porast kolonija izolata *Monilinia* spp. Legenda: a, e-MFSRB-17; b, f-MPSRB-36; c, g-MLX-24; d, h-MFC-1; MEA-podloga od slada; AJA-podloga od soka jabuke; KDA-podloga od krompir dekstroznog agara; V8-podloga od soka paradajza; a-d-lice kolonija; e-h-naličje kolonija.

Prosečan dnevni porast kolonija ispitivanih izolata na različitim hranljivim podlogama prikazan je u Tabeli 27 i Grafiku 15. Izolati *M. fructigena*, *M. polystroma*, *M. fructicola* i *M. laxa* su ispoljili najbrži prosečni dnevni porast kolonije na V8 i KDA podlozi, dok su na AJA i CYA podlozi sporije rasli. Među izolatima *M. fructigena* izolat MFSRB-6 nije ispoljio statistički značajnu razliku u porastu kolonije na različitim hranljivim podlogama.

Prosečan dnevni porast izolata *M. fructigena* na MEA podlozi iznosio je od 1,93-6,93 mm, na AJA od 0,96-6,83 mm, na KDA podlozi od 1,29-10,71 mm, na CYA podlozi 0,74-7,19 mm i na V8 podlozi od 1,33-11,92 mm.

Prosečan dnevni porast izolata *M. polystroma* na MEA podlozi iznosio je od 4,36-5,02 mm, na AJA podlozi od 3,18-4,71 mm, na KDA podlozi od 6,12-7,81 mm, na CYA podlozi od 3,4-4,45 mm i na V8 podlozi od 7,68-8,14 mm.

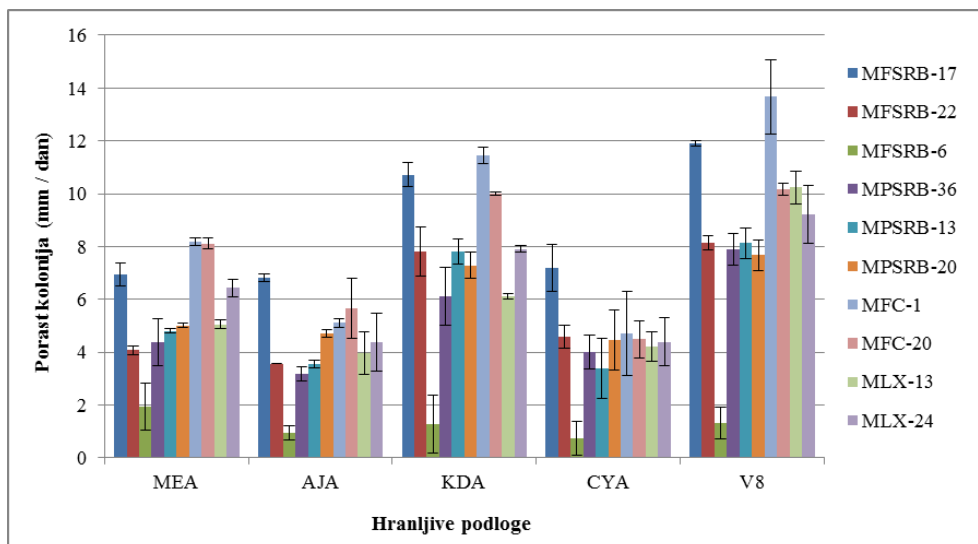
Prosečan dnevni porast izolata *M. laxa* na MEA podlozi iznosio je od 5,05-6,43 mm, na AJA podlozi od 3,98-4,38 mm, na KDA podlozi od 6,11-7,9 mm, na CYA podlozi 4,22-4,39 mm i na V8 podlozi od 9,21-10,23 mm.

Prosečan dnevni porast izolata *M. fructicola* na MEA podlozi iznosio je od 8,12-8,17 mm, na AJA od 5,11-5,67 mm, na KDA podlozi od 10,02-11,45 mm, na CYA podlozi 4,49-4,72 mm i na V8 podlozi od 10,17-13,67 mm / danu.

Tabela 27. Uticaj hranljivih podloga na prosečan dnevni porast kolonije izolata *Monilinia* spp.

Vrsta	Izolat	Prosečni dnevni porast kolonija (mm / dan $\pm$ SE)				
		MEA	AJA	KDA	CYA	V8
<i>M. fructigena</i>	MFSRB-17	6,93 $\pm$ 0,43a	6,83 $\pm$ 0,14a	10,71 $\pm$ 0,25bc	7,19 $\pm$ 0,37a	11,92 $\pm$ 0,08c
	MFSRB-22	4,07 $\pm$ 0,15ab	3,56 $\pm$ 0,54a	7,81 $\pm$ 0,92bc	4,59 $\pm$ 0,42ab	8,15 $\pm$ 0,26c
	MFSRB-6	1,93 $\pm$ 0,46ab	0,96 $\pm$ 0,58a	1,29 $\pm$ 0,10ab	0,74 $\pm$ 0,36a	1,33 $\pm$ 0,41ab
<i>M. polystroma</i>	MPSRB-36	4,36 $\pm$ 0,89ab	3,18 $\pm$ 0,27a	6,12 $\pm$ 1,09bc	3,99 $\pm$ 0,64a	7,88 $\pm$ 0,60c
	MPSRB-13	4,81 $\pm$ 0,10ab	3,55 $\pm$ 0,14a	7,81 $\pm$ 0,49bc	3,4 $\pm$ 1,14a	8,14 $\pm$ 0,58bc
	MPSRB-20	5,02 $\pm$ 0,15ab	4,71 $\pm$ 0,16a	7,28 $\pm$ 0,31c	4,45 $\pm$ 1,59a	7,68 $\pm$ 1,41cd
<i>M. fructicola</i>	MFC-1	8,17 $\pm$ 0,19b	5,11 $\pm$ 1,13a	11,45 $\pm$ 0,06cd	4,72 $\pm$ 0,70a	13,67 $\pm$ 0,22d
	MFC-20	8,12 $\pm$ 0,16b	5,67 $\pm$ 0,8a	10,02 $\pm$ 0,11cd	4,49 $\pm$ 0,55a	10,17 $\pm$ 0,63d
<i>M. laxa</i>	MLX-13	5,05 $\pm$ 0,33bc	3,98 $\pm$ 1,11a	6,11 $\pm$ 0,13cd	4,22 $\pm$ 0,90ab	10,23 $\pm$ 1,1e
	MLX-24	6,43 $\pm$ 0,07b	4,38 $\pm$ 0,94a	7,90 $\pm$ 0,10bc	4,39 $\pm$ 0,52a	9,21 $\pm$ 0,29cd

Legenda: Istim slovima su označene grupe u redovima redizmeđu kojih nije uočena statistički značajna razlika Tukey HSD test ($p < 0,05$); MEA-podloga od slada; AJA-podloga od soka jabuke; KDA-podloga od krompir dekstroznog agara; CYA-Čapekova podloga; V8-podloga od soka paradajza; SE-standardna greška sredine.



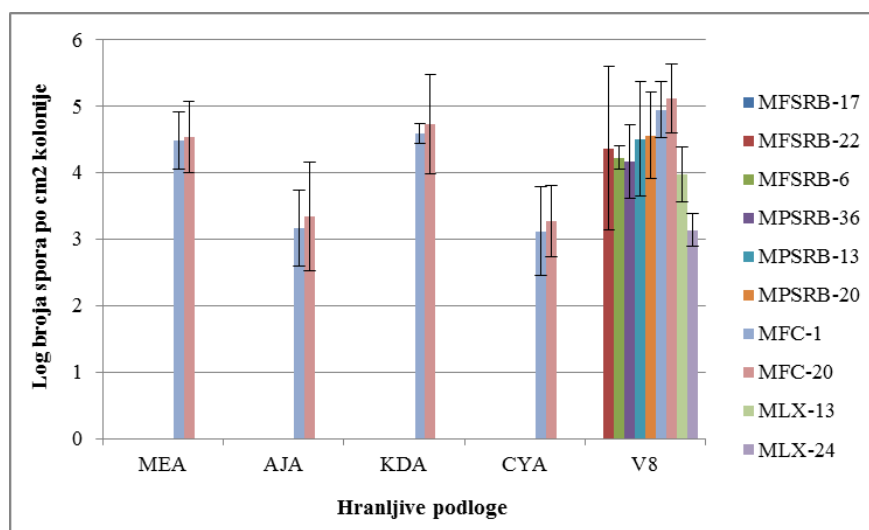
Grafik 15. Uticaj hranljivih podloga na porast kolonije izolata *Monilinia* spp. Legenda: Vertikalni bar označava standardnu grešku sredine; MEA-podloga od slada; AJA-podloga od soka jabuke; KDA-podloga od krompir dekstroznog agara; CYA-Čapekova podloga; V8-podloga od soka paradajza; Vertikalni bar označava standardnu grešku sredine; Izolati *M. fructigena*-MFSRB-17, MFSRB-22 i MFSRB-6; Izolati *M. polystroma*: MPSRB-36, MPSRB-13 i MPSRB-20; Izolati *M. fructicola*: MFC-1 i MFC-20; Izolati *M. laxa*: MLX-13 i MLX-24.

Izolati *M. fructigena*, *M. polystroma* i *M. laxa* su sporulisali samo na podlozi od V8 agara, ali ne i na KDA, CYA, AJA i MEA podlogama (Tabela 28 i Grafik 16). Intenzitet sporulacije na V8 podlozi izolata *M. fructigena* iznosio je 4,23-4,37 log broja konidija / po cm² kolonije, izolata *M. polystroma* 4,17-4,56 log broja konidija / cm² kolonije i izolata *M. laxa* 3,46-3,98 log broja konidija / cm² kolonije. Izolati *M. fructicola* su sporulisali na svim hranljivim podlogama, pri čemu su obilnije sporulisali na KDA podlozi (4,8-4,93 log broja konidija / cm² kolonije) i V8 (4,87-4,95 log broja konidija / cm² kolonije), zatim na MEA podlozi (4,49-4,54 log broja konidija / cm² kolonije), a slabije na AJA (3,17-3,34 log broja konidija / cm² kolonije) i CYA podlozi (3,12-3,27 log broja konidija / cm² kolonije) (p<0,05).

Tabela 28. Uticaj hranljivih podloga na intenzitet sporulacije u kolonijama izolata *Monilinia* spp.

Vrsta	Izolat	Intenzitet sporulacije (log broja spora / cm ² kolonije ± SE)				
		MEA	AJA	KDA	CYA	V8
<i>M. fructigena</i>	MFSRB-17	0	0	0	0	0
	MFSRB-22	0a	0a	0a	0a	4,37±1,23b
	MFSRB-6	0a	0a	0a	0a	4,23±0,17b
<i>M. polystroma</i>	MPSRB-36	0a	0a	0a	0a	4,17±0,56b
	MPSRB-13	0a	0a	0a	0a	4,51±0,86b
	MPSRB-20	0a	0a	0a	0a	4,56±0,65b
<i>M. fructicola</i>	MFC-1	4,49±0,43bc	3,17±0,57ab	4,8±0,15cd	3,12±0,67ab	4,87±0,42cd
	MFC-20	4,54±0,53bc	3,34±0,82ab	4,93±0,75cd	3,27±0,54ab	4,95±0,52cd
<i>M. laxa</i>	MLX-13	0a	0a	0a	0a	3,98±0,41b
	MLX-24	0a	0a	0a	0a	3,46±0,24b

Legenda: Istim slovima su označene grupe između kojih nije uočena statistički značajna razlika Tukey HSD testom ($p < 0,05$); MEA-podloga od slada; AJA-podloga od soka jabuke; KDA-podloga od krompir dekstroznog agara; CYA-Čapekova podloga; V8-podloga od soka paradajza; SE-standardna greška sredine.



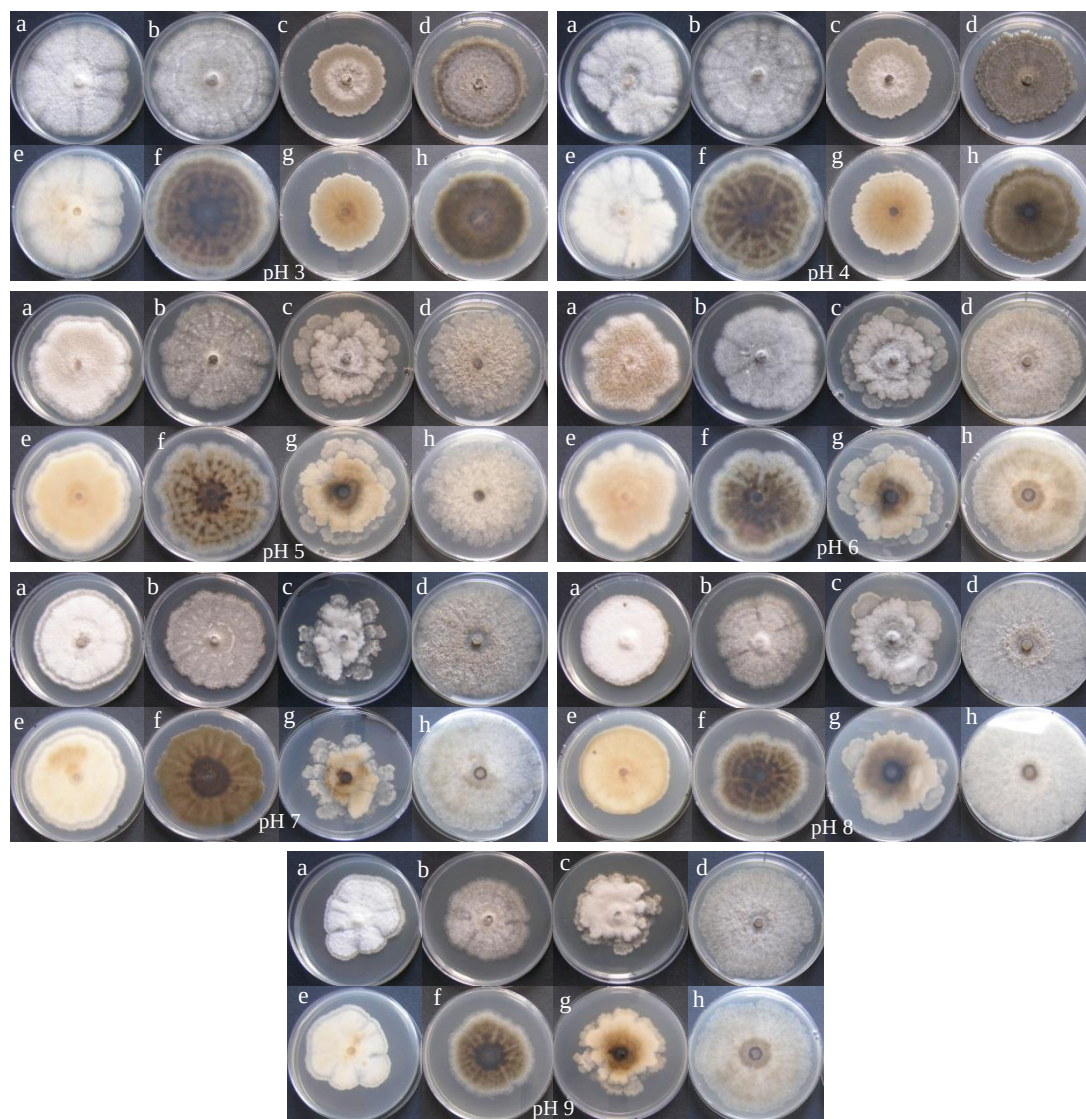
Grafik 6. Uticaj hranljivih podloga na intenzitet sporulacije izolata *Monilinia* spp. Legenda: Vertikalni bar označava standardnu grešku sredine; MEA-podloga od slada; AJA-podloga od soka jabuke; KDA-podloga od krompir dekstroznog agara; CYA-Čapekova podloga; V8-podloga od soka paradajza. Izolati *M. fructigena*: MFSRB-17, MFSRB-22 i MFSRB-6; izolati *M. polystroma*: MPSRB-36, MPSRB-13 i MPSRB-20; izolati *M. fructicola*: MFC-1 i MFC-20; izolati *M. laxa*: MLX-13 i MLX-24.

5.3.4. Uticaj različitih pH vrednosti na porast i sporulaciju izolata *Monilinia* spp.

Izolati *Monilinia* spp. su rasli pri svim testiranim pH vrednostima podloge (Slika 26). Izolati *M. fructigena* i *M. polystroma* su obrazovali kolonije beličaste do sivkaste boje, ravnog do blago talasastog oboda pri svim ispitivanim pH vrednostima podloge.

Izolati *M. laxa* su obrazovali kolonije beličaste do sivkaste boje, režnjevito oboda i izgleda rozete, pri pH vrednostima podloge od 5-9, dok su pri pH 3 i pH 4 kolonije bile ravnog do blago talasastog oboda i nisu imale karakterističan izgled rozete.

Izolati *M. fructicola* su pri pH vrednostima podloge od 5-9 obrazovali karakteristične kolonije sivkate boje, ravnog oboda i masom obrazovanih spora na površini vazdušne micelije. Sa druge strane, pri pH 3 i pH 4 podloge kolonije izolata *M. fructicola* su bile tamno sive boje.



Slika 26. Uticaj pH vrednosti podloge na porast kolonija izolata *Monilinia* spp. a, e-MFSRB-17 *M. fructigena*; b, f-MPSRB-36 *M. polystroma*; c, g-MLX-24 *M. laxa*; d, h-MFC-1 *M. fructicola*; a-d lice kolonija; e-h naličje kolonija.

Između izolata je utvrđena statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u dnevnom porastu kolonije pri različitim pH vrednostima podloge (Tabela 29; Grafik 17). Izolati *M. fructigena* su ispoljili najbrži dnevni porast kolonije pri kiseljoj pH vrednosti podloge (pH 3-4), izolati *M. polystroma* pri pH 3-6, izolati *M. fructicola* pri slabo kiseljoj, neutralnoj i slabo baznoj sredini (pH 6 do pH 8), dok su izolati *M. laxa* najbrže rasli pri pH 5-8. Jedino je izolat MFSRB-6 *M. fructigena* je ispoljio najsporiji porast pri svim testiranim pH vrednostima, pri čemu pri pH vrednostima podloge od 3 do 6 nije bilo statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u porastu kolonije ovog izolata.

Prosečan dnevni porast izolata *M. fructigena* pri pH 3 iznosio je od 2,27-9,47 mm, pri pH 4 od 2,33-9,12 mm, pri pH 5 od 2,13-7,88 mm, pri pH 6 od 1,83-7,44 mm, pri pH 7 od 1,42-7,09 mm, pri pH 8 od 1,01-7,02 mm i pri pH 9 od 0,9-6,5 mm.

Prosečan dnevni porast izolata *M. polystroma* pri pH 3 iznosio je od 7,45-10,47 mm, pri pH 4 od 7,77-10,33 mm, pri pH 5 od 7,6-10,15 mm, pH 6 od 7,75-8,63 mm, pri pH 7 od 6,32-8,21 mm, pH 8 od 4,92-7,76 mm i pH 9 od 4,34-6,43 mm.

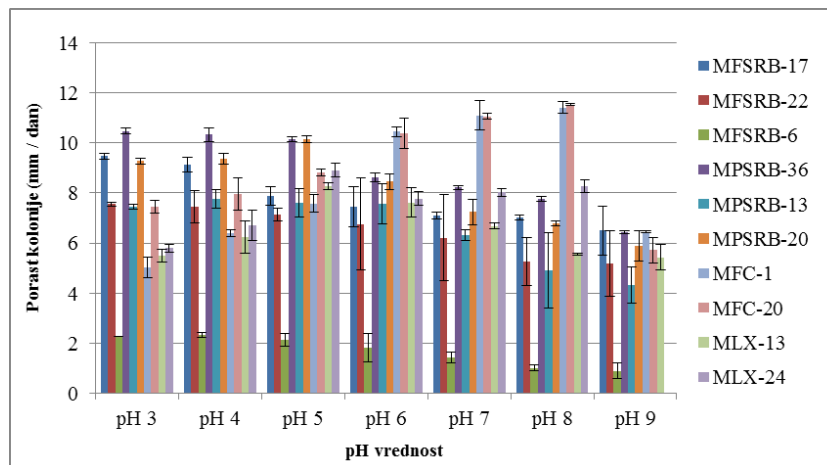
Prosečan dnevni porast izolata *M. laxa* pri pH 3 iznosio je od 5,5-5,79 mm, pri pH 4 od 6,24-6,69 mm, pri pH 5 od 8,28-8,91 mm, pri pH 6 od 7,62-7,78 mm, pri pH 7 od 6,67-8,02 mm, pri pH 8 od 5,56-8,26 mm i pri pH 9 4,98-5,43 mm.

Prosečan dnevni porast izolata *M. fructicola* pri pH 3 iznosio je od 5,02-7,45 mm, pri pH 4 od 6,4-10,97 mm, pri pH 5 od 7,58-8,81 mm, pH 6 pri 20°C od 10,37-10,45 mm, pH 7 od 11,05-11,1 mm, pH 8 od 11,4-11,52 mm i pri pH 9 5,71-6,45 mm.

Tabela 29. Uticaj pH vrednosti podloga na porast kolonija izolata *Monilinia* spp.

Vrsta	Izolat	Prosečni dnevni porast kolonija (mm / dan $\pm$ SE)						
		pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9
<i>M. fructigena</i>	MFSRB-17	9,47 $\pm$ 0,08bc	9,12 $\pm$ 0,13bc	7,88 $\pm$ 0,30ab	7,44 $\pm$ 0,37ab	7,09 $\pm$ 0,81a	7,02 $\pm$ 0,12a	6,5 $\pm$ 0,97a
	MFSRB-22	7,56 $\pm$ 0,07bc	7,45 $\pm$ 0,94bc	7,14 $\pm$ 1,72ab	6,76 $\pm$ 0,6ab	6,21 $\pm$ 0,26ab	5,26 $\pm$ 1,85a	5,19 $\pm$ 1,30a
	MFSRB-6	2,27 $\pm$ 0,02ab	2,33 $\pm$ 0,12ab	2,13 $\pm$ 0,11ab	1,83 $\pm$ 0,24ab	1,42 $\pm$ 0,56a	1,01 $\pm$ 0,21a	0,9 $\pm$ 0,31a
<i>M. polystroma</i>	MPSRB-36	10,47 $\pm$ 0,09d	10,33 $\pm$ 0,27d	10,14 $\pm$ 0,08d	8,63 $\pm$ 0,18bc	8,21 $\pm$ 0,11ab	7,76 $\pm$ 0,12a	6,43 $\pm$ 0,07a
	MPSRB-13	7,45 $\pm$ 0,10bc	7,77 $\pm$ 0,37bc	7,6 $\pm$ 0,58bc	7,57 $\pm$ 1,51bc	6,32 $\pm$ 0,20b	4,92 $\pm$ 0,79a	4,34 $\pm$ 0,72a
	MPSRB-20	9,27 $\pm$ 0,15cd	9,38 $\pm$ 0,51d	10,15 $\pm$ 0,31de	8,45 $\pm$ 0,10cd	7,24 $\pm$ 0,22bc	6,8 $\pm$ 0,61bc	5,88 $\pm$ 0,13ab
<i>M. fructicola</i>	MFC-1	5,02 $\pm$ 0,42a	6,4 $\pm$ 0,14b	7,58 $\pm$ 0,36c	10,45 $\pm$ 0,19d	11,1 $\pm$ 0,59d	11,4 $\pm$ 0,24d	6,45 $\pm$ 0,05b
	MFC-20	7,45 $\pm$ 0,09b	10,97 $\pm$ 0,13d	8,81 $\pm$ 0,24bc	10,37 $\pm$ 0,06cd	11,05 $\pm$ 0,09d	11,52 $\pm$ 0,19de	5,71 $\pm$ 0,04a
<i>M. laxa</i>	MLX-13	5,5 $\pm$ 0,25a	6,24 $\pm$ 0,64bc	8,28 $\pm$ 0,14cd	7,62 $\pm$ 0,60cd	6,67 $\pm$ 0,12bc	5,56 $\pm$ 0,04ab	5,43 $\pm$ 0,50a
	MLX-24	5,79 $\pm$ 0,15a	6,69 $\pm$ 0,61ab	8,91 $\pm$ 0,28c	7,78 $\pm$ 0,27b	8,02 $\pm$ 0,16bc	8,26 $\pm$ 0,25bc	4,98 $\pm$ 0,12a

Legenda: Istim slovima su označene grupe u redovima između kojih nije uočena statistički značajna razlika Tukey HSD test ($p < 0,05$); SE- standardna greška sredine.



Grafik 17. Uticaj pH vrednosti podloga na porast kolonija izolata *Monilinia* spp. Legenda: Vertikalni bar označava standardnu grešku sredine; Izolati *M. fructigena*: MFSRB-17, MFSRB-22 i MFSRB-6; Izolati *M. polystroma*: MPSRB-36, MPSRB-13 i MPSRB-20; Izolati *M. fructicola*: MFC-1 i MFC-20; Izolati *M. laxa*: MLX-13 i MLX-24.

Izolati *M. fructigena*, *M. polystroma* i *M. laxa* nisu sporulisali ni pri jednoj pH vrednosti podloge (Tabela 30). Izolati *M. fructicola* su sporulisali pri svim testiranim pH vrednostima podloge, pri čemu su obilnije sporulisali pri pH 7 (4,86-5,12 log broja konidija / cm² kolonije) i pH 8 (4,93-5,09 log broja konidija / cm² kolonije) u odnosu na ostale pH vrednosti podloge ($p < 0,05$). Najmanji intenzitet sporulacije uočen je pH 3 (3,76-3,83 log broja konidija / cm² kolonije) i pH 4 (3,78-3,98 log broja konidija / cm² kolonije). Intenzitet sporulacije pri pH 6 iznosio je 4,53-4,98 log broja konidija / cm² kolonije, pri pH 5 4,45-4,57 log broja konidija / cm² kolonije i pri pH 9 od 4,41-4,67 log broja konidija / cm² kolonije.

Tabela 30. Uticaj pH vrednosti podloga na intenzitet sporulacije u kulturama izolata *Monilinia* spp.

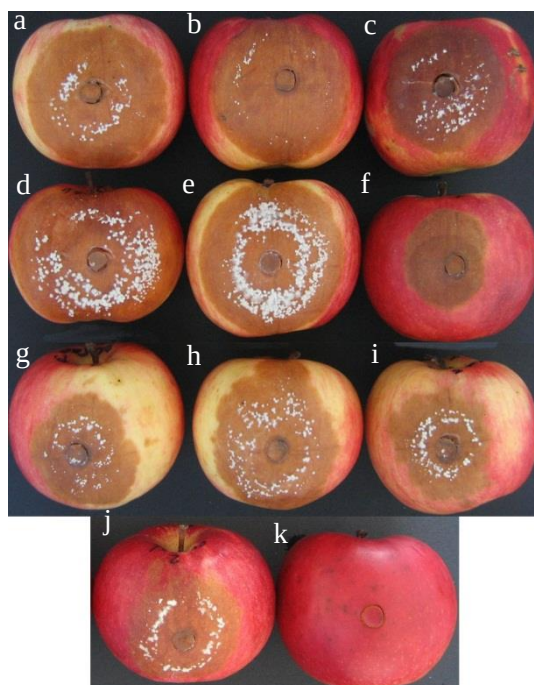
Vrsta	Izolat	Intenzitet sporulacije (log broja spora / cm ² kolonije ± SE)						
		pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9
<i>M. fructigena</i>	MFSRB-17	0	0	0	0	0	0	0
	MFSRB-22	0	0	0	0	0	0	0
	MFSRB-6	0	0	0	0	0	0	0
<i>M. polystroma</i>	MPSRB-36	0	0	0	0	0	0	0
	MPSRB-13	0	0	0	0	0	0	0
	MPSRB-20		0	0	0	0	0	0
<i>M. fructicola</i>	MFC-1	3,76 ± 0,12a	3,78 ± 0,19a	4,45 ± 0,15bc	4,53 ± 0,15bc	4,86 ± 0,23c	4,93 ± 0,09c	4,41 ± 0,07bc
	MFC-20	3,83 ± 0,21a	3,98 ± 0,11a	4,57 ± 0,14b	4,98 ± 0,16bc	5,12 ± 0,27cd	5,09 ± 0,16cd	4,67 ± 0,42b
<i>M. laxa</i>	MLX-13	0	0	0	0	0	0	0
	MLX-24	0	0	0	0	0	0	0

Legenda: Istim slovima su označene grupe u redovima između kojih nije uočena statistički značajna razlika Tukey HSD test ($p < 0,05$); SE- standardna greška sredine.

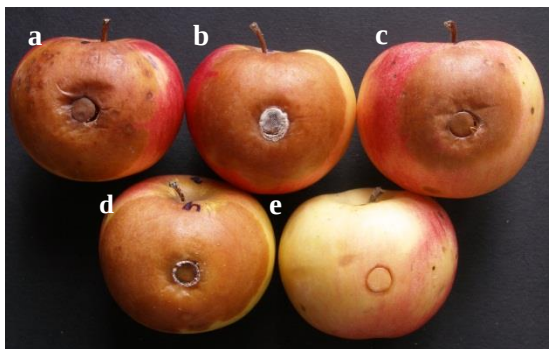
5.4. Patogene osobine izolata *Monilinia* spp.

5.4.1. Simptomi na inokulisanim plodovima jabuke

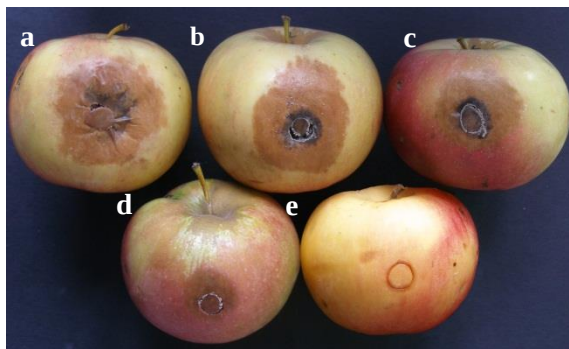
Svi proučavani izolati *Monilinia* spp. prouzrokovali su simptome smeđe truleži na inokulisanim plodovima jabuke sorti Ajdared, Zlatni Delišes i Greni Smit. Prvi simptomi u vidu pega braonkaste boje uočeni su posle dva dana inkubacije, dok se posle pet dana inkubacije, trulež smeđe boje dalje širila, obrazujući pege ravnih ivica sa prisustvom reproduktivnih organa gljive na površini zaraženog tkiva. Izolati *M. fructigena* i *M. polystroma* obrazovali su sporodohije žućkaste boje na površini zaraženog tkiva (Slike 27, 30 i 33), što nije uočeno kod izolata MFSRB-17. Izolati *M. laxa* su obrazovali beličastu do sivkastu miceliju sa oskudnom sporulacijom na površini zaraženog tkiva (Slike 28, 31 i 34), dok su izolati *M. fructicola* obrazovali intenzivne sivkaste mase spora na tkivu oko mesta inokulacije (Slike 29, 32 i 35).



Slika 27. Simptomi smeđe truleži na plodovima jabuke sorte Ajdared inokulisanim izolatima *M. fructigena* i *M. polystroma* posle pet dana inkubacije (izolati *M. fructigena*: a-MFSRB-32; b-MFSRB-6; c-MFSRB-2; d-MFSRB-8SD; e-MFSRB-3 i f-MFSRB-17; izolati *M. polystroma*: g-MPSRB-20; h-MPSRB-2G; i-MPSRB-6; j-referentni izolat 0603202046 *M. polystroma*; k-kontrola).



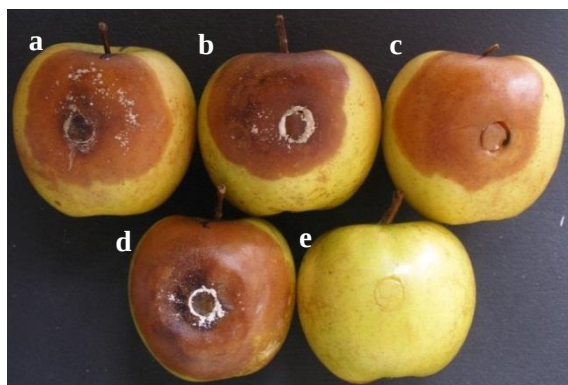
Slika 28. Simptomi smeđe truleži na plodovima jabuke sorte Ajdared inokulisanim izolatima *M. laxa* posle pet dana inkubacije (a-MLX-24; b-MLX-7SV; c-MLX-13; d-referentni izolat PD20.96; e-kontrola).



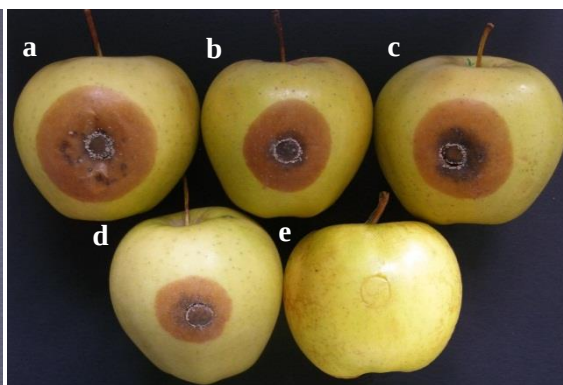
Slika 29. Simptomi smeđe truleži na plodovima jabuke sorte Ajdared inokulisanim izolatima *M. fructicola* posle pet dana inkubacije (a-MFC-1; b-MFC-28; c-MFC-20; d-referentni izolat a-100; e-kontrola).



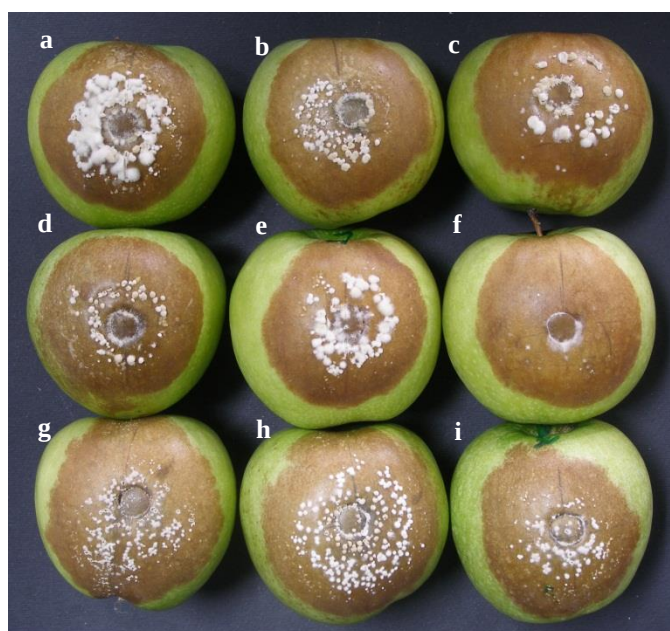
Slika 30. Simptomi smeđe truleži na plodovima jabuke sorte Zlatni Delišes inokulisanim izolatima *M. fructigena* i *M. polystroma* posle pet dana inkubacije (izolati *M. fructigena*: a-MFSRB-32; b-MFSRB-6; c-MFSRB-2; d-MFSRB-8SD; e-MFSRB-3 i f-MFSRB-17; izolati *M. polystroma*: g-MPSRB-20; h-MPSRB-2G; i-MPSRB-6; j-referentni izolat MCG *M. fructigena*; k-referentni izolat 0603202046 *M. polystroma*; l-kontrola).



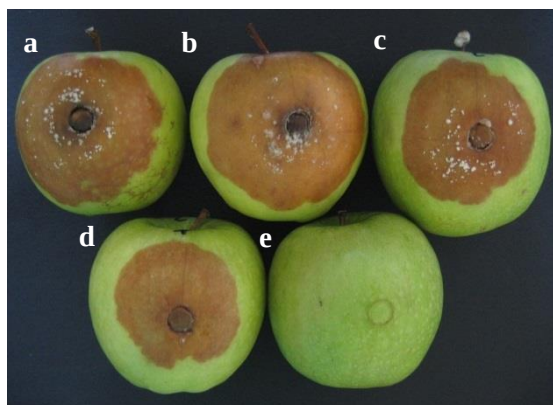
Slika 31. Simptomi smeđe truleži na plodovima jabuke sorte Zlatni Delišeš inokulisanim izolatima *M. laxa* posle pet dana inkubacije (a-MLX-24; b-MLX-7SV; c-MLX-13; d-referentni izolat PD20.96; e-kontrola).



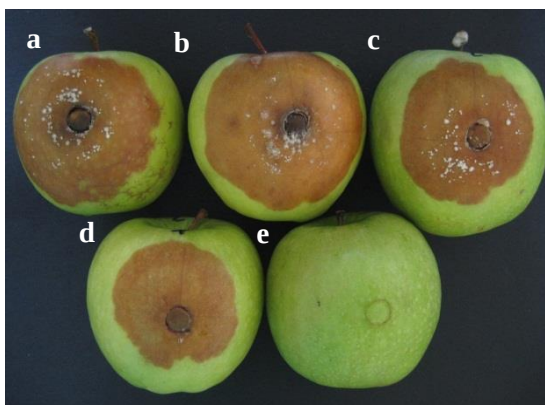
Slika 32. Simptomi smeđe truleži na plodovima jabuke sorte Zlatni Delišeš inokulisanim izolatima *M. fructicola* posle pet dana inkubacije (a-MFC-1; b-MFC-28; c-MFC-20; d-referentni izolat a-100; e-kontrola).



Slika 33. Simptomi smeđe truleži na plodovima jabuke sorte Greni Smit inokulisanim izolatima *M. fructigena* i *M. polystroma* posle pet dana inkubacije (izolati *M. fructigena*: a-MFSRB-32; b-MFSRB-6; c-MFSRB-2; d-MFSRB-8SD; e-MFSRB-3 i f-MFSRB-17; izolati *M. polystroma*: g-MPSRB-20; h-MPSRB-2G; i-MPSRB-6).

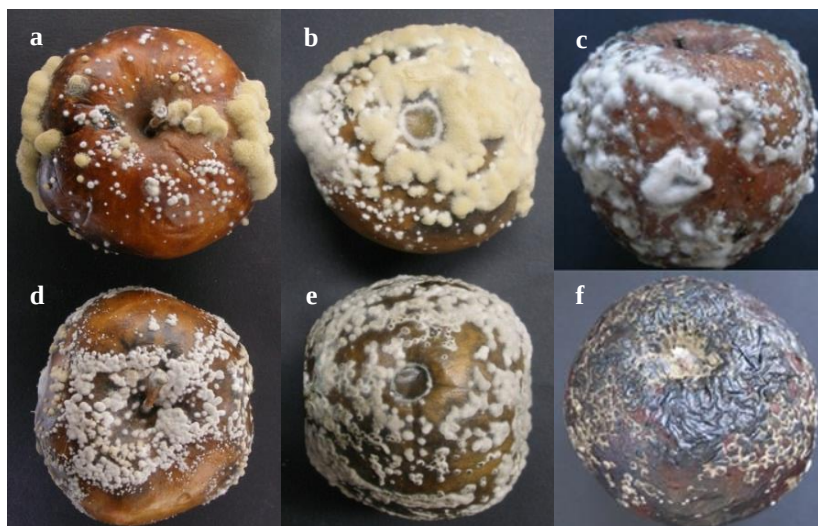


Slika 34. Simptomi smeđe truleži na plodovima jabuke sorte Greni Smit inokulisanim izolatima *M. laxa* posle pet dana inkubacije (a-MLX-24; b-MLX-7SV; c-MLX-13; d-referentni izolat PD20.96; e-kontrola).



Slika 35. Simptomi smeđe truleži na plodovima jabuke sorte Greni Smit inokulisanim izolatima *M. fructicola* posle pet dana inkubacije (a-MFC-1; b-MFC-28; c-MFC-20; d-referentni izolat a-100; e-kontrola).

Posle 15 dana inkubacije trulež je potpuno zahvatila tkivo inokulisanih plodova jabuke. Svi izolati *M. fructigena* intenzivno su obrazovali mnoštvo lanaca konidija u sporodohijama, dok je izolat MFSRB-17 sporadično obrazovao samo skupine gusto isprepletanih hifa. Za razliku od izolata *M. fructigena*, izolati *M. polystroma* nisu intenzivno formirali lance konidija u sporodohijama (Slika 36 a, b, d, e). Posle mesec dana inkubacije svi plodovi inokulisani izolatima *M. fructigena* i *M. polystroma* bili su potpuno zahvaćeni simptomom smeđe truleži. Pored simptoma smeđe truleži na površini plodova inokulisanih izolatima *M. polystroma* uočeno je obrazovanje dobro razvijenog stromatičnog sloja (Slika 36 f). Sa druge strane, *M. fructigena* je samo sporadično obrazovala stromatične tvorevine (Slika 36 c).



Slika 36. Patogene osobine *M. fructigena* (a, b, c) i *M. polystroma* (d, e, f) na inokulisanim plodovima jabuke posle 15 dana (a, b, d, e) i 30 dana inkubacije (c, f) (a, c, d, f-simptomi na inokulisanim plodovima sorte Ajdared i b, e-Greni Smit).

5.4.2. Promene u zaraženom tkivu plodova jabuke inokulisanim *M. fructigena* i *M. polystroma* posle jednog i četiri meseca inkubacije

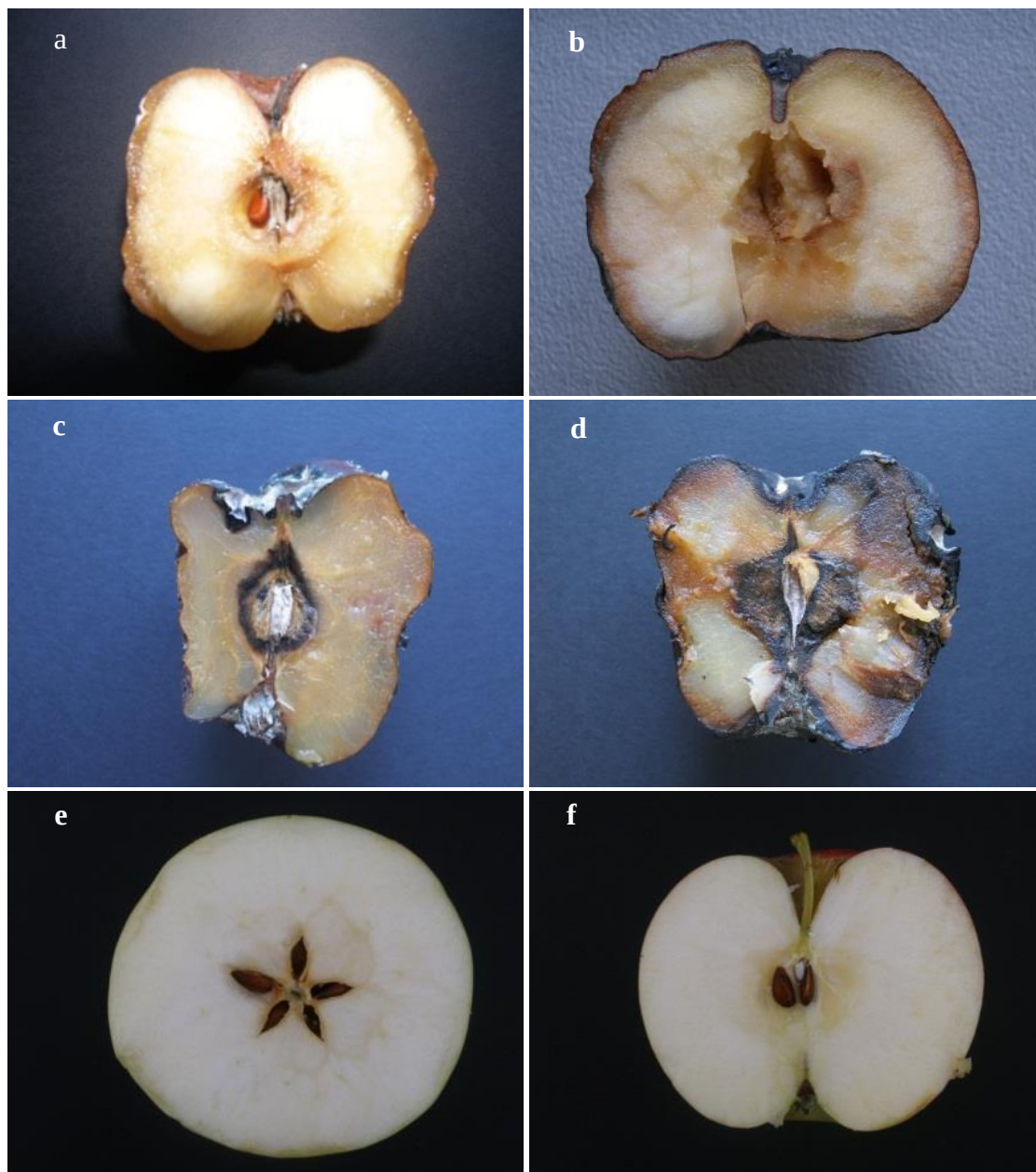
Nakon mesec dana inkubacije, na presecima plodova jabuke inokulisanim izolatom *M. fructigena* ispod pokožice uočena je zona braon boje, širine oko 5 mm, dok je obrazovanje stromatičnog sloja okularno bilo slabo vidljivo (Slika 37 a). Tkivo ploda nastalo od cvetne lože je takođe postalo braon boje, ali je ova zona bila svetlije braon u odnosu na region ispod pokožice ploda (Slika 37 a).

M. polystroma je prouzrokovala slične promene ispod pokožice ploda kao i *M. fructigena*, ali uz formiranje stromatičnog sloja do 1 mm debljine (Slika 37 b). Biljno tkivo nastalo od cvetne lože u zoni ispod pokožice ploda bilo je svetlo braon boje, slično kao i na presecima plodova inokulisanih *M. fructigena* (Slika 37 b).

Posle četiri meseca inkubacije obe vrste su prouzrokovale uočljivije promene zaraženog biljnog tkiva ploda jabuke (Slika 37 c, d). Na presecima plodova inokulisanih *M. fructigena*, celokupno biljno tkivo je bilo tamnije sa sporadičnim obrazovanjem stromatičnog sloja ispod i u nivou pokožice (Slika 37 c). Intenzivnija stromatizacija biljnog tkiva bila je vidljiva u regionu semene kućice (Slika 37 c).

M. polystroma je prouzrokovala intenzivnije promene zaraženog tkiva u poređenju sa *M. fructigena* (Slika 37 d). Pored promene boje biljnog tkiva u vidu

braonkaste boje stromatični sloj ispod i u nivou pokožice bio je deblji i neravnomerno razvijen (Slika 37 d).



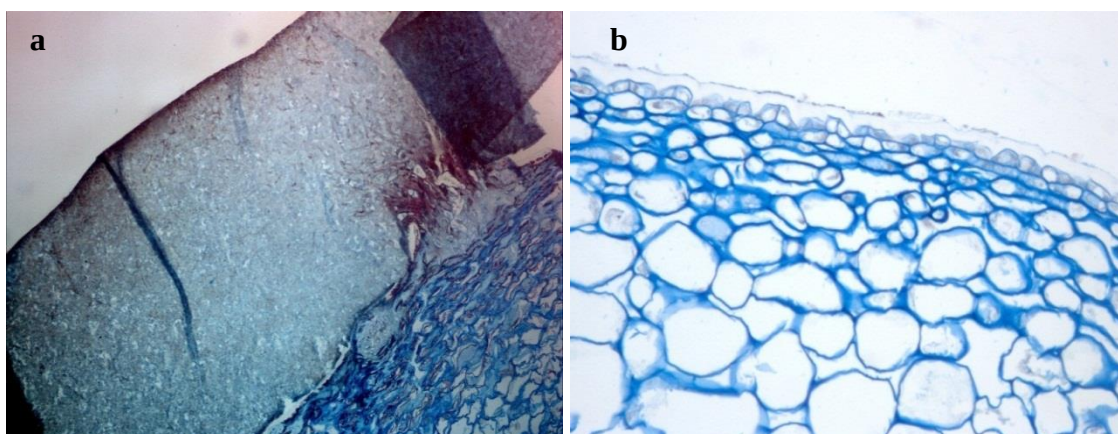
Slika 37. *M. fructigena* i *M. polystroma*: Promene na zaraženom tkivu posle mesec (a, b) i četiri meseca (c, d) inkubacije (a, c-*M. fructigena*; b, d-*M. polystroma*; e, f-kontrola.

5.4.3. Pogodnost različitih metoda bojenja za histopatološka ispitivanja plodova jabuke

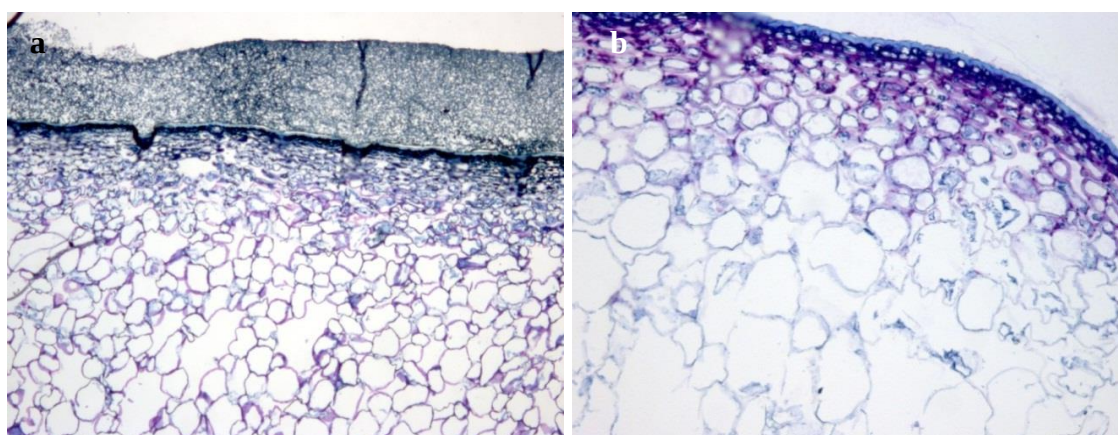
Imajući u vidu intenzivno obrazovanje stromatičnih tvorevina vrste *M. polystroma* unutar ploda, kao primer ispitivanja pogodnosti primenjenih metoda bojenja anatomskih preseka prikazani su preseki plodova inokulisani ovom vrstom.

Na anatomskim presecima plodova jabuke bojenih alcijan plavim i safraninom hife gljiva unutar tkiva su bile plavo obojene, ali su i ćelijski zidovi biljnog tkiva bili plavo obojeni. Stromatične strukture bile su jasno uočljive na presecima jabuka inokulisanim *M. fructigena* i *M. polystroma* (Slika 38).

Bojenjem toluidim plavim hife gljiva nisu se jasno razlikovale od biljnih ćelija. Stromatične strukture su bile jasno uočljive (Slika 39).



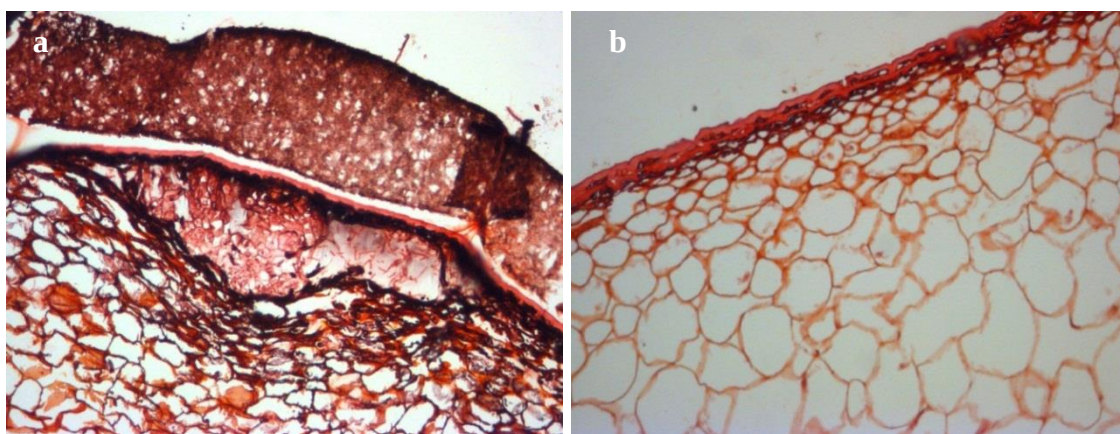
Slika 38. Anatomski presek ploda jabuke inokulisanog *M. polystroma* (a) i kontrole (b) obojeni alcijan plavim i safraninom.



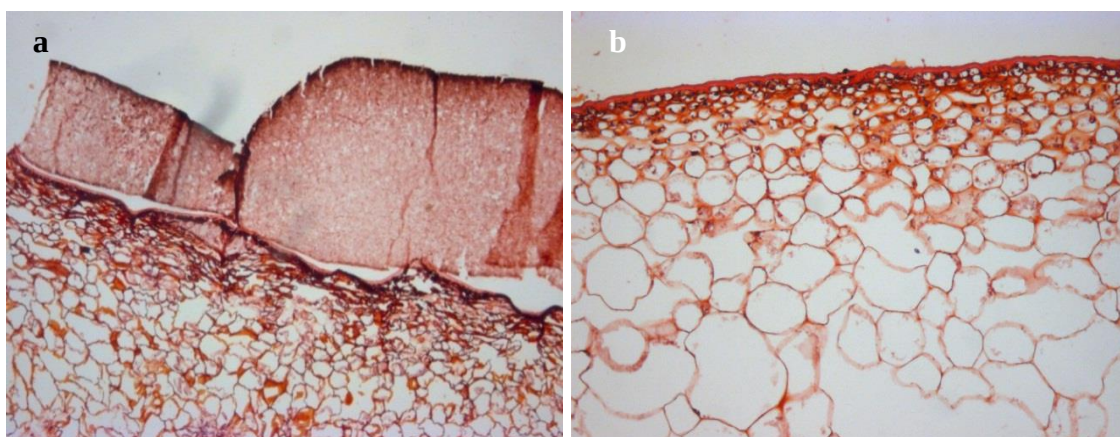
Slika 39. Anatomski presek ploda jabuke inokulisanog ploda jabuke *M. polystroma* (a) i kontrole (b) obojeni toluidin plavim.

Na anatomskim presecima inokulisanih plodova jabuke prilikom bojenja metilen plavim i safraninom jasno su se uočavale hife gljive unutar biljnog tkiva. Kraćim bojenjem u safraninu (5 s) hife su se obojile ljubičasto i crveno, dok su dužim bojenjem u safraninu one bile plave. Boja biljnog tkiva bila je crvena, tako da je razlika između obojenosti hifa i biljnog tkiva bila izraženija. Stromatične tvorevine su bile crveno obojene i jasno uočljive (Slika 41).

Spoljašnji rind ektostrome bio je jasno uočljiv na anatomskim presecima zaraženih plodova jabuke bojenih metilen plavim i safraninom (Slika 40), metilen plavim i safraninom u trajanju od 5 s (Slika 41) i alcijan plavim i safraninom (Slika 38).

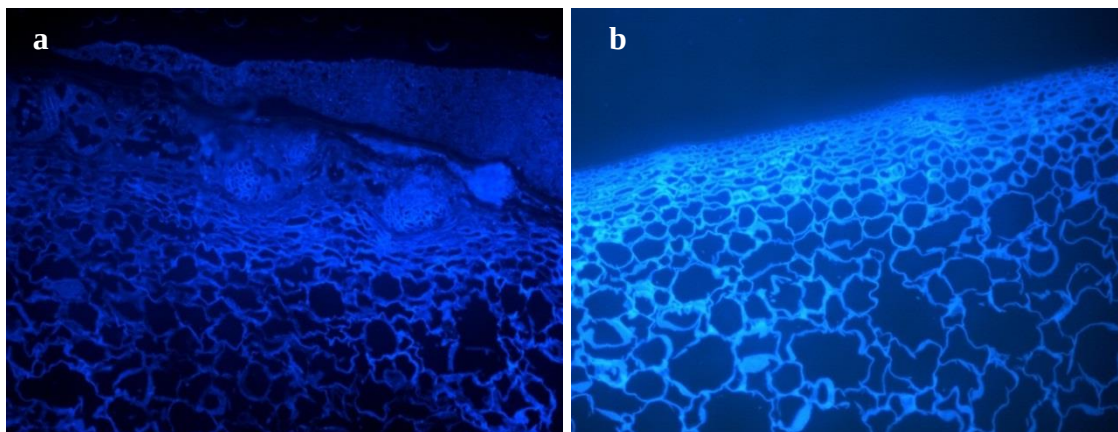


Slika 40. Anatomski presek ploda jabuke inokulisanog *M. polystroma* (a) i kontrole (b) obojeni metilen plavim i safraninom.

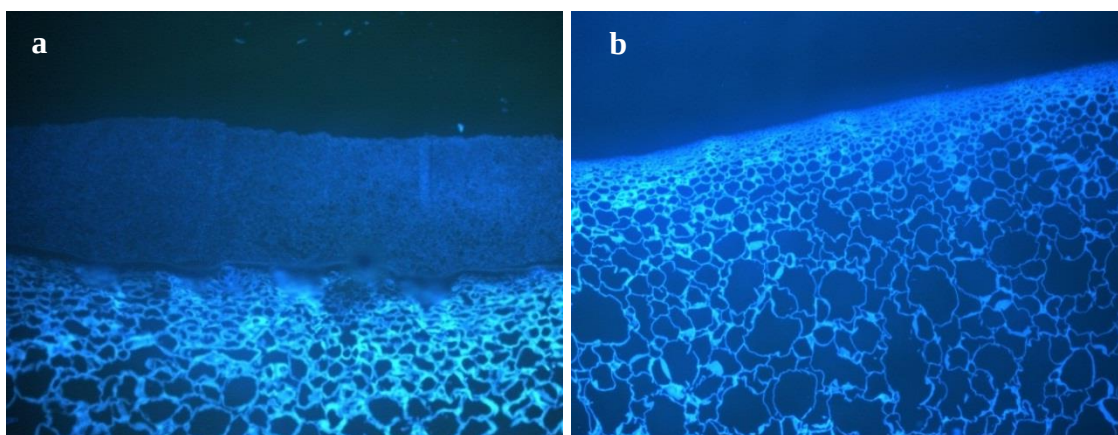


Slika 41. Anatomski presek ploda jabuke inokulisanog *M. polystroma* (a) i kontrole (b) obojeni po modifikovanoj metodi metilen plavim i safraninom.

Primenom dve metode bojenja za fluorescentnu mikroskopiju, na anatomskim presecima nije uočena jasna razlika između hifa gljive i ćelija ploda jabuke (Slika 42), dok su stromatične tvorevine bile uočljive (Slika 43).



Slika 42. Anatomski presek ploda jabuke inokulisanog *M. polystroma* (a) i kontrole (b) obojeni kalcifluorom bez baze i posmatrani pod fluorescentnim mikroskopom.



Slika 43. Anatomski presek ploda jabuke inokulisanog *M. polystroma* (a) i kontrole (b) obojeni kalcifluorom sa bazom i posmatrani pod fluorescentnim mikroskopom.

Kao najpogodnija metoda bojenja za histopatološka posmatranja plodova jabuke zaraženih *M. fructigena* i *M. polystroma* pokazala se metoda bojenja metilen plavim i safraninom. Ali i druge metode se mogu koristiti za histopatološka ispitivanja.

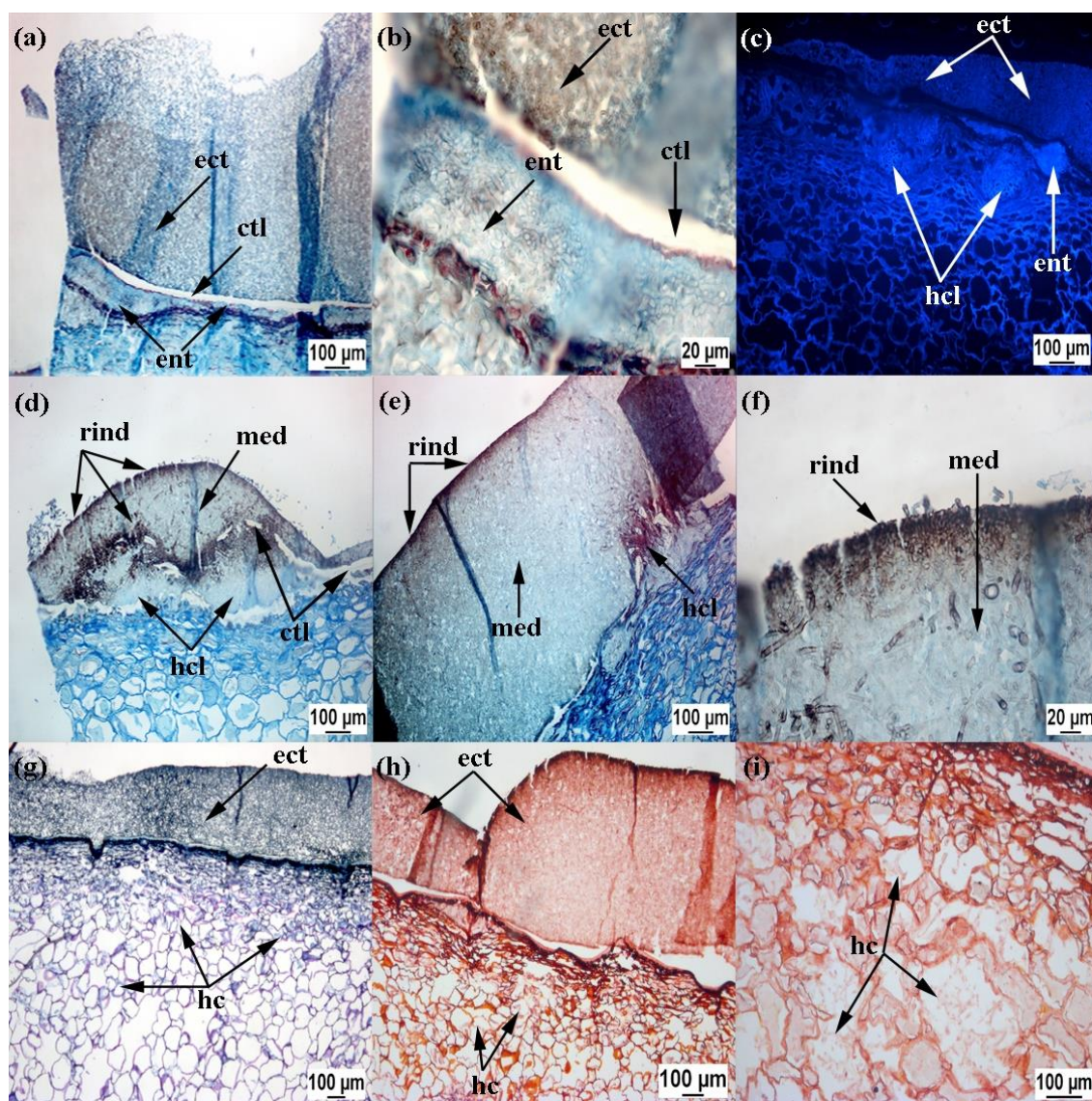
5.4.4. Anatomski preseci plodova jabuke inokulisani *M. fructigena* i *M. polystroma*

Posmatranjem anatomskih preseka inokulisanih plodova jabuke sorte Ajdared vrstama *M. fructigena* i *M. polystroma* uočene su značajne razlike u stromatizaciji biljnog tkiva između vrsta posle jednog i četiri meseca inkubacije.

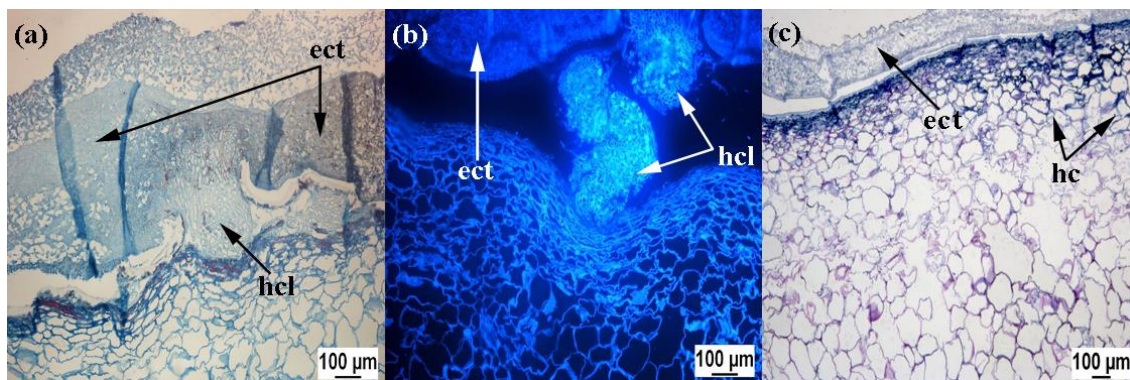
Posle mesec dana inkubacije *M. polystroma* je obrazovala stromatični sloj na tkivu (ektostroma) i unutar tkiva ploda (entostroma) (Slika 44 a-h). Ektostroma se sastojala iz rinda i medule (Slika 44 d, e, f, h). Rind je bio 11-37 μm debljine, sačinjen od gusto isprepletanih hifa sa melaniziranim zidovima 2,7-5,9 μm širine, dok su hife medule bile gusto isprepletane, 2,04-3,3 μm širine (Slika 44 d, e, f, h). Uočeni su začeci stroma u vidu skupina gusto isprepletanih hifa koji su probijali kutikulu ploda i formirali ektostromu (Slika 44 c-e). Entostroma je bila debljine od 23-99 μm , građena od sloja prozenhimskih ćelija (Slika 44 a, b). Širine prozenhimskih ćelija iznosile su 2,4-65,99 μm , dok ćelije rinda i korteksa nisu uočene (Slika 50 b). Parenhimske ćelije su bile gusto isprepletane hifama *M. polystroma* (Slika 44 g-i).

M. fructigena je formirala isprekidan sloj ektostrome, koja je bila mnogo tanja nego ektostroma *M. polystroma* (Slika 45 a-c). Medula se sastojala od spleta hifa koje su iznosile 1,88-3,06 μm širine, dok su ka obodu medule ove hife bile gušće isprepletane. Osim medule, melanizirane ćelije rinda, kao i ćelije korteksa nisu uočene. Uočeni su začeci stroma sloja u vidu skupina gusto isprepletanih hifa koji su probijali kutikulu ploda i obrazovali ektostromu (Slika 45 a-c). Parenhimske ćelije su takođe bile gusto isprepletane hifama gljive (Slika 45 c). Diferencijacija entostrome nije uočena posle mesec dana inkubacije.

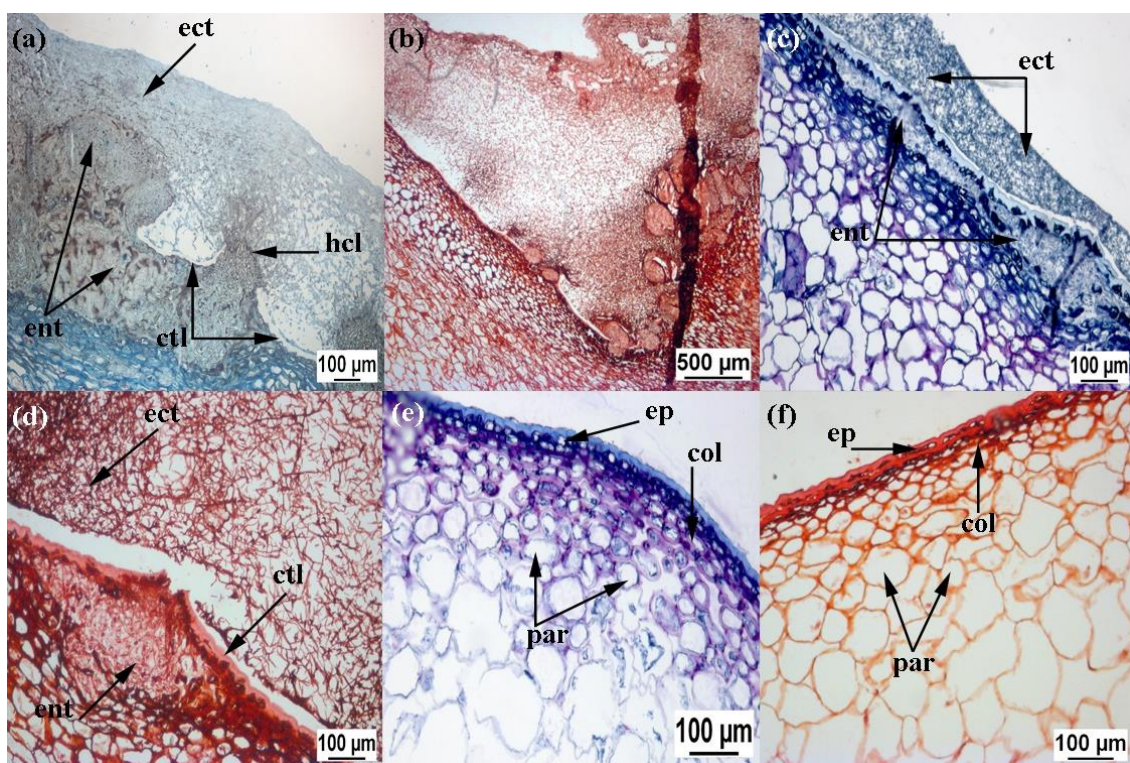
Posle četiri meseca inkubacije na svim anatomskim presecima plodova inokulisanih izolatima *M. fructigena* i *M. polystroma* uočeno je povećanje debljine stromatičnog sloja. Stromatizacija biljnog tkiva bila je mnogo izraženija na plodovima inokulisanim *M. polystroma*. Stromatično tkivo na površini i unutar ploda je bilo mnogo kompaktnije, sačinjeno od gusto isprepletanih hifa. Uočeno je intenzivnije tamnjenje hifa *M. polystroma* u poređenju sa *M. fructigena* (Slika 46 a). Tokom razvoja, jasna granica između entostrome i ektostrome bila je teško uočljiva (Slika 46 a). Parenhimske ćelije su imale manji volumen u poređenju sa kontrolnim zdravim plodovima i celokupno tkivo ploda jabuke je bilo deformisano (Slika 46 b). Sa druge strane, *M. fructigena* je obrazovala isprekidan stromatični sloj (entostroma) unutar tkiva, debljine od 18,26-80,67 μm (Slika 46 c, d).



Slika 44. Anatomske preseke plodova jabuka inokulisanih *M. polystroma* (a-i) posle mesec dana inkubacije: a, b, c-intenzivno formiranje obilne ektostrome (ect) iznad kutikule (ctl) i entostrome (ent) d-h ektostroma (ect) sačinjena od melaniziranog rinda (rind) i medule (med) i skupine isprepletanih hifa (hcl) koje probijaju kutikulu (ctl); g-i kolonizacija parenhima hifama patogenima (hc).



Slika 45. Anatomske preseke plodova jabuka inokulisanih *M. fructigena* (a-c) posle mesec dana inkubacije: ektostroma (ect), skupine isprepletanih hifa (hcl) koje probijaju kutikulu i hife (hc) koje prožimaju parenhimsko tkivo.



Slika 46. Anatomske preseke plodova jabuka inokulisanih *M. polystroma* (a, b) i *M. fructigena* (c, d) posle četiri meseca inkubacije: a-melanizirana i kompaktnija ektostroma (ect), entostroma (ent) i skupine isprepletanih hifa (hcl) koje probijaju kutikulu (ctl); b-deformisano biljno tkivo kao posledica intenzivnog razvoja strome; c, d-ektostroma (ect) sačinjena od spleta hifa sa većim prostorom između njih i entostroma (ent); e, f-epidermis (ep), kolenhim (kol) i parenhim (par) kontrolnih plodova jabuke.

5.4.5. Virulentnost izolata *Monilinia* spp. na plodovima jabuke

Virulentnost izolata *Monilinia* spp. na plodovima jabuke sorte Ajdared

Virulentnost izolata *Monilinia* spp. na plodovima jabuke sorte Ajdared prikazana je u Tabeli 35 i Grafiku 18.

Izolati *M. fructigena* prouzrokovali su pojavu pega prosečnog prečnika od 46,16 mm na inokulisanim plodovima sorte Ajdared. Pege najmanjeg prosečnog prečnika od 42,33 mm prouzrokovao je izolat MFSRB-2, dok je pege najvećeg prosečnog prečnika od 49 mm prouzrokovao izolat MFSRB-6. Ostali izolati su prouzrokovali pege prosečnog prečnika od 44-48,94 mm, dok je prosečni prečnik pega na plodovima inokulisanim referentnim izolatom MCG iznosio 26,75 mm.

Izolati *M. polystroma* prouzrokovali su nastanak pega prosečnog prečnika od 42,63 mm na inokulisanim plodovima jabuke sorte Ajdared. Pege najmanjeg prosečnog prečnika od 37,83 mm prouzrokovao je izolat MPSRB-3, dok je pege najvećeg prosečnog prečnika od 48,38 mm prouzrokovao izolat MPSRB-13. Ostali izolati su prouzrokovali pege prosečnog prečnika 38,83-47 mm, dok je prosečni prečnik pega na plodovima inokulisanim referentnim izolatom 063202046 iznosio 42,63 mm.

Izolati *M. laxa* prouzrokovali su pojavu pega prosečnog prečnika od 38,74 mm na inokulisanim plodovima jabuke. Pege najmanjeg prosečnog prečnika od 28,69 mm prouzrokovao je izolat MLX-13, zatim 30,06 mm izolat MLX-24 i 47,64 mm izolat MLX-SV1, dok je pege najvećeg prosečnog prečnika od 48,56 mm prouzrokovao izolat MLX-7. Prosečni prečnik pega na plodovima inokulisanim referentnim izolatom C-28 iznosio je 37,63 mm i 29,92 mm na plodovima inokulisanim referentnim izolatom PD20.96.

Izolati *M. fructicola* su prouzrokovali obrazovanje pega prosečnog prečnika od 30,03 mm. Pege najmanjeg prosečnog prečnika od 24,87 mm prouzrokovao je izolat MFC-1, zatim 26,81 mm izolat MFC-28, dok je pojavu pega najvećeg prosečnog prečnika od 38,42 mm prouzrokovao izolat MFC-20. Prosečni prečnik pega na plodovima inokulisanim referentnim izolatom a-100 iznosio je 26,81 mm.

Međusobnim poređenjem veličine pega utvrđena je statistički značajna razlika u ispoljenoj virulentnosti vrsta na plodovima jabuke sorte Ajdared (Tabela 32). Najveće pege je prouzrokovala *M. fructigena*, zatim *M. laxa* i najmanje *M. fructicola* ($p < 0,05$). Veličina pega na sorti Ajdared koje je prouzrokovala *M. polystroma* je bila varijabilna i

nije se statistički značajno razlikovala od pega *M. fructigena* ($p=0,828$) i *M. laxa* ($p=0,1$), ali je bila veća od pega *M. fructicola* ($p<0,05$).

Tabela 32. Statističko poređenje veličine pega vrsta *M. fructigena* (MF), *M. polystroma* (MP), *M. fructicola* (MFC) i *M. laxa* (MLX) na inokulisanim plodovima sorte Ajdared.

(I) klasa vrste	(J) klasa vrste	Razlika srednjih vrednosti (I-J)	SE	p
MF	MP	1,6147	1,88854	0,828
	MLX	6,7565*	2,20916	0,015
	MFC	19,2677*	2,51724	0
MP	MF	-1,6147	1,88854	0,828
	MLX	5,1418	2,21961	0,1
	MFC	17,6530*	2,52642	0
MLX	MF	-6,7565*	2,20916	0,015
	MP	-5,1418	2,21961	0,1
	MFC	12,5112*	2,77427	0
MFC	MF	-19,2677*	2,51724	0
	MP	-17,6530*	2,52642	0
	MLX	-12,5112*	2,77427	0

Legenda: *Postoji statistički značajna razlika Tukey HSD testom ($p<0,05$); SE-standardna greška sredine; p-statistička značajnost.

Međusobnim poređenjem veličine pega je utvrđena statistički značajna razlika ($p<0,05$) u ispoljenoj virulentnosti izolata sve četiri vrste *Monilinia*. Izolati *M. fructigena* i pet izolata *M. polystroma* su prouzrokovali pege većeg prečnika od izolata *M. fructicola* i većine izolata *M. laxa*. Izolati *M. polystroma* (MPSRB-3, MPSRB-2G, MPSRB-2, MPSRB-20 i MP-13) su prouzrokovali pege čiji se prečnik nije statistički razlikovao od pega koje su prouzrokovali izolati MLX-13, MLX-24 i referentni izolati vrste *M. laxa*. Sa druge strane, izolati MLX-SV1 i MLX-7 vrste *M. laxa* prouzrokovali su pege na inokulisanim plodovima jabuke čiji se prečnik nije razlikovao od ostalih izolata *M. fructigena* i pet izolata *M. polystroma* (0603202046, MPSRB-21, MPSRB-36 i MPSRB-13).

Virulentnost izolata *Monilinia* spp. na plodovima jabuke sorte Zlatni Delišeš

Virulentnost izolata *Monilinia* spp. na plodovima jabuke sorte Zlatni Delišeš prikazana je u Tabeli 35 i Grafiku 18.

Izolati *M. fructigena* prouzrokovali su pojavu pega prosečnog prečnika od 59,46 mm na inokulisanim plodovima jabuke sorte Zlatni Delišeš. Pege najmanjeg prosečnog

prečnika na plodovima od 54,63 mm prouzrokovao je izolat MFSRB-17, dok je pege najvećeg prosečnog prečnika od 64 mm prouzrokovao izolat MFSRB-10. Ostali izolati *M. fructigena* prouzrokovali su pege prosečnog prečnika 57,38-62,93 mm, dok je referentni izolat MCG prouzrokovao pege prosečnog prečnika od 35,25 mm na inokulisanim plodovima jabuke.

Izolati *M. polystroma* prouzrokovali su nastanak pega prosečnog prečnika od 57,1 mm na inokulisanim plodovima jabuke sorte Zlatni Delišeš. Pegе najmanjeg prosečnog prečnika od 47,13 mm prouzrokovao je izolat MPSRB-36, dok je pege najvećeg prosečnog prečnika od 62,63 mm prouzrokovao izolat MPSRB-6. Prosečni prečnik pega na plodovima inokulisanih ostalim izolatima *M. polystroma* iznosio je 51,13-61,38 mm i 52,07 mm na plodovima inokulisanim referentnim izolatom 0603202046.

Izolati *M. laxa* prouzrokovali su pojavu pega prosečnog prečnika od 48,5 mm na inokulisanim plodovima jabuke sorte Zlatni Delišeš. Pegе najmanjeg prosečnog prečnika od 40,5 mm na inokulisanim plodovima prouzrokovao je izolat MLX-24, zatim 46,63 mm izolat MLX-13, 50,38 mm izolat MLX-SV1, dok je pege najvećeg prosečnog prečnika od 56,5 mm na plodovima prouzrokovao izolat MLX-7. Prosečni prečnik pega na plodovima inokulisanim referentnim izolatom PD20.96 iznosio je 39,13 mm, a izolatom C-28 44,15 mm.

Izolati *M. fructicola* prouzrokovali su nastanak pega prosečnog prečnika 32,42 mm na inokulisanim plodovima jabuke sorte Zlatni Delišeš. Pegе najmanjeg prosečnog prečnika od 21 mm na inokulisanim plodovima prouzrokovao je izolat MFC-28, zatim 35,17 mm izolat MFC-1, dok je pege najvećeg prosečnog prečnika od 41,1 mm prouzrokovao izolat MFC-20. Prosečni prečnik pega na plodovima inokulisanim referentnim izolatom a-100 iznosio je 37,75 mm.

Međusobnim poređenjem veličine pega utvrđena je statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u ispoljenoj virulentnosti vrsta na plodovima jabuke sorte Zlatni Delišeš (Tabela 33). *M. fructigena* i *M. polystroma* su prouzrokovale pege najvećeg prosečnog prečnika, čija se veličina nije statistički značajno razlikovala ($p = 0,997$), zatim *M. laxa* i najmanjeg prečnika *M. fructicola*.

Tabela 33. Statističko poređenje veličina pega vrsta *M. fructigena* (MF), *M. polystroma* (MP), *M. fructicola* (MFC) i *M. laxa* (MLX) na inokulisanim plodovima sorte Zlatni Delišeš

(I) klasa vrste	(J) klasa vrste	Razlika srednjih vrednosti (I-J)	SE	p
MF	MP	0,355	1,7059	0,997
	MLX	10,878*	1,963	0
	MFC	18,618*	2,1611	0
MP	MF	-0,355	1,7059	0,997
	MLX	10,523*	1,9902	0
	MFC	18,264*	2,1859	0
MLX	MF	-10,878*	1,963	0
	MP	-10,523*	1,9902	0
	MFC	7,740*	2,392	0,008
MFC	MF	-18,618*	2,1611	0
	MP	-18,264*	2,1859	0
	MLX	-7,740*	2,392	0,008

Legenda: *Postoji statistički značajna razlika Tukey HSD testom ($p < 0,05$); SE-standardna greška sredine; p-statistička značajnost.

Poređenjem veličine pega utvrđena je statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u ispoljenoj virulentnosti izolata sve četiri vrste. Izolati *M. fructigena* i *M. polystroma* su prouzrokovali pege većeg prosečnog prečnika od izolata *M. fructicola* i većine izolata *M. laxa* na plodovima sorte Zlatni Delišeš. Među izolatima *M. fructigena* referentni izolat MCG je prouzrokovao pege prosečnog prečnika koje se nisu razlikovale od pega prouzrokovanih ostalim izolatima *M. laxa* i *M. fructicola*. Među izolatima *M. polystroma* izolat MPSRB-36 je prouzrokovao pege koje se nisu značajno razlikovale od pega prouzrokovanih izolatima *M. fructicola* i većinom izolata *M. laxa*. Sa druge strane, izolat MLX-7 vrste *M. laxa* je prouzrokovao pege čiji se prečnik nije značajno razlikovao od pega koje je prouzrokovala većina izolata *M. fructigena* i *M. polystroma*.

Virulentnost izolata na plodovima jabuke sorte Greni Smit

Virulentnost izolata *Monilinia* spp. na plodovima jabuke sorte Greni Smit prikazana je u Tabeli 35 i Grafiku 18.

Izolati *M. fructigena* prouzrokovali su pojavu pega prosečnog prečnika od 42,93 mm na inokulisanim plodovima jabuke sorte Greni Smit. Pegе najmanjeg prosečnog prečnika od 31,75 mm prouzrokovao je izolat MFSRB-2, dok je pegе najvećeg prosečnog prečnika od 50,75 mm prouzrokovao izolat MFSRB-8SD. Ostali izolati su prouzrokovali pegе prosečnog prečnika 37,38-50 mm na inokulisanim plodovima.

Referentni izolat MCG je prouzrokovao pege prosečnog prečnika od 20,50 mm na inokulisanim plodovima.

Izolati *M. polystroma* prouzrokovali su nastanak pega prosečnog prečnika od 33,56 mm na inokulisanim plodovima jabuke sorte Greni Smit. Pege najmanjeg prosečnog prečnika od 25,38 mm je prouzrokovao izolat MPSRB-2, dok je pege najvećeg prosečnog prečnika od 49 mm prouzrokovao izolat MPSRB-20. Ostali izolati su prouzrokovali pege prosečnog prečnika od 27-37,17 mm na inokulisanim plodovima. Referentni izolat 0603202046 je prouzrokovao pege prosečnog prečnika od 34,5 mm na inokulisanim plodovima.

Izolati *M. laxa* prouzrokovali su pojavu pega prosečnog prečnika od 32,16 mm na inokulisanim plodovima jabuke sorte Greni Smit. Pege najmanjeg prosečnog prečnika od 26,13 mm na inokulisanim plodovima prouzrokovao je izolat MLX-24, zatim 30 mm izolat MLX-13, 35,38 mm izolat MLX-SV1, dok je pege najvećeg prosečnog prečnika od 37,13 mm prouzrokovao izolat MLX-7. Prosečni prečnik pega na plodovima inokulisanim referentnim izolatom C-28 iznosio je 25,85 mm i 35,5 mm izolatom PD20.96.

Izolati *M. fructicola* prouzrokovali su nastanak pega prosečnog prečnika od 26,58 mm na inokulisanim plodovima jabuke sorte Greni Smit. Pege najmanjeg prosečnog prečnika od 24,48 mm na inokulisanim plodovima prouzrokovao je izolat MFC-20, zatim 24,5 mm izolat MFC-1, dok je pege najvećeg prosečnog prečnika od 30,75 mm prouzrokovao izolat MFC-28. Prosečni prečnik pega na plodovima inokulisanih referentnim izolatom a-100 iznosio je 31,25 mm.

Međusobnim poređenjem veličine pega na inokulisanim plodovima sorte Greni Smit utvrđena statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u ispoljenoj virulentnosti vrsta (Tabela 34). Najveće pege je prouzrokovala *M. fructigena* ($p < 0,05$), dok nije bilo statistički značajne razlike u veličini pega prouzrokovanih *M. polystroma*, *M. laxa* i *M. fructicola*.

Tabela 34. Statističko poređenje veličine pega vrsta *M. fructigena* (MF), *M. polystroma* (MP), *M. fructicola* (MFC) i *M. laxa* (MLX) na inokulisanim plodovima sorte Greni Smit

(I) Klasa vrste	(J) Klasa vrste	Razlika srednjih vrednosti (I-J)	SE	p
MF	MP	7,165*	1,9255	0,002
	MLX	9,151*	2,1879	0
	MFC	13,070*	2,5145	0
MP	MF	-7,165*	1,9255	0,002
	MLX	1,986	2,2505	0,814
	MFC	5,905	2,5692	0,104
MLX	MF	-9,151*	2,1879	0
	MP	-1,986	2,2505	0,814
	MFC	3,919	2,7713	0,493
MFC	MF	-13,070*	2,5145	0
	MP	-5,905	2,5692	0,104
	MLX	-3,919	2,7713	0,493

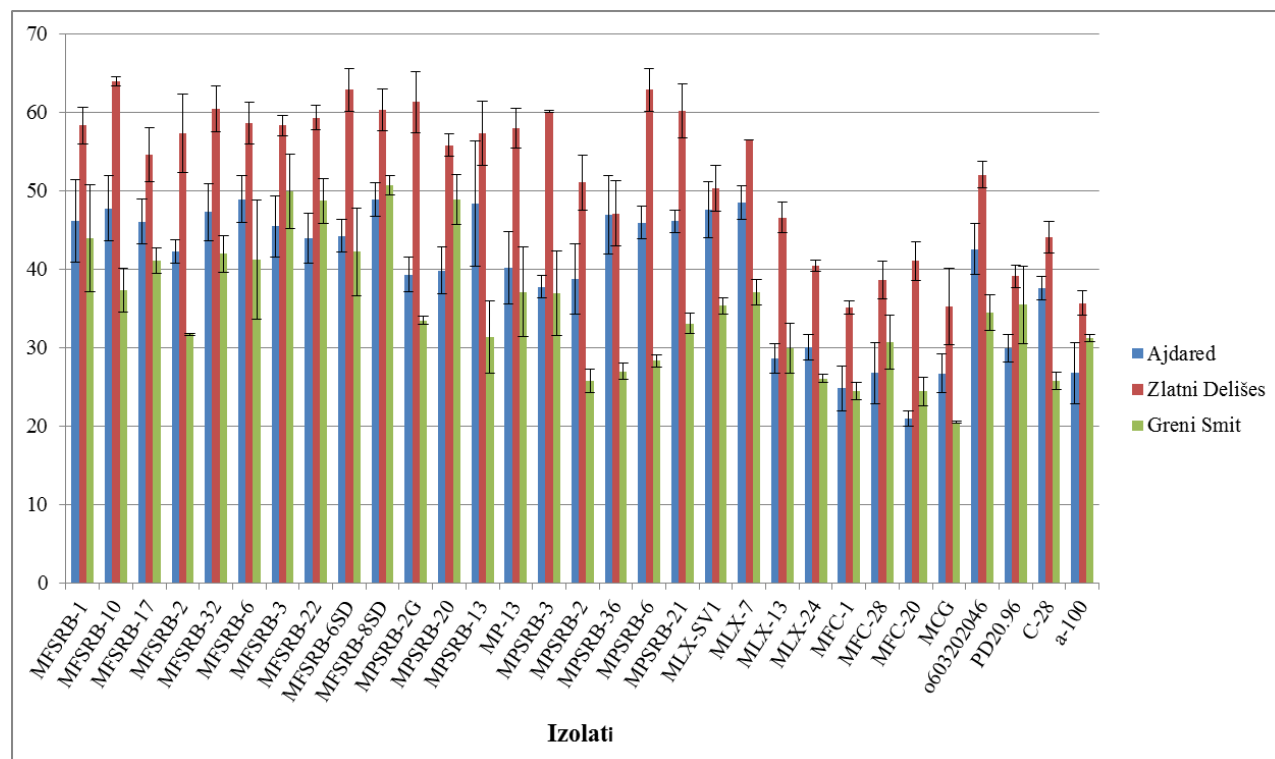
Legenda: *Postoji statistički značajna razlika Tukey HSD testom ($p < 0,05$); SE-standardna greška sredine; p-statistička značajnost.

Poređenjem veličine pega na sorti Greni Smit utvrđena je statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u ispoljenoj virulentnosti izolata sve četiri vrste (Tabela 35; Grafik18). Izolati *M. fructicola*, većina izolata *M. laxa* i izolati *M. polystroma* prouzrokovali su pege manjeg prosečnog prečnika od izolata *M. fructigena*. Izolati MLX-7, MLX-SV1, kao i referentni izolat PD20.96 vrste *M. laxa* prouzrokovali su pege čija se veličina nije razlikovala od pega prouzrokovanih pojedinim izolatima *M. polystroma* (MPSRB-21, MPSRB-2G, 0603202046, MP-13, MPSRB-3) i izolatom MFSRB-10 *M. fructigena*. Sa druge strane, među izolatima *M. fructigena* moglo se uočiti variranje u ispoljenoj virulentnosti. Referentni izolat MCG vrste *M. fructigena* prouzrokovao pege najmanjeg prosečnog prečnika na inokulisanim plodovima jabuke od svih ispitivanih izolata *Monilinia* spp., dok je izolat MFSRB-8SD prouzrokovao pege najvećeg prosečnog prečnika. Među izolatima *M. polystroma* uočeno je variranje u ispoljenoj virulentnosti na plodovima jabuke sorte Greni Smit. Tako su izolati MPSRB-36, MPSRB-2, MPSRB-6 i MPSRB-13 *M. polystroma* prouzrokovali pege čiji se prečnik nije značajno razlikovao od pega prouzrokovanih izolatima *M. fructicola* i većinom izolata *M. laxa*. Sa druge strane, izolat MPSRB-20 je bio jako virulentan i nije se značajno razlikovao od izolata *M. fructigena*.

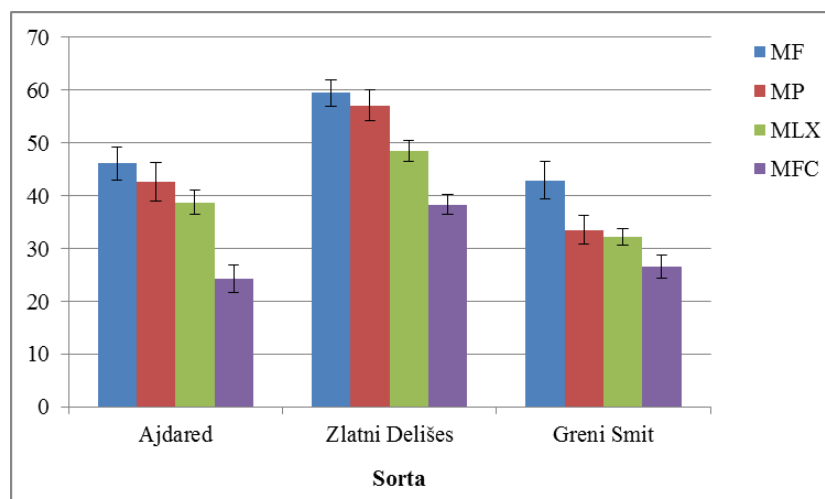
Tabela 35. Patogenost izolata *Monilinia* spp. na plodovima jabuke sorte Ajdared, Zlatni Delišeš i Greni Smit.

Vrsta	Izolati	Prosečne veličine pega na plodovima jabuke (mm ± SE)		
		Ajdared	Zlatni Delišeš	Greni Smit
<i>M. fructigena</i>	MFSRB-1	46,25 ± 5,25fg	58,38 ± 2,31fgh	44 ± 6,81ghij
	MFSRB-10	47,83 ± 4,15fg	64 ± 0,54h	37,38 ± 2,75bcdefghij
	MFSRB-17	46,13 ± 2,82fg	54,63 ± 3,44defgh	41,13 ± 1,66cdefghij
	MFSRB-2	42,33 ± 1,45defg	57,38 ± 5,02fgh	31,75 ± 0,14abcdefg
	MFSRB-32	47,33 ± 3,61fg	60,5 ± 2,97gh	42 ± 2,31efghij
	MFSRB-6	49 ± 2,93g	58,67 ± 2,70fgh	41,25 ± 7,6defghij
	MFSRB-3	45,5 ± 3,91efg	58,38 ± 1,31fgh	50 ± 4,71ij
	MFSRB-22	44 ± 3,16defg	59,38 ± 1,57fgh	48,75 ± 2,89hij
	MFSRB-6SD	44,31 ± 2,06efg	62,93 ± 2,72h	42,25 ± 5,53fghij
	MFSRB-8SD	48,94 ± 2,09g	60,38 ± 2,66gh	50,75 ± 1,26j
	Prosek	46,16 ± 3,14	59,46 ± 2,52	42,93 ± 3,57
<i>M. polystroma</i>	MPSRB-2G	39,38 ± 2,19abcdefg	61,38 ± 3,92gh	33,5 ± 0,52abcdefghi
	MPSRB-20	39,88 ± 2,97bcdefg	55,88 ± 1,43egh	49 ± 3,18hij
	MPSRB-13	48,38 ± 7,99g	57,38 ± 4,08fgh	31,38 ± 4,59abcdefg
	MP-13	40,25 ± 4,59cdefg	58 ± 2,56fgh	37,17 ± 5,73bcdefghij
	MPSRB-3	37,83 ± 1,48abcdefg	60,13 ± 0,13gh	36,95 ± 5,41bcdefghij
	MPSRB-2	38,83 ± 4,45abcdefg	51,13 ± 3,51cdefgh	25,38 ± 1,51abcde
	MPSRB-36	47 ± 4,96fg	47,13 ± 4,15bcdefg	27 ± 1,04abcdef
	MPSRB-6	46 ± 2,04fg	62,93 ± 2,73h	28,38 ± 0,80abcdefg
	MPSRB-21	46,17 ± 1,45fg	60,25 ± 3,45gh	33,13 ± 1,26abcdefgh
	Prosek	42,63 ± 3,57	57,1 ± 2,88	33,56 ± 2,71
<i>M. laxa</i>	MLX-SV1	47,64 ± 3,59fg	50,38 ± 2,95bcdefgh	35,38 ± 1,04abcdefghij
	MLX-7	48,56 ± 2,10g	56,5 ± 2,35fgh	37,13 ± 1,66abcdefghij
	MLX-13	28,69 ± 1,89abcdef	46,63 ± 1,97bcdefg	30 ± 3,21abcdefg
	MLX-24	30,06 ± 1,65abcdefg	40,5 ± 0,68abcd	26,13 ± 0,52abcdef
	Prosek	38,74 ± 2,31	48,5 ± 1,99	32,16 ± 1,61
<i>M. fructicola</i>	MFC-1	24,87 ± 2,89abcd	35,17 ± 0,88ab	24,5 ± 1,15abc
	MFC-28	26,81 ± 3,88abcde	38,7 ± 2,41abc	30,75 ± 3,41abcdefg
	MFC-20	21 ± 1,03ab	41,1 ± 2,46abcd	24,48 ± 1,85ab
	Prosek	24,23 ± 2,6	38,32 ± 1,91	26,58 ± 2,14
Referentni izolati	¹ MCG	26,75 ± 2,48abcde	35,25 ± 4,89ab	20,5 ± 0,14a
	² 0603202046	42,63 ± 3,27defg	52,07 ± 1,69cdefgh	34,5 ± 2,31abcdefghij
	³ PD20.96	29,92 ± 1,76abcdefg	39,13 ± 1,45abc	35,5 ± 4,90abcdefghij
	³ C-28	37,63 ± 1,45abcdefg	44,15 ± 2,04bcdef	25,85 ± 1,11abcdef
	⁴ a-100	26,81 ± 3,86abcde	35,75 ± 1,52abc	31,25 ± 0,43abcdefg

Legenda: ¹MFG-*M. fructigena*, ²MP-*M. polystroma*; ³MLX-*M. laxa* i ⁴MFC-*M. fructicola*; ns-nije sporulisao; Istim slovima su označene grupe između kojih nije uočena statistički značajna razlika Tukey HSD testom ($p < 0,05$); SE-standardna greška sredine.



Grafik 18. Patogenost izolata *Monilinia* spp. na plodovima jabuke sorte Ajdared, Zlatni Delišeš i Greni Smit. Legenda: izolati *M. fructigena*: MFSRB-1, MFSRB-10, MFSRB-17, MFSRB-2, MFSRB-32, MFSRB-2, MFSRB-6, MFSRB-3, MFSRB-22, MFSRB-6SD i MFSRB-8SD; izolati *M. polystroma*: MPSRB-2G, MPSRB-2, MPSRB-1, MP-13, MPSRB-3, MPSRB-2, MPSRB-36, MPSRB-6 i MPSRB-21; izolati *M. laxa*: MLX-SV1, MLX-7; MLX-13 i MLX-24; izolati *M. fructicola* MFC-1; MFC-28 i MFC-20; Vertikalni bar označava standardnu grešku sredine.



Grafik 19. Prečnik pega *M. fructigena* (MF), *M. polystroma* (MP), *M. laxa* (MLX) i *M. fructicola* (MFC) na inokulisanim plodovima jabuke sorte Ajdared, Zlatni Delišeš i Greni Smit. Legenda: Vertikalni bar označava standardnu grešku sredine.

M. fructigena je prouzrokovala pojavu najvećih pega na plodovima sve tri sorte jabuke. Na plodovima jabuke sorte Ajdared i Zlatni Delišeš *M. laxa* je prouzrokovala pege srednjih veličina, a *M. fructicola* najmanjih veličina. *M. polystroma* je na plodovima sorte Zlatni Delišeš prouzrokovala pege kao *M. fructigena*, a na plodovima sorte Ajdared je veličina pega odgovarala veličini *M. fructigena* i *M. laxa*. Na plodovima jabuke sorte Greni Smit veličine pega *M. polystroma*, *M. laxa* i *M. fructicola* su bile slične.

5.4.6. Intenzitet sporulacije na inokulisanim plodovima jabuke

Intenzitet sporulacije izolata *Monilinia* spp. na inokulisanim plodovima jabuke sorti Ajdared, Zlatni Delišeš i Greni Smit prikazan je u Tabeli 36 i Grafiku 20.

Intenzitet sporulacije izolata *M. fructigena* na plodovima sorte Zlatni Delišeš iznosio je 4,58 log broja spora / cm² pege, zatim na plodovima sorte Ajdared 4,53 log broja spora / cm² pege i 3,86 log broja spora / cm² pege na plodovima sorte Greni Smit.

Intenzitet sporulacije izolata *M. polystroma* na plodovima sorte Ajdared iznosio je 4,36 log broja spora / cm² pege, na plodovima Zlatni Delišeš 4,34 log broja spora / cm² pege i 3,72 log broja spora / cm² na plodovima jabuke sorte Greni Smit.

Intenzitet sporulacije izolat *M. laxa* na plodovima sorte Ajdared iznosio je 0,43 log broja spora / cm² pege, na plodovima sorte Zlatni Delišeš 0,37 log broja spora / cm² pege i 0,35 log broja konidija / cm² pege na plodovima jabuke sorte Greni Smit.

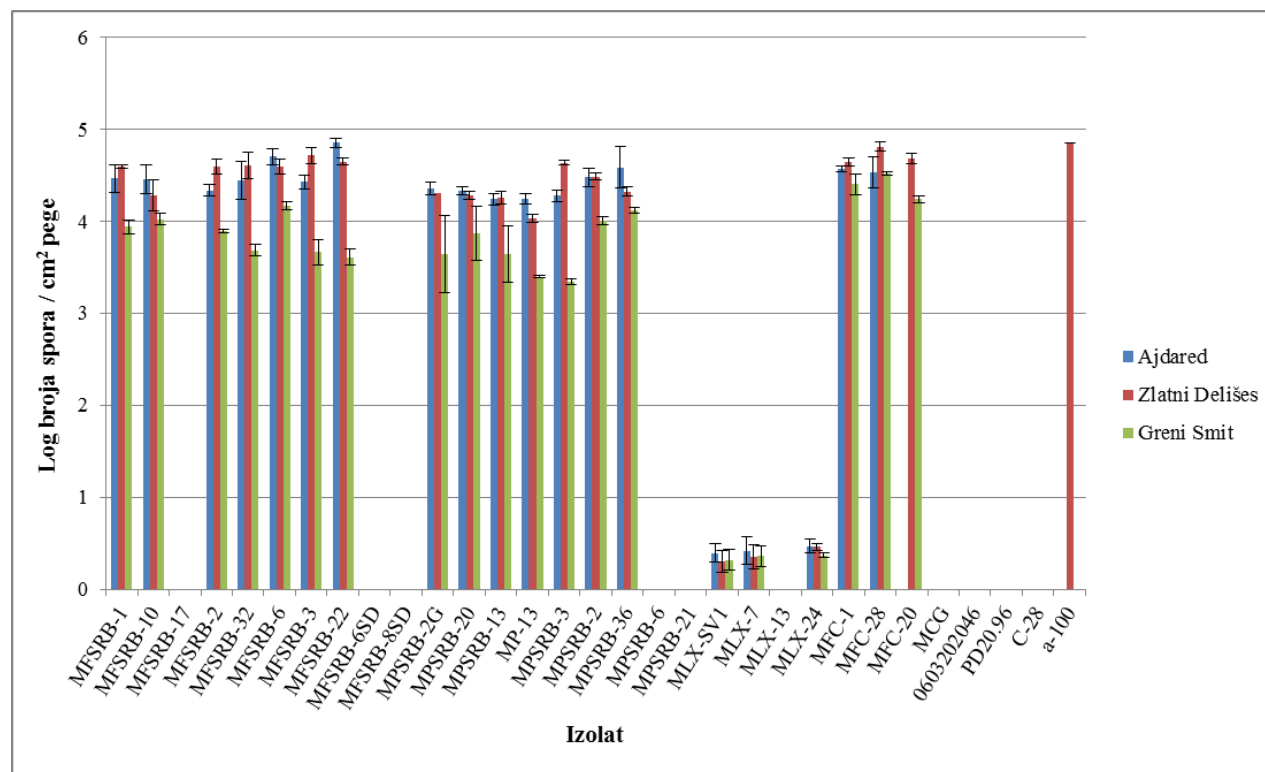
Intenzitet sporulacije izolata *M. fructicola* na plodovima sorte Zlatni Delišeš iznosio je 4,72 log broja spora / cm² pege, zatim 4,54 log broja spora / cm² pege na plodovima sorte Ajdared i 4,39 log broja spora / cm² pege na plodovima jabuke sorte Greni Smit.

Na sve tri sorte jabuke najmanji intenzitet sporulacije zabeležen je kod *M. laxa* ($p < 0,05$). Na plodovima sorte Ajdared nije bilo razlike u intenzitetu sporulacije *M. polystroma*, *M. fructigena* i *M. fructicola*. Na plodovima jabuke sorte Zlatni Delišeš intenzitet sporulacije *M. polystroma* je bio manji u odnosu na *M. fructigena* i *M. fructicola*. Na plodovima jabuke sorte Greni Smit najintenzivnija sporulacija je zabeležena kod *M. fructicola*, a nešto manjeg intenziteta kod *M. polystroma* i *M. fructigena*.

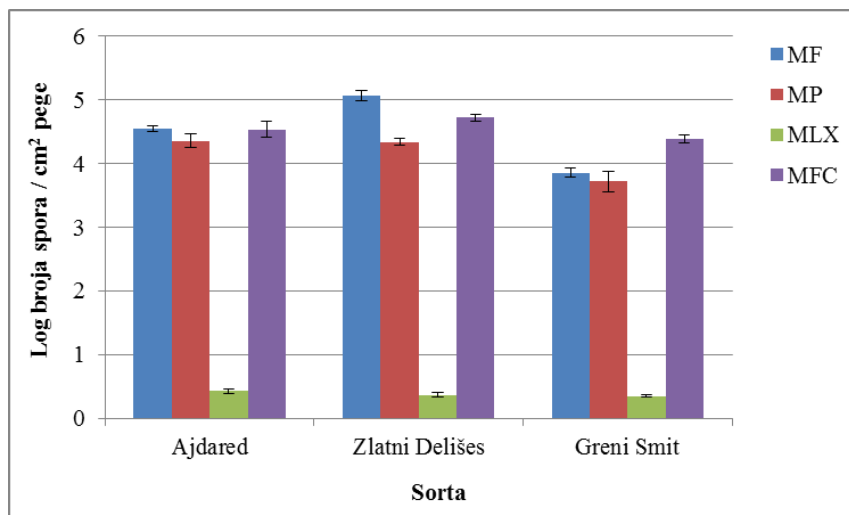
Tabela 36. Intenzitet sporulacije izolata *Monilinia* spp. na inokulisanim plodovima jabuke sorte Ajdared, Zlatni Delišeš i Greni Smit.

Vrsta	Izolat	Intenzitet sporulacije na inokulisnim plodovima (log broja spora / cm ² ± SE)		
		Ajdared	Zlatni Delišeš	Greni Smit
<i>M. fructigena</i>	MFSRB-1	4,47 ± 0,15bc	4,60 ± 0,02cdef	3,95 ± 0,07bcd
	MFSRB-10	4,46 ± 0,16bc	4,29 ± 0,17bcd	4,03 ± 0,06bcd
	MFSRB-17	ns	ns	ns
	MFSRB-2	4,34 ± 0,06bc	4,60 ± 0,08cdef	3,90 ± 0,02bcd
	MFSRB-32	4,45 ± 0,21bc	4,61 ± 0,14cdef	3,69 ± 0,07bc
	MFSRB-6	4,70 ± 0,09bc	4,60 ± 0,08cdef	4,17 ± 0,04cd
	MFSRB-3	4,43 ± 0,07bc	4,72 ± 0,09def	3,67 ± 0,14bc
	MFSRB-22	4,86 ± 0,05c	4,65 ± 0,04f	3,61 ± 0,09bc
	MFSRB-6SD	nt	nt	nt
	MFSRB-8SD	nt	nt	nt
	Prosek	4,53 ± 0,05	4,58 ± 0,08	3,86 ± 0,07
<i>M. polystroma</i>	MPSRB-2G	4,36 ± 0,07bc	4,30 ± 0,08bcd	3,64 ± 0,42bc
	MPSRB-20	4,34 ± 0,04bc	4,28 ± 0,05cdef	3,87 ± 0,29bcd
	MPSRB-13	4,24 ± 0,07b	4,26 ± 0,06bc	3,65 ± 0,31bc
	MP-13	4,25 ± 0,06b	4,04 ± 0,04b	3,40 ± 0,01b
	MPSRB-3	4,28 ± 0,06c	4,64 ± 0,03cdef	3,34 ± 0,03bcd
	MPSRB-2	4,48 ± 0,10bc	4,49 ± 0,04bcdef	4,01 ± 0,04bc
	MPSRB-36	4,59 ± 0,40bc	4,34 ± 0,05bcdef	4,12 ± 0,04cd
	MPSRB-6	nt	nt	nt
	MPSRB-21	nt	nt	nt
	Prosek	4,36 ± 0,11	4,34 ± 0,05	3,72 ± 0,16
<i>M. laxa</i>	MLX-SV1	0,39 ± 0,1a	0,3 ± 0,12a	0,32 ± 0,11a
	MLX-7	0,42 ± 0,15a	0,35 ± 0,13a	0,36 ± 0,09a
	MLX-13	nt	nt	nt
	MLX-24	0,47 ± 0,07a	0,46 ± 0,04a	0,37 ± 0,03a
	Prosek	0,43 ± 0,11	0,37 ± 0,1	0,35 ± 0,08
<i>M. fructicola</i>	MFC-1	4,57 ± 0,03bc	4,65 ± 0,05cdef	4,40 ± 0,11d
	MFC-28	4,53 ± 0,17bc	4,82 ± 0,05ef	4,52 ± 0,02d
	MFC-20	4,49 ± 0,17bc	4,69 ± 0,06cdef	4,24 ± 0,04cd
	Prosek	4,54 ± 0,12	4,72 ± 0,05	4,39 ± 0,06
Referentni izolati	MCG ¹	nt	nt	nt
	0603202046 ²	nt	nt	nt
	PD20.96 ³	0a	0a	0a
	C-28 ³	nt	nt	nt
	a-100 ⁴	4,51 ± 0,02b	4,85 ± 0,11f	4,46 ± 0,41cd

Legenda: Istim slovima su iznačene grupe između kojih nije uočena statistički značajna razlika Tukey HSD testom ($p < 0,05$); ns-izolat nije sporulisao; nt-nije testirano; ¹*M. fructigena*; ²*M. polystroma*; ³MLX-*M. laxa* i ⁴*M. fructicola*. SE-standardna greška sredine.



Grafik 20. Intenzitet sporulacije izolata *Monilinia* spp. na inokulisanim plodovima jabuke. Legenda: izolati *M. fructigena*: MFSRB-1, MFSRB-10, MFSRB-17, MFSRB-2, MFSRB-32, MFSRB-2, MFSRB-6, MFSRB-3, MFSRB-22, MFSRB-6SD i MFSRB-8SD; izolati *M. polystroma*: MPSRB-2G, MPSRB-2, MPSRB-1, MP-13, MPSRB-3, MPSRB-2, MPSRB-36, MPSRB-6 i MPSRB-21; izolati *M. laxa*: MLX-SV1, MLX-7, MLX-13 i MLX-24; izolati *M. fructicola* MFC-1; MFC-28 i MFC-20; Vertikalni bar označava standardnu grešku sredine; Prikazane vrednosti predstavljaju logaritme ukupnog broja spora po jedinici površine (log broj spora / cm² pege).



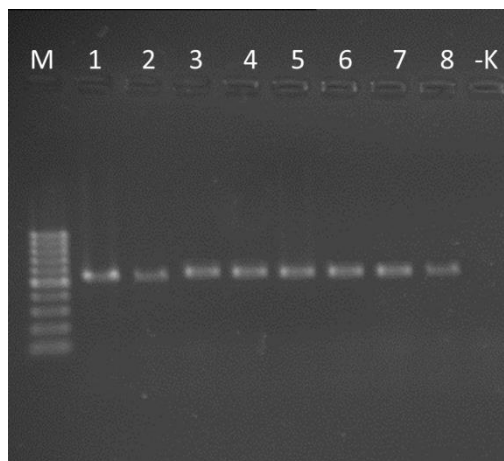
Grafik 21. Intenzitet sporulacije na vrsta *M. fructigena* (MF), *M. polystroma* (MP), *M. laxa* (MLX) i *M. fructicola* (MFC) na inokulisanim plodovima jabuke sorte Ajdared, Zlatni Delišes i Greni Smit. Legenda: Vretikalni barovi označavaju standardnu grešku sredine.

Na plodovima sorte Zlatni Delišes i Ajdared *M. fructicola* i *M. fructigena* su obilnije sporulisale od *M. polystroma*, dok je *M. laxa* najmanje sporulisala. Na plodovima sorte Greni Smit *M. fructicola* je ispoljila najveću sporulaciju, zatim *M. polystroma* i *M. fructigena* i najmanju *M. laxa*.

5.5. Molekularne osobine izolata *Monilinia* spp.

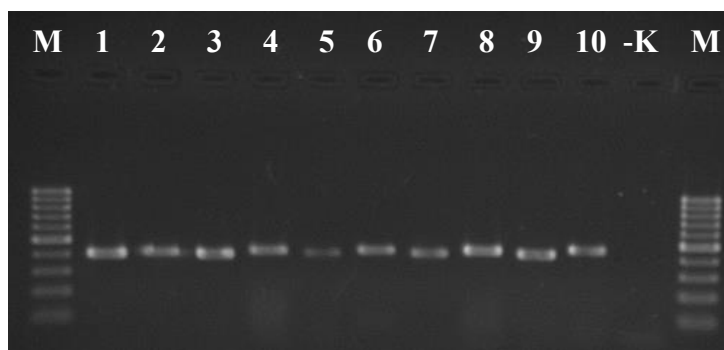
5.5.1. Pogodnost upotrebe različitih prajmera za specifičnu detekciju *Monilinia* spp.

Amplifikacija PCR produkata upotrebom različitih prajmera u odabranim izolatima *M. fructigena*, *M. polystroma*, *M. laxa* i *M. fructicola* prikazana je u Tabeli 37. U svim ispitivanim izolatima korišćenjem ITS1 / ITS4 prajmera dobijeni su ampliconi očekivanih veličina oko 550 bp, dok kod negativne kontrole nije došlo do amplifikacije (Slika 47), čime je potvrđeno prisustvo nukleinskih kiselina u uzorcima.

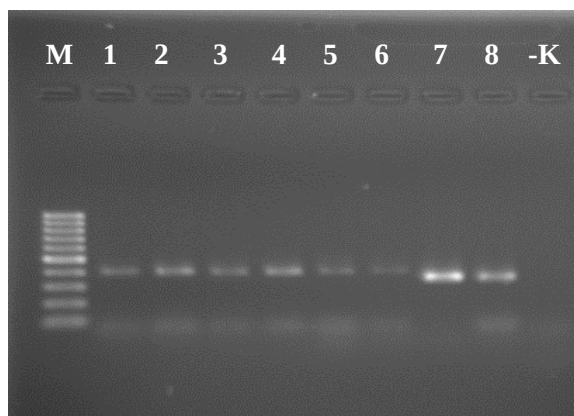


Slika 47. 1,5% agarozni gel sa ampliconima veličine oko 550 bp dobijenim PCR metodom sa ITS1 / ITS4 prajmerima (White et al., 1990) M–marker 100 bp; 1, 2-izolati *M. fructigena* (MFSRB-1; MFSRB-6); 3, 4-izolati *M. polystroma* (MPSRB-20 i MPSRB-3); 5, 6-izolati *M. laxa* (MLX-SV1 i MLX-13); 7, 8-izolati *M. fructicola* (MFC-20 i MFC-1); -K–negativna kontrola.

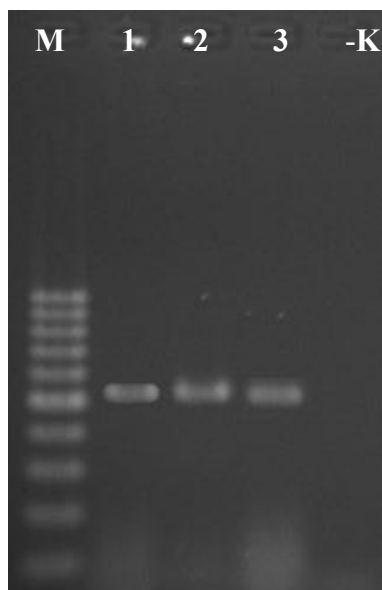
U PCR metodi korišćenjem prajmera MO368-5 / MO368-8R ampliconi veličine oko 402 bp dobijeni su samo kod izolata *M. fructigena*, dok su ampliconi veličine 425 bp dobijeni samo kod izolata *M. polystroma* (Slika 48 i 49). Upotrebom prajmera MO368-5 / Laxa-R2 ampliconi veličine oko 351 bp dobijeni su samo kod izolata *M. laxa* (Slika 49), dok su prajmerima MO368-5 / MO368-10R ampliconi veličine oko 535 bp dobijeni samo kod izolata *M. fructicola* (Slika 50). Kod negativnih kontrola nije došlo do amplifikacije.



Slika 48. 1,5% agarozni gel sa ampliconima veličine 402 i 425 bp dobijenih prajmerima MO368-5 / MO368-8R u PCR metodi (Cote et al., 2004) M-marker 100 bp; 1, 3, 5, 7, 9-izolati *M. fructigena* (MFSRB-1, MFSRB-6, MFSRB-3, MFSRB-10 i MCG); 2, 4, 6, 8, 10-izolati *M. polystroma* (MPSRB-13, MPSRB-20, MPSRB-2, MP-13 i 0603202046); -K–negativna kontrola.



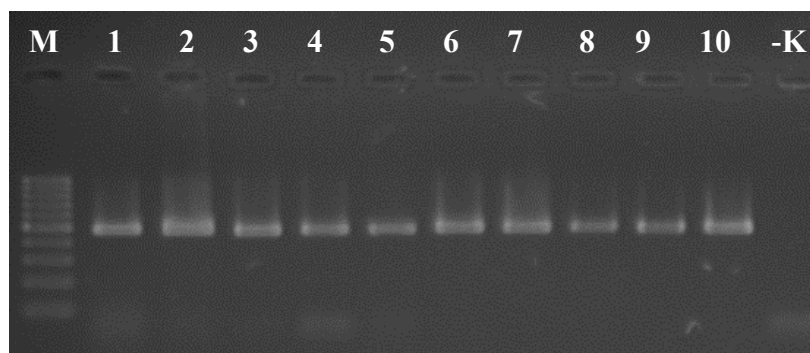
Slika 49. 1,5% agarozni gel sa amplikonima veličine 402 bp dobijenih prajmerima MO368-5 / MO368-8R i 351 bp dobijenih prajmerima MO368-5 / Laxa-R2 u PCR metodi (Cote et al., 2004). M-marker 100 bp; 1-6 izolati *M. fructigena* (MFSRB-1, MFSRB-6, MFSRB-3, MFSRB-10, MFSRB-2 i C-28); 7, 8-izolati *M. laxa* (MLX-SV1 i C-28); -K–negativna kontrola.



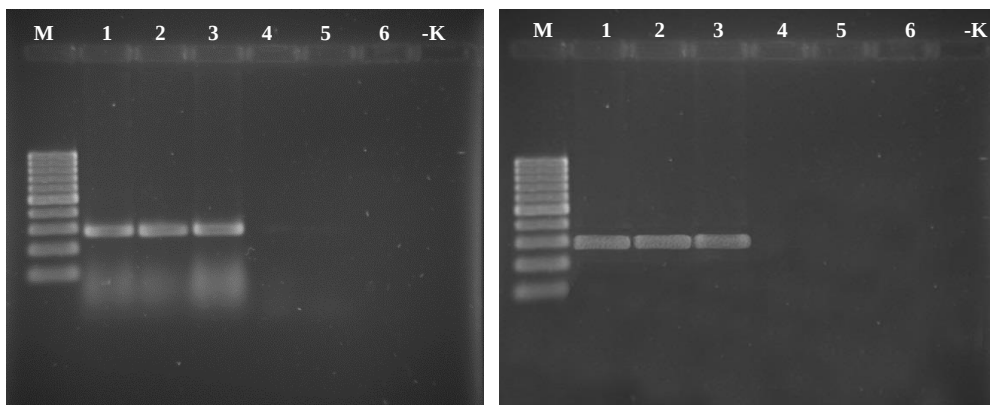
Slika 50. 1,5% agarozni gel sa amplikonima veličine 535 dobijenih prajmerima MO368-5 / MO368-10R u PCR metodi (Cote et al., 2004). M-marker 100 bp; 1, 2, 3-izolati *M. fructicola* (MFC-20; MFC-1 i a-100); -K–negativna kontrola.

Korišćenjem prajmera ITS1 / Mfg-R2 dizajniranim od strane **Hughes et al. (2000)** amplikoni veličine oko 460 bp dobijeni su kod svih izolata *M. fructigena* (MFSRB-1, MFSRB-6, MFSRB-3, MFSRB-2, MFSRB-10 i MCG) i *M. polystroma* (MPSRB-13, MPSRB-20, MPSRB-2, MP-13 i 0603202046), dok kod negativne kontrole, kao i ispitivanih izolata *M. laxa* i *M. fructicola* nije došlo do amplifikacije (Slika 51). Upotrebom prajmera Mfc-F1 / Mfc-R1 amplikoni veličine oko 280 bp

dobijeni samo kod izolata *M. fructicola* (MFC-1; MFC-20; a-100) (Slika 52), dok sa prajmerima Ml-Mfg-F2 / Ml-Mfc-R1 PCR amplikoni veličine oko 280 bp dobijeni samo kod izolata *M. laxa* (MLX-SV1, MLX-13 i C-28) (Slika 53). Ovi prajmeri nisu amplifikovali negativnu kontrolu, kao i sve testirane izolate *M. fructigena* i *M. polystroma*.



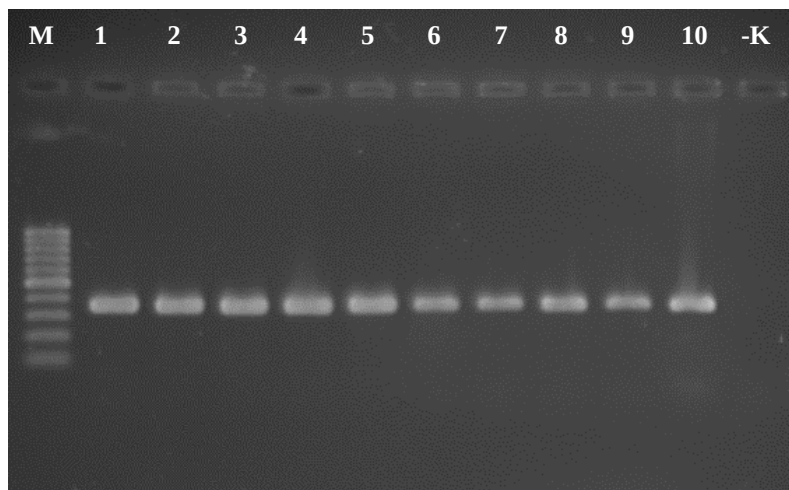
Slika 51. 1,5% agarozni gel sa amplikonima veličine 460 bp dobijenim PCR metodom sa ITS1 / Mfg-R2 prajmerima (Hughes et al., 2000) M-marker 100 bp; 1-5-izolati *M. fructigena* (MFSRB-1, MFSRB-6, MFSRB-3, MFSRB-10 i MCG); 6-10-izolati *M. polystroma* (MPSRB-13, MPSRB-20, MPSRB-2, MP-13 i 0603202046); -K–negativna kontrola.



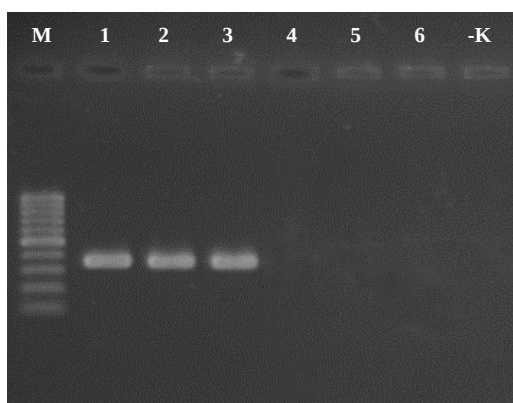
Slika 52. 1,5% agarozni gel sa ampliconima veličine 280 bp dobijenih PCR metodom sa prajmerima Mfc-F1 / Mfc-R1 (Hughes et al., 2000) M-marker 100 bp; 1-3, izolati *M. fructicola* (MFC-20; MFC-1; a-100); 4-izolat *M. fructigena* (MFSRB-1); 5-izolat *M. polystroma* (MPSRB-20); 6-izolat *M. laxa* (MLX-SV1); K–negativna kontrola.

Slika 53. 1,5% agarozni gel sa ampliconima veličine 280 bp dobijenih PCR metodom sa prajmerima Ml-Mfg-F2 / Ml-Mfc-R1 (Hughes et al., 2000) M- marker 100 bp; 1-3 izolati *M. laxa* (MLX-SV1; MLX-13; C-28); 4-izolat *M. fructigena* (MFSRB-1); 5-izolat *M. polystroma* (MPSRB-20); 6-*M. fructicola* (MFC-20); K–negativna kontrola.

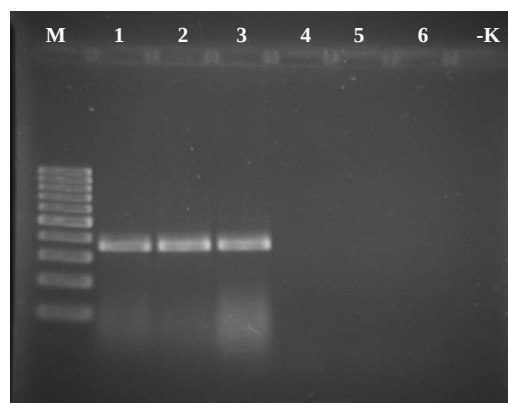
Upotrebom prajmera ITS1Mfgn / ITS4Mfgn dizajniranim od strane **Ioos and Frey (2000)**, ampliconi veličine oko 350 bp dobijeni su kod izolata *M. fructigena* i *M. polystroma* (Slika 54), dok do amplifikacije nije došlo kod izolata *M. fructicola* i *M. laxa*, kao i negativne kontrole. Korišćenjem prajmera ITS1Mlx / ITS4Mlx PCR ampliconi veličine oko 350 bp dobijeni su kod svih izolata *M. laxa*, dok su prajmerima ITS1Mfcl / ITS4Mfcl ampliconi veličine oko 350 bp dobijeni kod svih izolata *M. fructicola* (Slika 55 i 56). Upotrebom ova dva para prajmera (ITS1Mlx / ITS4Mlx i ITS1Mfcl / ITS4Mfcl) do amplifikacije nije došlo kod ispitivanih izolata *M. fructigena*, *M. polystroma* i negativne kontrole. Prajmeri ITS1Mlx / ITS4Mlx nisu amplifikovali izolate *M. fructicola*, a prajmeri ITS1Mfcl / ITS4Mfcl izolate *M. laxa*.



Slika 54. 1,5% agarozni gel sa ampliconima veličine oko 350 bp dobijenim PCR metodom sa prajmerima ITS1Mfgn / ITS4Mfgn (Ioos and Frey, 2000) M-marker 100 bp; 1-5 izolati *M. fructigena* (MFSRB-1, MFSRB-6, MFSRB-3, MFSRB-10 i MCG); 6-10 izolati *M. polystroma* (MPSRB-13, MPSRB-20, MPSRB-2, MP-13 i 063202046); -K–negativna kontrola.



Slika 55. 1,5% agarozni gel sa ampliconima veličine oko 350 bp dobijenih PCR metodom prajmerima ITS1Mfcl / ITS4 Mfcl Ioos and Frey (2000) M-marker 100 bp; 1-3 izolati *M. fructicola* (MFC-20; MFC-1); 4-izolat *M. fructigena* (MFSRB-1); 5-izolat *M. polystroma* (MPSRB-20); 6-izolat *M. laxa* (MLX-SV1); -K–negativna kontrola.



Slika 56. 1,5% agarozni gel sa ampliconima veličine oko 350 bp dobijenih PCR metodom prajmerima ITS1Mlx / ITS4Mlx Ioos and Frey (2000) M-marker 100 bp; 1-3 izolati *M. laxa* (MLX-SV1; MLX-13; C-28); 4-izolat *M. fructigena* (MFSRB-1); 5-izolat *M. polystroma* (MPSRB-20); 6-izolat *M. fructicola* (MFC-20); -K–negativna kontrola.

Tabela 37. PCR produkti dobijeni korišćenjem specifičnih prajmera za molekularnu detekciju *Monilinia* spp. dizajniranim od strane **Ioos and Frey (2000)**, **Hughes et al. (2000)** i **Cote et al. (2004)**.

Vrsta	Izolati	PCR produkti									
		Ioos and Frey (2000)			Hughes et al. (2000)			Cote et al. (2004)			
		A	B	C	A	B	C	A	B	C	D
<i>M. fructigena</i>	MFSRB-1	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
	MFSRB-6	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
	MFSRB-3	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
	MFSRB-10	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
	MFSRB-2	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
	MCG	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
<i>M. polystroma</i>	MP-13	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
	MPSRB-20	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
	MPSRB-2	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
	MP13	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
	063202046	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
<i>M. fruticola</i>	MFC-20	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
	MFC-1	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
	a-100	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
<i>M. laxa</i>	MLX-SV1	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
	MLX-13	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
	C-28	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-

Legenda: A-amplikon specifičan za *M. fructigena*; B-amplikon specifičan za *M. laxa*; C-amplikon specifičan za *M. fruticola*; D-amplikon specifičan za *M. polystroma*; + pojava amplikona specifične veličine; - nije došlo do amplifikacije.

Prajmeri specifični za detekciju *M. fruticola* i *M. laxa* pokazali su se i u ovim istraživanjima kao specifični za ove dve vrste. Međutim, prajmeri specifični za *M. fructigena* dizajnirani od strane **Ioos and Frey (2000)** i **Hughes et al. (2000)** su pored *M. fructigena* amplifikovali i izolate *M. polystroma*. Jedini prajmeri koji su se pokazali pouzdanim za detekciju *M. polystroma* bili su prajmeri koje su dizajnirali **Cote et al. (2004)**.

5.5.2. Analiza sekvenci ITS rDNA regiona *Monilinia* spp.

Posle sekvenciranja, konsezusi nukleotidnih sekvenci genomnog ITS rDNK regiona ukupno 19 izolata *Monilinia* spp. su deponovani u GenBank bazu podataka i dodeljeni su im pristupni brojevi (Tabela 38). Dobijene su sekvence osam izolata *M. fructigena*, sedam izolata *M. polystroma*, dva izolata *M. laxa* i dva izolata *M. fructicola*.

Međusobnim poređenjem dobijenih sekvenci nije uočena varijabilnost u ITS rDNK regionu između izolata iste vrste. Utvrđeno je da se *M. fructigena* razlikovala od *M. polystroma* u pet nukleotida, od *M. laxa* u devet nukleotida, a od *M. fructicola* u 13 nukleotida. Dok je razlika *M. laxa* u odnosu na *M. polystroma* iznosila šest nukleotida, a u odnosu na *M. fructicola* tri nukleotida. Sekvence ovog regiona *M. polystroma* su se razlikovale od sekvenci *M. fructicola* u deset nukleotida.

MegaBlast analizom utvrđeno je da su sekvence *M. fructigena* bile identične, sa šest sekvenci istog regiona *M. fructigena* deponovanih u GenBank bazi podataka poreklom iz Litvanije (KP903605 i KP903577), Srbije (KC544807 i KC544805), Španije (EF207424) i Francuske (AF150677). Sekvence *M. polystroma* su bile identične sa svim deponovanim sekvencama ove vrste (KP279655, KP279656, KP279657, KP279658, KP279659, KP279660, JX315717) i 99% slične sa prvom deponovanom sekvencom *M. polystroma* (Y17876). Sekvence *M. laxa* su bile identične sa deset deponovanih sekvenci *M. laxa* poreklom sa koštičavog voća iz Srbije, sekvencama iz Španije (EF153013) i Čilea (EU042149). Sekvence *M. fructicola* su bile identične sa sedam deponovanih sekvenci *M. fructicola* iz Koreje (KM279616), SAD (KJ541032), Srbije (KC544809), Slovenije (GU967379), Kine (FJ515894), Italije (FJ411109) i Španije (EF207419).

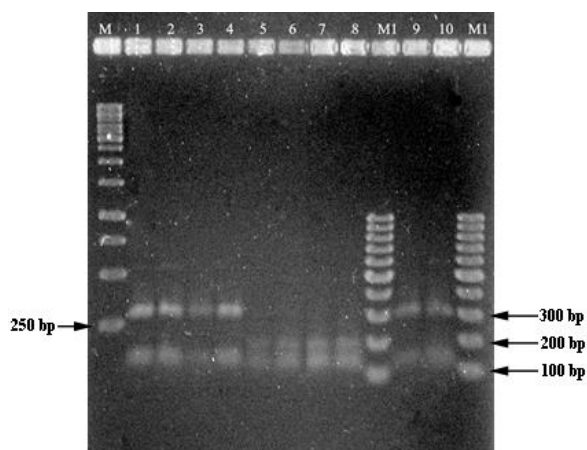
Tabela 38. Sekvence izolata *Monilinia* spp., poreklom iz plodova jabuke u Srbiji, dostupnih u GenBank-NCBI bazi podataka.

Vrsta	Izolat	Lokalitet	Sorta	GenBank pristupni broj
<i>M. polystroma</i>	MPSRB-2G	Bela Crkva	Greni Smit	KP279655
<i>M. polystroma</i>	MPSRB-20	Bela Crkva	Ajdared	KP279656
<i>M. polystroma</i>	MPSRB-13	Bela Crkva	Zlatni Delišeš	KP279657
<i>M. polystroma</i>	MP-13	Bela Crkva	Ajdared	JX315717
<i>M. polystroma</i>	MPSRB-3	Bela Crkva	Ajdared	KP279658
<i>M. polystroma</i>	MPSRB-2	Bela Crkva	Ajdared	KP279659
<i>M. polystroma</i>	MPSRB-36	Bela Crkva	Ajdared	KP279660
<i>M. fructigena</i>	MFSRB-1	Svilajnac	Zlatni Delišeš	KP279661
<i>M. fructigena</i>	MFSRB-10	Bela Crkva	Zlatni Delišeš	KP279662
<i>M. fructigena</i>	MFSRB-17	Grocka	Ajdared	KP279663
<i>M. fructigena</i>	MFSRB-2	Grocka	Zlatni Delišeš	KP279664
<i>M. fructigena</i>	MFSRB-32	Svilajnac	Ajdared	KP279665
<i>M. fructigena</i>	MFSRB-6	Svilajnac	Ajdared	KP279666
<i>M. fructigena</i>	MFSRB-3	Topola	Zlatni Delišeš	KP279667
<i>M. fructigena</i>	MFSRB-22	Bela Crkva	Zlatni Delišeš	KP279668
<i>M. fructicola</i>	MFC-20	Grocka	Zlatni Delišeš	JN176564
<i>M. fructicola</i>	MFC-28	Ruma	Elstar	KN695550
<i>M. laxa</i>	MLX-SV1	Svilajnac	Ajdared	KP279669
<i>M. laxa</i>	MLX-7	Svilajnac	Ajdared	KN695549

5.5.3. RFLP analiza ITS rDNK regiona *Monilinia* spp.

Virtuelna RFLP analiza dobijenih sekvenci ITS rDNK regiona sa odabranim *HhaI* restrikcijom pokazala je tri restrikcijona mesta za ovaj enzim kod izolata *M. polystroma* poreklom iz Srbije, dok su sekvence izolata *M. fructigena*, *M. fructicola* i *M. laxa* imale po dva restrikcijona mesta. Takođe i analizom 11 sekvenci ovog regiona izolata *M. polystroma* deponovanih u GenBank bazi podataka kod svih sekvenci utvrđeno je prisustvo tri restrikcijona mesta, dok su sve sekvence *M. laxa* (41), *M. fructicola* (76) i 42 od 44 ispitivanih sekvenci *M. fructigena* imale po dva restrikcijona mesta za *HhaI* enzim (Prilog 1). Dve sekvence *M. fructigena* (AB470882 i FJ515891) deponovane u GenBank bazi podataka su nakon virtualne RFLP analize sekvenci imale tri restrikcijona mesta karakteristična za vrstu *M. polystroma*. Posle digestije *HhaI* enzimom očekivane veličine fragmenata kod *M. polystroma* su 110 bp, 120 bp, 136 bp i 176 bp, a kod ostalih vrsta 110 bp, 136 bp i 296 bp.

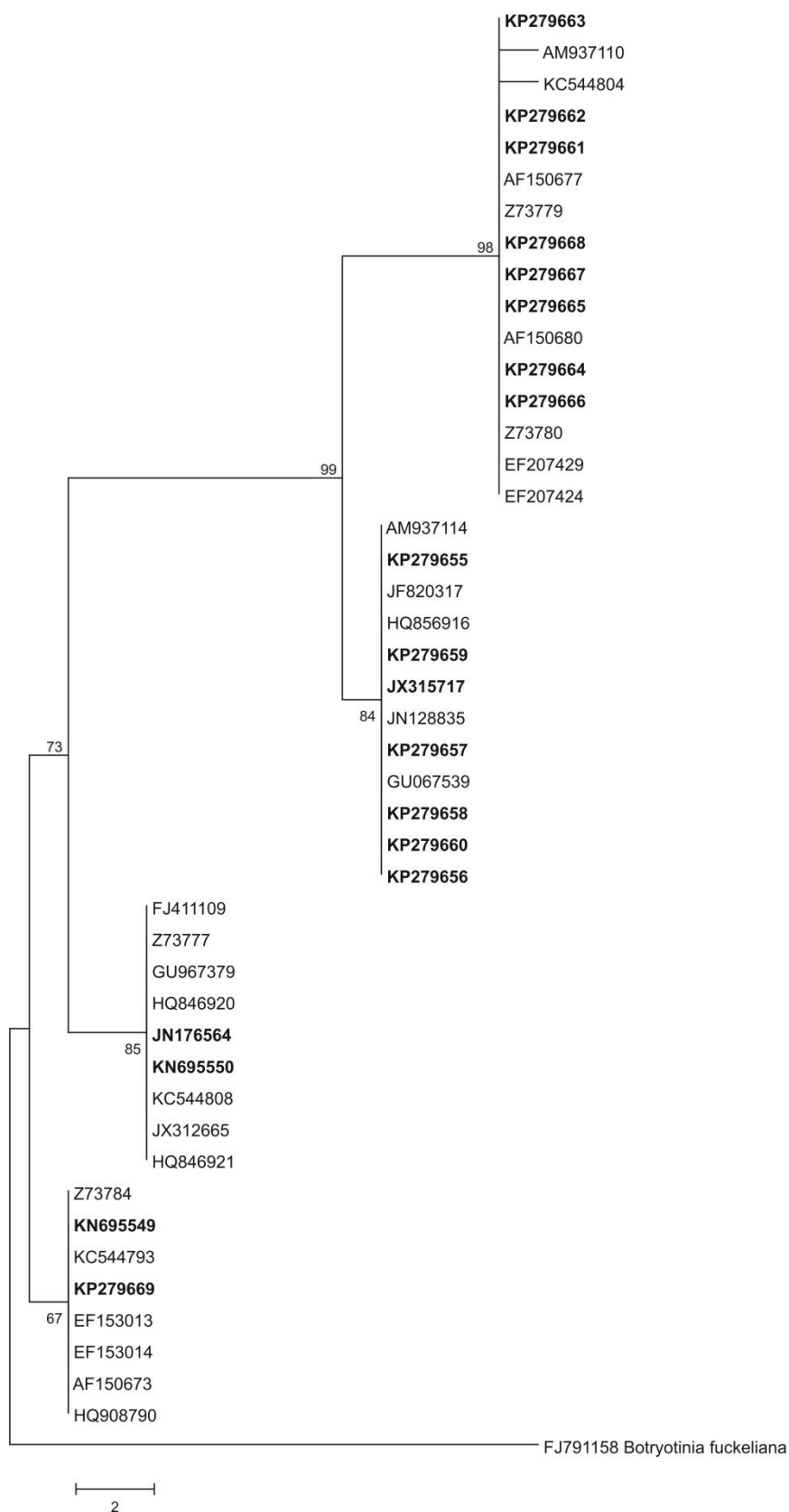
RFLP analiza sa *HhaI* enzimom ITS1 / ITS4 PCR produkata odabranih izolata *M. fructigena*, *M. polystroma*, *M. laxa* i *M. fructicola*, potvrdila je rezultate virtualne RFLP analize. Nakon digestije *HhaI* restrikcijom enzimom svi ispitivani izolati *M. polystroma* (MPSRB-3, MPSRB-20, MP13 i MPSRB-36) su imali međusobno identične elektroforetske profile koji su se razlikovali od izolata MFSRB-10, MFSRB-3, MFSRB-17 i MFSRB-1 vrste *M. fructigena*, MFC-20 vrste *M. fructicola* i MLX-SV1 vrste *M. laxa* (Slika 57).



Slika 57. 2% agarozni gel sa restrikcijom profilima ITS1 / ITS4 amplikona posle digestije *HhaI* enzimom. M-marker 1-kbp (Fermentas, Vilnius, Lithuania); M1-marker 100-bp (Fermentas, Vilnius, Lithuania); 1-4-izolati *M. fructigena* (MFSRB-10, MFSRB-3, MFSRB-17 i MFSRB-1); 5-8-izolati *M. polystroma* (MPSRB-3, MPSRB-20, MP13 i MPSRB-36); 9-*M. fructicola* (MFC-1); 10- *M. laxa* (MLX-7).

5.5.4. Filogenetska analiza ITS rDNK regiona *Monilinia* spp.

Filogenetska analiza dela ITS rDNK regiona *Monilinia* spp. pokazala je da je svaka vrsta formirala stabilnu granu sa visokim bootstrap brojem (Slika 58). Takođe, potvrđena je i filogenetska bliskost između *M. fructigena* i *M. polystroma*. Izolati četiri vrste analizirani u ovom radu su se grupisali sa ostalim izolatima iste vrste poreklom iz različitih zemalja, što je u saglasnosti sa njihovom identifikacijom.

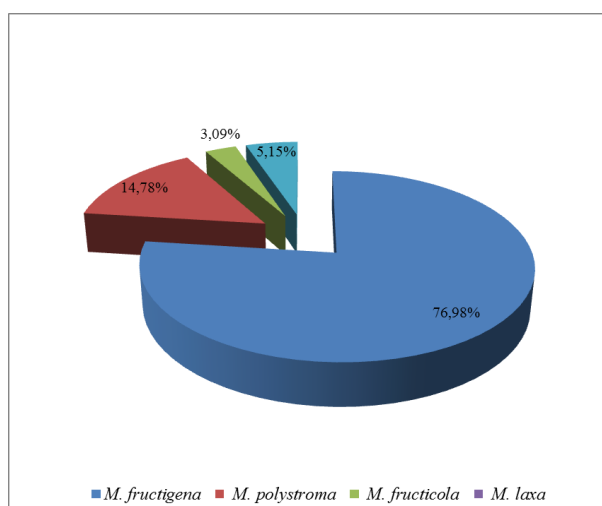


Slika 58. Filogenetsko stablo *Monilinia* spp. zasnovano na sekvencama dela ITS rDNK regiona dobijeno Maximum Parsimony metodom sa bootstrap analizom u 1000 ponavljanja (prikazane su bootstrap vrednosti veće od 60).

5.6. Zastupljenost vrsta roda *Monilinia* na plodovima jabuke u Srbiji

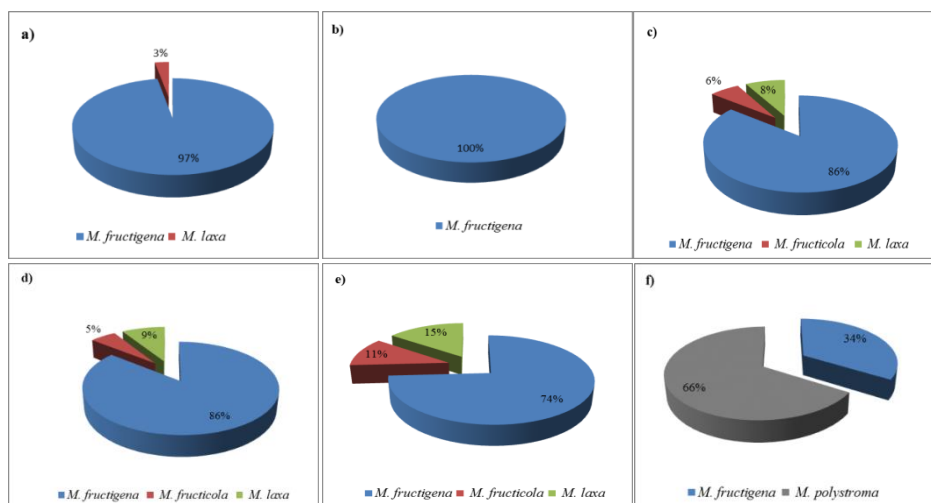
Zastupljenost vrsta roda *Monilinia* u voćnjacima jabuke

Iz simptomatičnih plodova jabuka pet sorti sakupljenih tokom trogodišnjeg istraživanja od 2010. do 2012. godine u šest lokaliteta dobijen je 291 izolat *Monilinia* spp. Od ukupnog broja izolata 224 (76,98%) je identifikovano kao *M. fructigena*, 43 (14,78%) kao *M. polystroma*, 9 (3,09%) kao *M. fructicola* i 15 (5,15%) kao *M. laxa* (Grafik 22; Tabela 39).



Grafik 22. Procentualna zastupljenost *Monilinia* spp. u voćnjacima jabuke u Srbiji.

U lokalitetu Svilajnac *M. fructigena* bila je utvrđena u 97% uzoraka, a *M. laxa* u 3% uzoraka (Grafik 23 a). U lokalitetu Topola *M. fructigena* je bila utvrđena u svim uzorcima (100%) (Grafik 23 b). U lokalitetu Ruma *M. fructigena* je utvrđena u 86% uzoraka plodova jabuke, *M. fructicola* u 6% i *M. laxa* u 8% (Grafik 23 c). U lokalitetu Smederevo *M. fructigena* bila je najzastupljeniji prouzrokovatelj smeđe truleži (86%), zatim *M. laxa* (9%) i *M. fructicola* (5%) (Grafik 23 d). U lokalitetu Grocka *M. fructigena* bila je utvrđena u 74% uzoraka, *M. fructicola* u 11%, a *M. laxa* u 15% uzoraka (Grafik 23 e). U lokalitetu Bela Crkva ustanovljeno je dominantno prisustvo *M. polystroma* sa 66%, dok je *M. fructigena* bila identifikovana u 34% uzoraka (Grafik 23 f). U 2011. godini *M. polystroma* je bila identifikovana u 62,07%, a *M. fructigena* u 37,93% uzoraka plodova jabuke, dok je u 2012. godini *M. polystroma* bila utvrđena u 69,45% uzoraka, a *M. fructigena* u 30,55% (Tabela 39).



Grafik 23. Procentualna zastupljenost *Monilinia* spp. u voćnjacima po lokalitetima: a- Svilajnac; b-Topola; c-Ruma; d-Smederevo; e-Grocka; f-Bela Crkva.

Tabela 39. Zastupljenost *Monilinia* spp. na plodovima jabuke u vegetaciji u Srbiji tokom 2010., 2011. i 2012. godine.

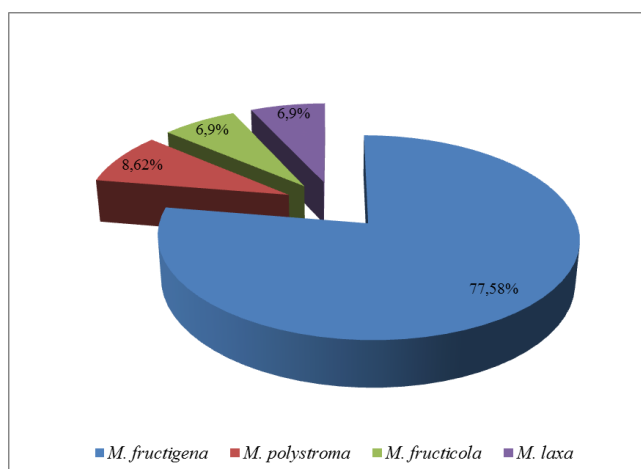
Godina	Lokalitet (broj uzoraka)	Sorta	Izolovana vrsta			
			<i>M. fructigena</i>	<i>M. polystroma</i>	<i>M. fructicola</i>	<i>M. laxa</i>
2010	Svilajnac (10)	Zlatni Delišeš	10 / 10* 100%**	-	-	-
	Svilajnac (12)	Ajdared	12 / 12 100%	-	-	-
	Smederevo (9)	Zlatni Delišeš	9 / 9 100%	-	-	-
	Smederevo (8)	Ajdared	8/8 100%	-	-	-
2011	Svilajnac (11)	Zlatni delišeš	11 / 11 100%	-	-	-
	Svilajnac (32)	Ajdared	30 / 32 93,75%	-	-	2 / 32 6,25%
	Svilajnac (6)	Jonagold	6 / 6 100%	-	-	-
	Smederevo (17)	Zlatni delišeš	13 / 17 76,47%	-	1 / 17 5,88%	3 / 17 17,65%
	Smederevo (12)	Ajdared	10 / 12 83,33%	-	2 / 12 16,67%	-
	Grocka (27)	Zlatni delišeš	20 / 27 74,07%	-	3 / 27 11,12%	4 / 27 14,81%
	Bela crkva (15)	Ajdared	5 / 15 33,33%	10 / 15 66,67%	-	-
	Bela crkva (14)	Zlatni delises	6 / 14 42,85%	8 / 14 57,14%	-	-
	Ruma (13)	Ajdared	13 / 13 100%	-	-	-
	Ruma (36)	Elstar	29 / 36 80,56%	-	3 / 36 7,89%	4 / 36 10,53%
	Topola (14)	Zlatni delišeš	14 / 14 100%	-	-	-
	Topola (5)	Ajdared	5 / 5 100%	-	-	-
	Topola (3)	Greni smit	3 / 3 100%	-	-	-
	Smederevo (11)	Ajdared	9 / 11 81,82%	-	-	2 / 11 18,18%
	Bela Crkva (14)	Ajdared	6 / 14 42,86	8 / 14 57,14%	-	-
2012	Bela Crkva (10)	Zlatni Delišeš	3 / 10 30%	7 / 10 70%	-	-
	Bela Crkva (7)	Greni Smit	2 / 7 28,57%	5 / 7 71,43%	-	-
	Bela Crkva (5)	Stark Grivs	-	5 / 5 100%	-	-
		Ukupno	224 / 291 76,98%	43 / 291 14,78%	9 / 291 3,09%	15 / 291 5,15%

Legenda *Broj zaraženih / ukupan broj; ** procenat zaraze.

Zastupljenost vrsta roda *Monilinia* u skladištima

Iz simptomatičnih plodova jabuka pet sorti tokom trogodišnjeg istraživanja od 2010. do 2011. godine u četiri lokaliteta u Srbiji dobijeno je 58 izolata *Monilinia* spp. Od ukupnog broja izolata 45 (77,58%) je identifikovano kao *M. fructigena*, 5 (8,62%) kao *M. polystroma*, 4 (6,9%) kao *M. fructicola* i 4 (6,9%) kao *M. laxa* (Grafik 24 i Tabela 40).

U lokalitetu Svilajnac *M. fructigena* je utvrđena u svim uzorcima (100%). U lokalitetu Smederevo *M. fructigena* je utvrđena u 80,95% uzoraka, a *M. laxa* u 19,05% uzoraka. U lokalitetu Grocka *M. fructigena* je utvrđena 69,23% uzoraka i *M. fructicola* u 30,77% uzoraka. U lokalitetu Bela Crkva *M. polystroma* je bila identifikovana u 55,56%, a *M. fructigena* 44,44% uzoraka.



Grafik 24. Procentualna zastupljenost *Monilinia* spp. u skladištima u Srbiji.

Tabela 40. Zastupljenost vrsta roda *Monilinia* spp. na plodovima jabuke u skladištima.

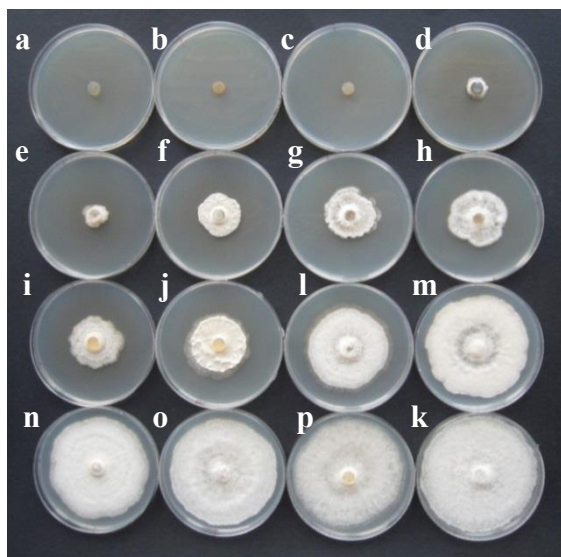
Godina	Lokalitet (broj uzoraka)	Sorta	Izolavana vrsta			
			<i>M. fructigena</i>	<i>M. polystroma</i>	<i>M. fructicola</i>	<i>M. laxa</i>
2010	Svilajnac (6)	Zlatni delišes	6 / 6* 100%**	-	-	-
	Svilajnac (9)	Ajdared	9 / 9 100%	-	-	-
2011	Smederevo (10)	Zlatni delišes	8 / 10 80%	-	-	2 / 10 20%
	Smederevo (11)	Ajdared	9 / 11 81,82%	-	-	2 / 11 18,18%
	Grocka (13)	Zlatni delišes	9 / 13 69,23%	-	4 / 13 30,77%	-
	Bela crkva (9)	Ajdared	4 / 9 44,44%	5 / 9 55,56%	-	-
	Ukupno		45 / 58 77,58%	5 / 58 8,62%	4 / 58 6,9%	4 / 58 6,9%

Legenda: *Broj zaraženih / ukupan broj; **procenat zaraze

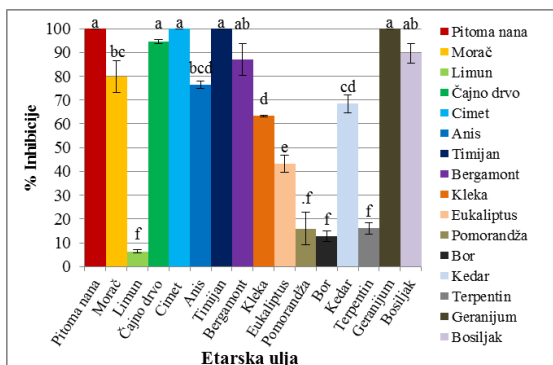
5.7. Antifungalno delovanje etarskih ulja na *M. fructigena*

5.7.1. *In vitro* fumigantno delovanje različitih etarskih ulja na porast micelije *M. fructigena*

Svih 16 ispitivanih etarskih ulja u koncentraciji 0,157 µl / ml vazduha inhibirali su porast micelije *M. fructigena* od 6% do 100% (Slika 59; Grafik 25). Potpuna inhibicija porasta micelije zabeležena je pri delovanju para četiri etarska ulja. Fungicidno dejstvo ispoljila su ulja timijana, pitome nane i geranijuma, a fungistatično dejstvo ulje cimeta. Jak inhibitorni efekat ostvarila su ulja čajnog drveta (94,61%), bosiljka (89,72%) i bergamonta (87,08%). Najslabije dejstvo imala su ulja limuna (6%), bora (12%), pomorandže (15%) i terpentina (16%), dok su ostala etarska ulja ispoljila umereno inhibitorno dejstvo (43,1-79,1%).



Slika 59. Fumigantno delovanje različitih etarskih ulja na porast micelije *M. fructigena* in vitro u koncentraciji 0,157 µl / ml vazduha. Legenda: a–pitoma nana, b–geranijum, c–timijan, d–čajno drvo, e–bosiljak, f–bergamont, g–morač, h–anis, i–kedar, j–kleka, m–terpentin, n–pomorandža, o–bor, p –limun, k–kontrola.



Grafik 25. Fumigantno delovanje etarskih ulja u koncentraciji 0,157 µl / ml vazduha na porast micelije *M. fructigena* in vitro. Vertikalni bar predstavlja standardnu grešku sredine. Istim slovima označene su grupe između kojih nije uočena statistički značajna razlika Tukey HSD testom ($p < 0,05$).

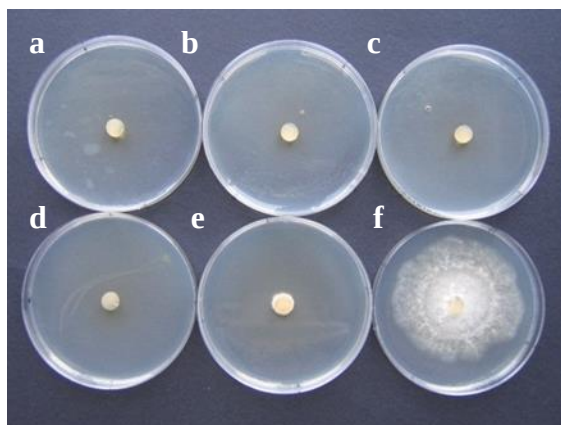
5.7.2. In vitro delovanje etarskih ulja pitome nane, geranijuma i timijana na porast micelije *M. fructigena*

Delovanje etarskog ulja pitome nane na porast micelije

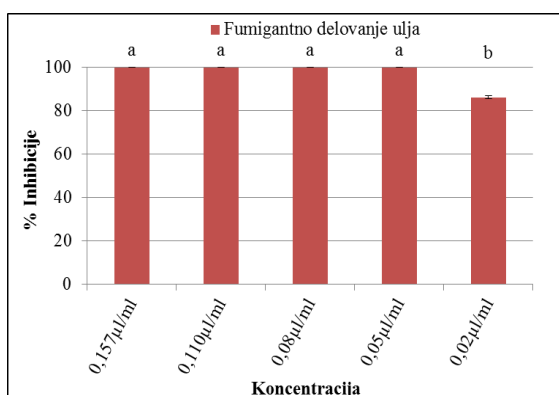
Sve ispitivane koncentracije etarskog ulja pitome nane primenjene kontaktno i fumigantno inhibirile su porast micelije *M. fructigena* (Slika 60 i 61, Tabela 41).

Etarsko ulje pitome nane primenjeno fumigantno ostvarilo je MIC pri 0,05 µl / ml vazduha sa fungistatičnim dejstvom, dok je pri višim koncentracijama od 0,08 µl / ml, 0,110 µl / ml i 0,157 µl / ml vazduha ulje delovalo fungicidno. Ulje primenjeno u koncentraciji od 0,02 µl / ml vazduha ispoljilo je inhibitorno delovanje od 86,11% na porast micelije *M. fructigena* (Grafik 26).

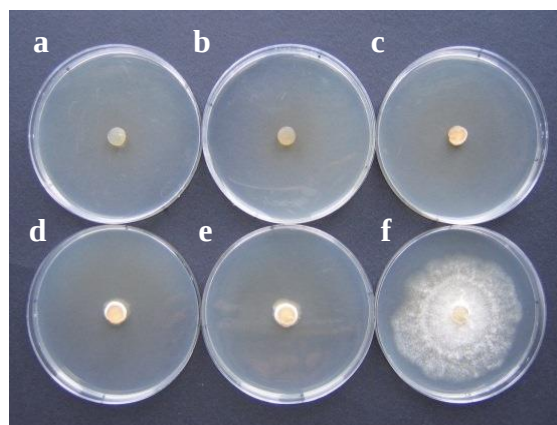
Etarsko ulja pitome nane primenjeno kontaktno ostvarilo je MIC pri 0,47 µl / ml podloge sa fungicidnim dejstvom. Fungicidno dejstvo ostvareno je i pri višoj koncentraciji od 0,67 µl / ml podloge. Ostale ispitivane koncentracije etarskog ulja ispoljile su antifungalno dejstvo od 84,68–99,48% i između njih nije bilo statistički značajnih razlika ($p < 0,05$) (Grafik 27).



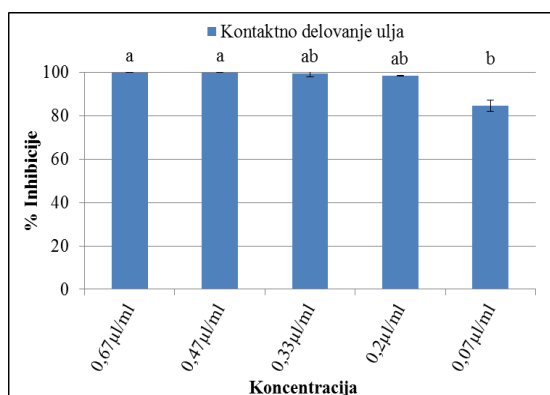
Slika 60. Fumigantno delovanje različitih koncentracija etarskog ulja pitome nane na porast micelije *M. fructigena* (a-0,157 μl / ml; b-0,110 μl / ml; c-0,08 μl / ml; d-0,05 μl / ml; e-0,02 μl / ml vazduha; f-kontrola).



Grafik 26. Fumigantno delovanje etarskog ulja pitome nane na porast micelije *M. fructigena* u koncentracijama od 0,157 μl / ml, 0,110 μl / ml, 0,08 μl / ml, 0,05 μl / ml i 0,02 μl / ml vazduha. Horizontalni bar predstavlja standardnu grešku sredine. Istim slovima označene su grupe između kojih nije uočena statistički značajna razlika Tukey HSD testom ($p < 0,05$).



Slika 61. Kontaktno delovanje različitih koncentracija etarskog ulja pitome nane na porast micelije *M. fructigena* (a-0,67 μl / ml; b-0,47 μl / ml; c-0,33 μl / ml; d-0,2 μl / ml; 0,07 μl / ml podloge; f-kontrola).

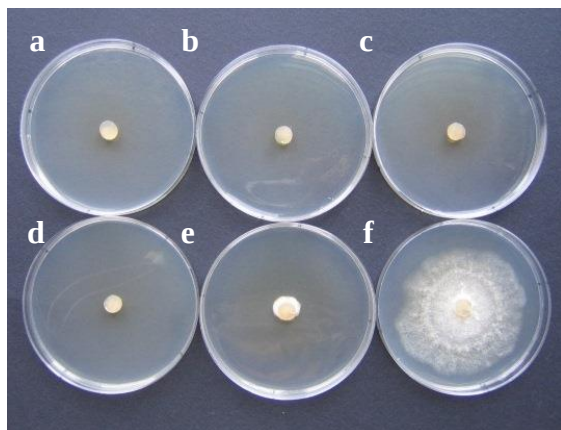


Grafik 27. Kontaktno delovanje etarskog ulja pitome nane na porast micelije *M. fructigena* u koncentracijama od 0,67 μl / ml, 0,47 μl / ml, 0,33 μl / ml, 0,2 μl / ml i 0,07 μl / ml KDA podloge. Horizontalni bar predstavlja standardnu grešku sredine. Istim slovima označene su grupe između kojih nije uočena statistički značajna razlika Tukey HSD testom ($p < 0,05$).

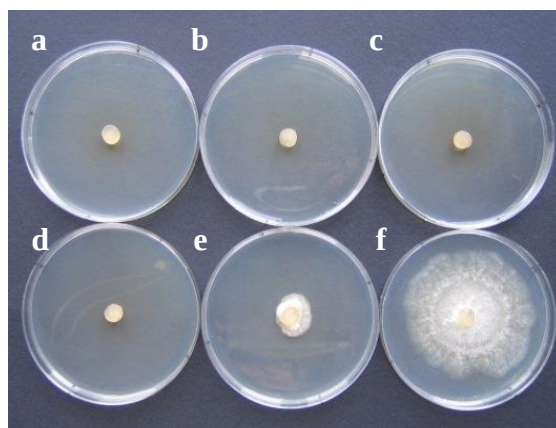
Delovanje etarskog ulja geranijuma na porast micelije

Različite koncentracije etarskog ulja geranijuma inhibirale su porast micelije *M. fructigena* primenjene fumigantno (Slika 62) i kontaktno (Slika 63). Etarsko ulje geranijuma primenjeno fumigantno ispoljilo je MIC pri 0,05 μl / ml vazduha sa fungistatičnim dejstvom, dok je pri višim koncentracijama ulja od 0,08 μl / ml, 0,110 μl / ml i 0,157 μl / ml vazduha ulje delovalo fungicidno. Ulje primenjeno u koncentraciji 0,02 μl / ml vazduha ispoljilo je inhibitorno delovanje od 92,8% (Grafik 28, Tabela 41).

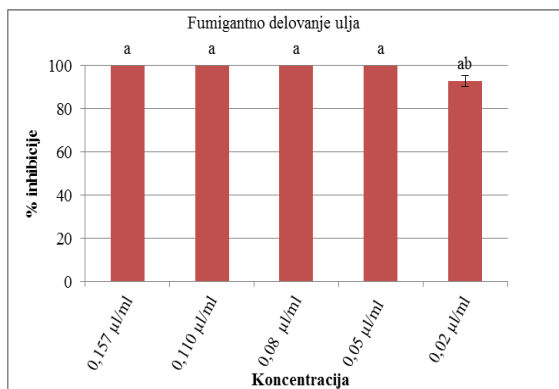
Etarsko ulje geranijuma primenjeno kontaktno ispoljilo je MIC pri 0,2 μl / ml podloge sa fungistatičnim dejstvom, dok je pri višim koncentracijama od 0,33 μl / ml, 0,47 μl / ml i 0,67 μl / ml podloge ulje imalo fungicidno dejstvo. Pri koncentraciji etarskog ulja od 0,07 μl / ml podloge ispoljeno je inhibitorno delovanje od 94,18% (Grafik 29, Tabela 41).



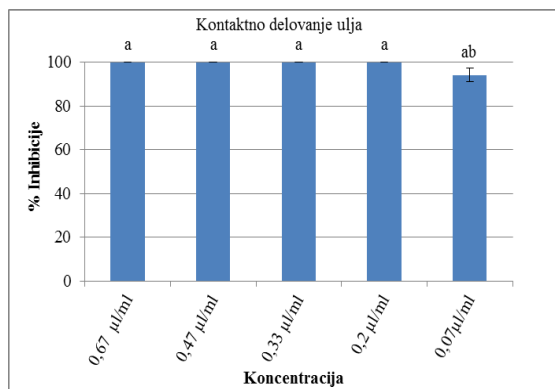
Slika 62. Fumigantno delovanje različitih koncentracija etarskog ulja geranijuma na porast micelije *M. fructigena* (a-0,157 μl / ml; b-0,110 μl / ml; c-0,08 μl / ml; d-0,05 μl / ml; e-0,02 μl / ml vazduha; f-kontrola).



Slika 63. Kontaktno delovanje različitih koncentracija etarskog ulja geranijuma na porast micelije *M. fructigena* (a-0,67 μl / ml; b-0,47 μl / ml; c-0,33 μl / ml; d-0,2 μl / ml; 0,07 μl / ml podloge; f-kontrola).



Grafik 28. Fumigantno delovanje etarskog ulja geranijuma na porast micelije *M. fructigena* u koncentracijama od 0,157 µl / ml, 0,110 µl / ml, 0,08 µl / ml, 0,05 µl / ml i 0,02 µl / ml vazduha. Horizontalni bar predstavlja standardnu grešku sredine. Istim slovima označene su grupe između kojih nije uočena statistički značajna razlika Tukey HSD testom ($p < 0,05$).



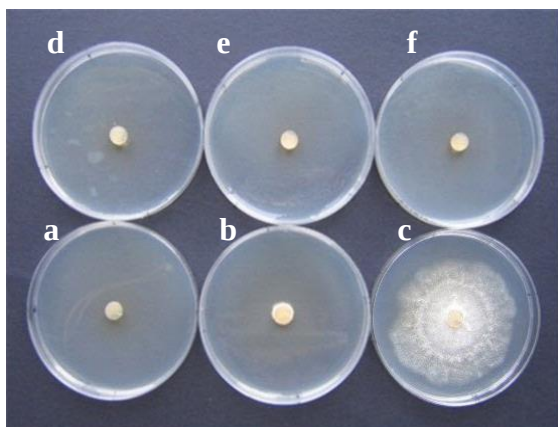
Grafik 29. Kontaktno delovanje etarskog ulja geranijuma na porast micelije *M. fructigena* u koncentracijama od 0,67 µl / ml, 0,47 µl / ml, 0,33 µl / ml, 0,2 µl / ml i 0,07 µl / ml KDA podloge. Horizontalni bar predstavlja standardnu grešku sredine. Istim slovima označene su grupe između kojih nije uočena statistički značajna razlika Tukey HSD testom ($p < 0,05$).

Delovanje etarskog ulja timijana na porast micelije

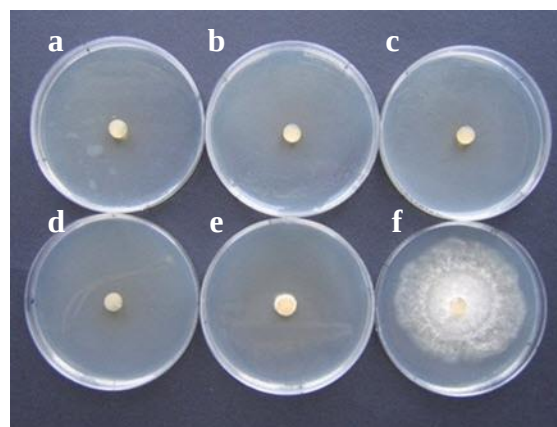
Sve ispitivane koncentracije etarskog ulja timijana su inhibirale porast micelije *M. fructigena* (Slika 64 i 65, Tabela 41).

Etarsko ulje timijana primenjeno fumigantno ostvarilo je MIC pri 0,05 µl / ml vazduha, sa ispoljenim fungicidnim dejstvom. Pri višim koncentracijama od 0,08 µl / ml, 0,110 µl / ml i 0,157 µl / ml vazduha ulje je imalo fungicidno dejstvo. Pri koncentraciji od 0,02 µl / ml vazduha inhibitorno dejstvo na porast micelije je iznosilo 94,18% (Grafik 30).

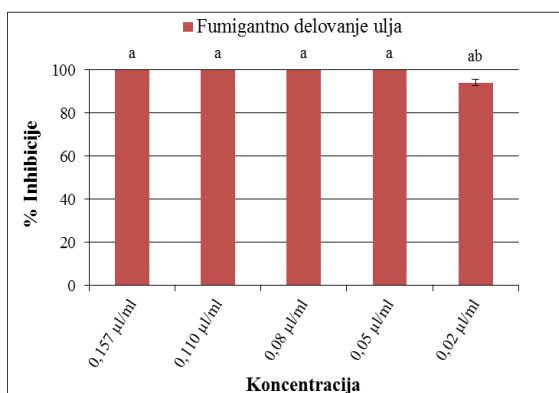
Etarsko ulje timijana primenjeno kontaktno ostvarilo je MIC pri 0,2 µl / ml podloge sa fungistatičnim delovanjem. Pri višim koncentracijama ulja od 0,33 µl / ml, 0,47 µl / ml i 0,67 µl / ml podloge ispoljeno je fungicidno dejstvo. U koncentraciji od 0,07 µl / ml podloge ulje je ostvarilo inhibitorno delovanje od 92,8% na porast micelije *M. fructigena* (Grafik 31).



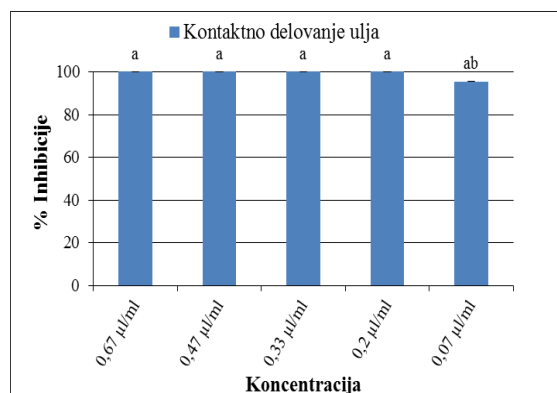
Slika 64. Fumigantno delovanje različitih koncentracija etarskog ulja timijana na porast micelije *M. fructigena* (a-0,157 µl / ml; b-0,110 µl / ml; c-0,08 µl / ml; d-0,05 µl / ml; e-0,02 µl / ml vazduha; f-kontrola).



Slika 65. Kontaktno delovanje različitih koncentracija etarskog ulja timijana na porast micelije *M. fructigena* (a-0,67 µl / ml; b-0,47 µl / ml; c-0,33 µl / ml; d-0,2 µl / ml; e-0,07 µl / ml podloge; f-kontrola).



Grafik 30. Fumigantno delovanje etarskog ulja timijana na porast micelije *M. fructigena* u koncentracijama od 0,157 µl / ml, 0,110 µl / ml, 0,08 µl / ml, 0,05 µl / ml i 0,02 µl / ml vazduha. Horizontalni bar predstavlja standardnu grešku sredine. Istim slovima označene su grupe između kojih nije uočena statistički značajna razlika Tukey HSD testom ($p < 0,05$).



Grafik 31. Kontaktno delovanje etarskog ulja timijana na porast micelije *M. fructigena* u koncentracijama od 0,67 µl / ml, 0,47 µl / ml, 0,33 µl / ml, 0,2 µl / ml i 0,07 µl / ml KDA podloge. Horizontalni bar predstavlja standardnu grešku sredine. Istim slovima označene su grupe između kojih nije uočena statistički značajna razlika Tukey HSD testom ($p < 0,05$).

U *in vitro* ispitivanjima MIC sva tri etarska ulja primenjena fumigantno na porast micelije *M. fructigena* iznosila je 0,05 µl / ml vazduha, dok je kontaktnim delovanjem etarsko ulje geranijuma i timijana imalo MIC pri 0,2 µl / ml podloge, a etarsko ulje pitome nane pri 0,47 µl / ml podloge (Tabela 41).

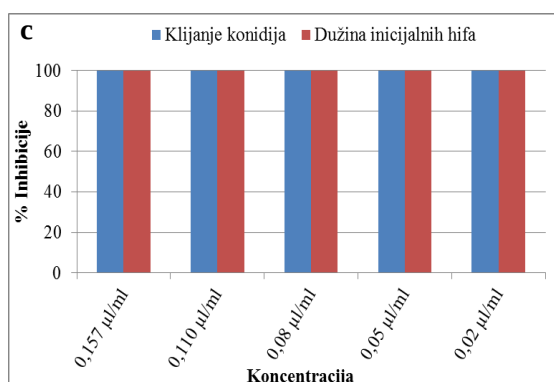
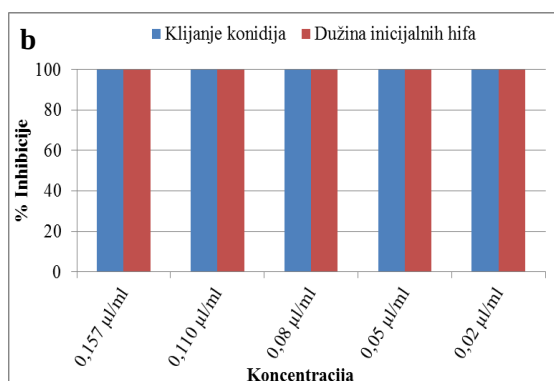
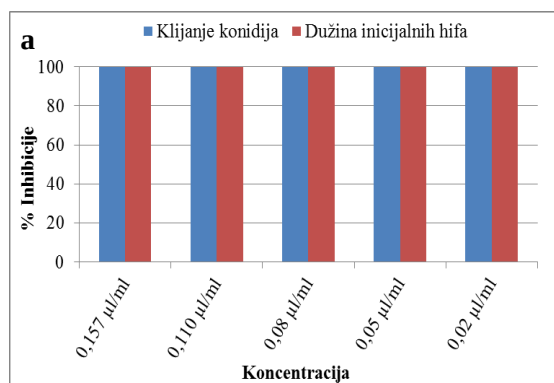
5.7.3. Delovanje etarskih ulja pitome nane, geranijuma i timijana na klijanje konidija i porast inicijalnih hifa *M. fructigena*

Sve ispitivane koncentracije etarskih ulja pitome nane, geranijuma i timijana primenjene kontaktno i fumigantno inhibirale su klijanje konidija i porast inicijalnih hifa (Grafik 32 i 33, Tabela 41).

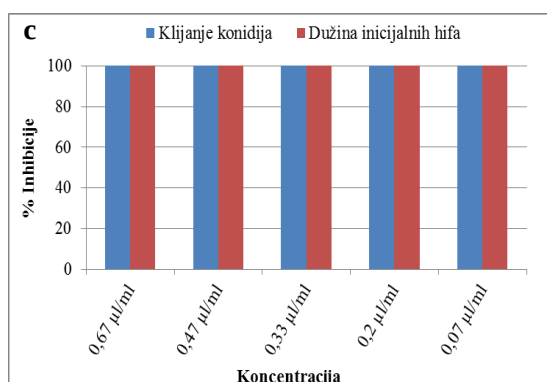
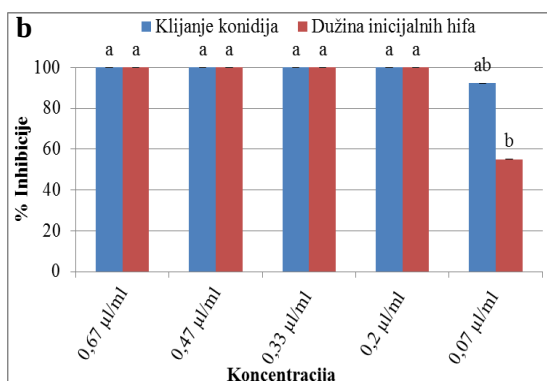
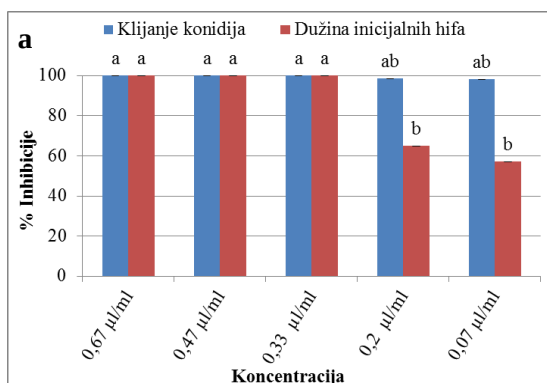
Potpuna inhibicija klijanja konidija *M. fructigena* utvrđena je pri fumigantnom delovanju svih ispitivanih koncentracija etarskih ulja pitome nane, geranijuma i timijana (Grafik 32 a-c), dok je kontaktnom primenom etarsko ulje timijana potpuno inhibiralo klijanje konidija u svim testiranim koncentracijama (Grafik 33 c).

Etarsko ulje pitome nane primenjeno kontaktno ispoljilo je MIC pri 0,33 μl / ml podloge. Ulje primenjeno u koncentraciji od 0,2 μl / ml ispoljilo je 98,58% inhibicije klijanja konidija i 65,45% inhibicije dužine inicijalnih hifa *M. fructigena*, dok u koncentraciji 0,07 μl / ml podloge klijanje konidija bilo je inhibirano 98,14%, a inhibicija dužine inicijalnih hifa iznosila je 57,63% (Grafik 33 a).

Etarsko ulje geranijuma primenjeno kontaktno ispoljilo je MIC pri 0,2 μl / ml podloge. Ulje primenjeno u koncentraciji 0,07 μl / ml podloge inhibiralo je klijanje konidija od 92,27% i porast inicijalnih hifa od 55% u odnosu na kontrolu (Grafik 33 b).



Grafik 32. Fumigantno dejstvo etarskog ulja pitome nane (a), geranijuma (b) i timijana (c) na porast micelije *M. fructigena* u koncentracijama od 0,157 µl / ml, 0,110 µl / ml, 0,08 µl / ml, 0,05 µl / ml i 0,02 µl / ml vazduha. Horizontalni bar predstavlja standardnu grešku sredine. Istim slovima označene su grupe između kojih nije uočena statistički značajna razlika Tukey HSD testom ($p < 0,05$).



Grafik 33. Kontaktno dejstvo etarskog ulja pitome nane (a), geranijuma (b) i timijana (c) na porast micelije *M. fructigena* u koncentracijama od 0,67 µl / ml, 0,47 µl / ml, 0,33 µl / ml, 0,2 µl / ml i 0,07 µl / ml KDA podloge. Horizontalni bar predstavlja standardnu grešku sredine. Istim slovima označene su grupe između kojih nije uočena statistički značajna razlika Tukey HSD testom ($p < 0,05$).

Tabela 41. *In vitro* antifungalno dejstvo etarskih ulja na porast micelije, klijanje konidija i porast inicijalnih hifa *M. fructigena*.

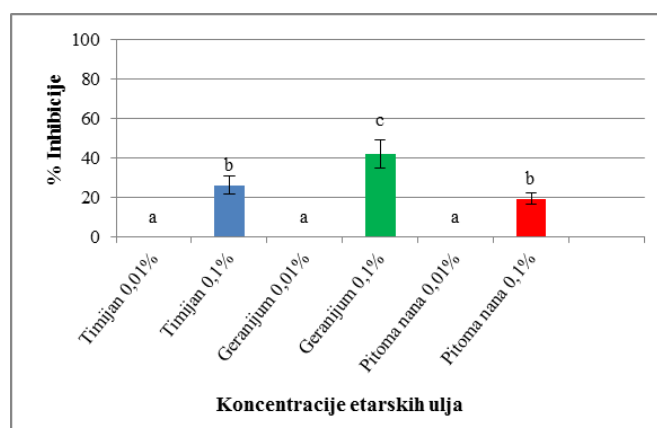
Etarsko ulje	<i>M. fructigena</i>	% Inhibicije $\pm$ SE									
		Fumigantno dejstvo (μ l / ml vazduha)					Kontaktno dejstvo (μ l / ml podloge)				
		0,157	0,110	0,08	0,05	0,02	0,67	0,47	0,33	0,2	0,07
Pitoma nana	Porast kolonija	100 $\pm$ 0a	100 $\pm$ 0a	100 $\pm$ 0a	100 $\pm$ 0a	86,11 $\pm$ 1,44b	100 $\pm$ 0a	100 $\pm$ 0a	99,4 $\pm$ 1,540ab	99,46 $\pm$ 0,30ab	84,68 $\pm$ 3,20b
	Klijanje konidija	100	100	100	100	100	100 $\pm$ 0a	100 $\pm$ 0a	100 $\pm$ 0a	98,58 $\pm$ 0ab	98,14 $\pm$ 0ab
	Porast inicijalnih hifa	100	100	100	100	100	100 $\pm$ 0a	100 $\pm$ 0a	100 $\pm$ 0a	65,45 $\pm$ 0b	57,63 $\pm$ 0b
Geranijum	Porast kolonija	100 $\pm$ 0a	100 $\pm$ 0a	100 $\pm$ 0a	100 $\pm$ 0a	92,8 $\pm$ 0,34ab	100 $\pm$ 0a	100 $\pm$ 0a	100 $\pm$ 0a	100 $\pm$ 0a	94,18 $\pm$ 0ab
	Klijanje konidija	100	100	100	100	100	100 $\pm$ 0a	100 $\pm$ 0a	100 $\pm$ 0a	100 $\pm$ 0a	92,27 $\pm$ 0ab
	Porast inicijalnih hifa	100	100	100	100	100	100 $\pm$ 0a	100 $\pm$ 0a	100 $\pm$ 0a	100 $\pm$ 0a	55 $\pm$ 0,56b
Timijan	Porast kolonija	100 $\pm$ 0a	100 $\pm$ 0a	100 $\pm$ 0a	100 $\pm$ 0a	94,18 $\pm$ 0,23ab	100 $\pm$ 0a	100 $\pm$ 0a	100 $\pm$ 0a	100 $\pm$ 0a	92,8 $\pm$ 0,43ab
	Klijanje konidija	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	Porast inicijalnih hifa	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Legenda: Istim slovima su označene grupe u redovima između kojih nije utvrđena statistički značajna razlika Tukey HSD testom ($p < 0,05$); SE-standardna greška sredine.

5.7.4. *In vivo* fumigantno protektivno i kurativno delovanje etarskih ulja na *M. fructigena*

Fumigantno protektivno delovanje etarskih ulja na *M. fructigena*

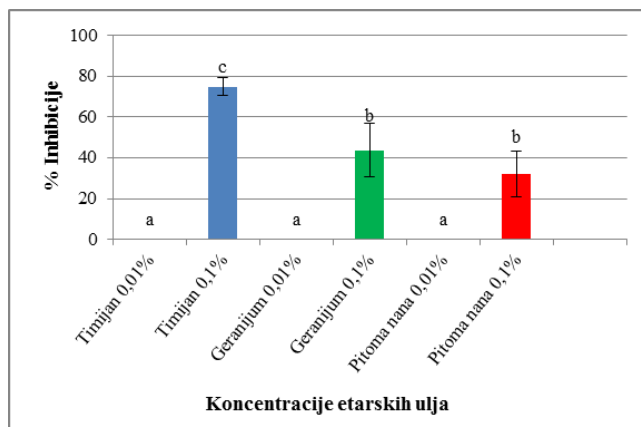
Fumigantna protektivna primena etarskih ulja pitome nane, geranijuma i timijana u koncentraciji 0,1% inhibirala je razvoj oboljenja od 19,51-42,24% na inokulisanim plodovima jabuke (Grafik 34; Tabela 42). Najjače inhibitorno delovanje od 42,24% ispoljilo je etarsko ulje geranijuma u koncentraciji od 0,1% u poređenju sa plodovima jabuke tretiranim parama timijana gde je ispoljeno inhibitorno delovanje od 26,35% i pitome nane od 19,51%, između kojih nije bilo statistički značajne razlike ($p < 0,05$). Ulja primenjena u koncentraciji od 0,01% nisu imala antifungalni efekat.



Grafik 34. Fumigantno protektivno dejstvo različitih koncentracija etarskih ulja na razvoj oboljenja na plodovima jabuke inokulisanim *M. fructigena*. Istim slovima su označeni tretmani između kojih nije uočena statistički značajna razlika Tukey HSD testom ($p < 0,05$). Vertikalni barovi označavaju standardnu grešku sredine.

Fumigantno kurativno delovanje etarskih ulja na *M. fructigena*

Fumigantna kurativna primena etarskih ulja u koncentraciji od 0,1%, inhibirala je razvoj oboljenja od 32,29-75,02% (Grafik 35; Tabela 42). Najjače inhibitorno delovanje od 75,02% je ispoljilo etarsko ulje timijana, dok između ispoljenog antifungalnog dejstva para geranijuma od 43,77% i pitome nane od 32,29% nije bilo statistički značajne razlike ($p < 0,05$). Ulja primenjena u koncentraciji od 0,01% nisu imala antifungalni efekat.

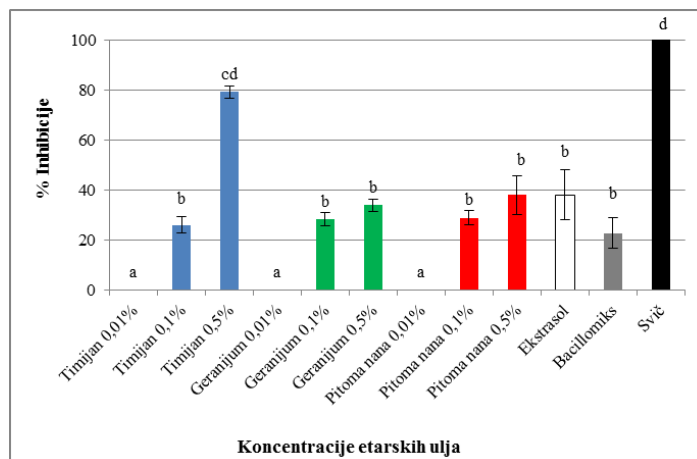


Grafik 35. Fumigantno kurativno dejstvo različitih koncentracija etarskih ulja na razvoj oboljenja na plodovima jabuke inokulisanim *M. fructigena*. Istim slovima označeni su tretmani između kojih nije uočena statistički značajna razlika Tukey HSD testom ($p < 0,05$). Vertikalni barovi označavaju standardnu grešku sredine.

5.7.5. *In vivo* kontaktno protektivno i kurativno delovanje etarskih ulja na *M. fructigena*

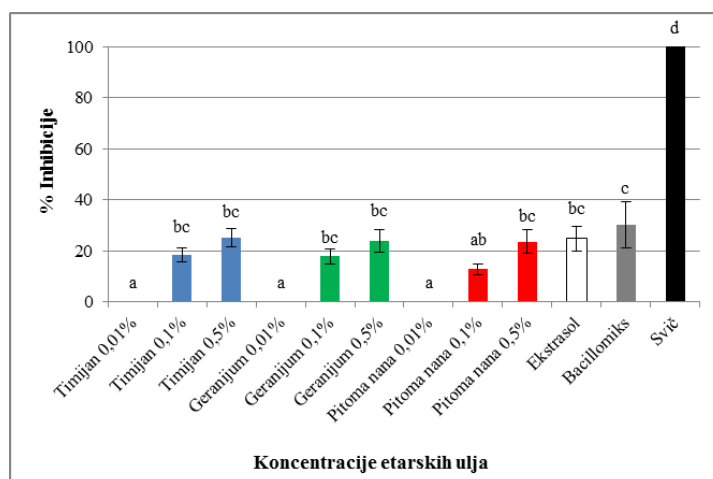
Kontaktno protektivno delovanje etarskih ulja na *M. fructigena*

Kontaktna protektivna primena etarskih ulja, potapanjem plodova u emulziju ulja, inhibirala je razvoj oboljenja od 22,02-79,21% na inokulisanim plodovima jabuke (Grafik 36; Tabela 42). Najjači inhibitorni efekat od 79,21% ispoljilo je etarsko ulje timijana u koncentraciji od 0,5%. Između ostalih tretmana etarskih ulja primenjenih u koncentracijama od 0,5% i 0,1%, kao i delovanja Ekstrasola® i Bacillomiksa® nije postojala statistički značajna razlika ($p < 0,05$). Ulja primenjena u koncentraciji od 0,01% nisu imala antifungalni efekat. Fungicid Svič je potpuno inhibirao razvoj bolesti.



Grafik 36. *In vivo* kontaktno protektivno dejstvo različitih koncentracija etarskih ulja, bioloških preparata Ekstrasola® i Bacillomiksa®, kao i fungicida Svič potapanjem povređenih plodova jabuke. Istim slovima su označeni tretmani između kojih nije uočena statistički značajna razlika ($p < 0,05$). Vertikalni barovi označavaju standardnu grešku sredine.

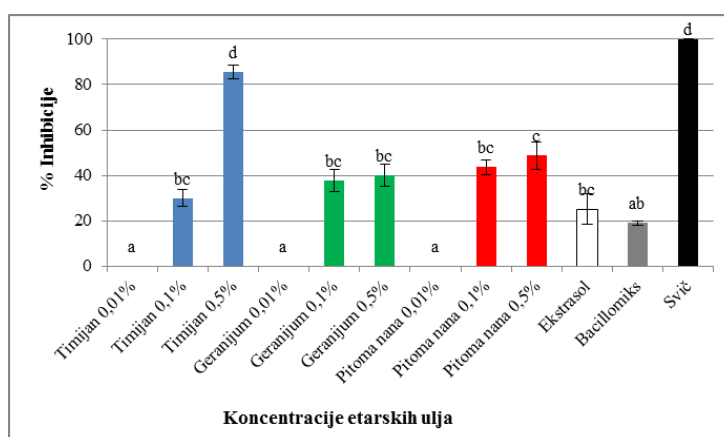
Kontaktna protektivna primena etarskih ulja na povredu inhibirala je razvoj bolesti i od 12,29-25,16% (Grafik 37; Tabela 42). Između svih tretmana etarskih ulja, kao i delovanja Ekstrasola® i Bacillomiksa® nije postojala statistički značajna razlika ($p < 0,05$). Ulja primenjena u koncentraciji od 0,01% ulja nisu imala inhibitorni efekat na razvoj bolesti. Fungicid Svič je potpuno inhibirao razvoj bolesti na inokulisanim plodovima jabuke.



Grafik 37. *In vivo* kontaktno protektivno dejstvo različitih koncentracija etarskih ulja, bioloških preparata Ekstrasola® i Bacillomiksa®, kao i fungicida Svič aplikacijom direktno na povrede plodova. Istim slovima su označeni tretmani između kojih nije uočena statistički značajna razlika Tukey HSD testom ($p < 0,05$). Vertikalni barovi označavaju standardnu grešku sredine.

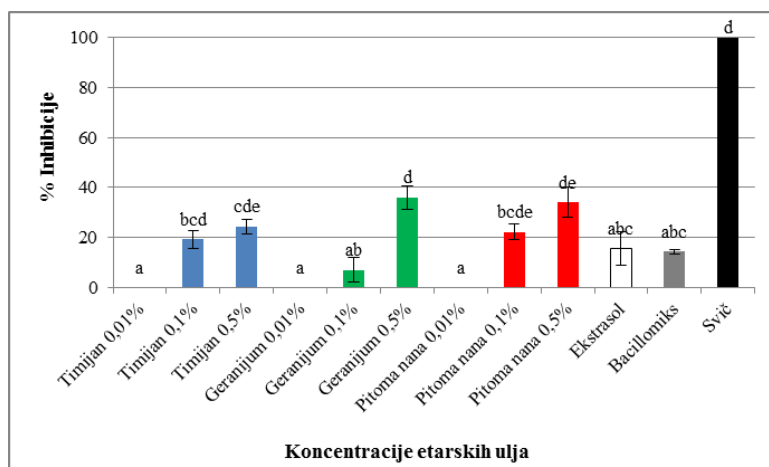
Kontaktno kurativno delovanje etarskih ulja na *M. fructigena*

Kontaktna kurativna primena ispitivanih etarskih ulja, potapanjem celih plodova jabuke u emulzije etarskih ulja, inhibirala je razvoj bolesti od 29,91-85,55% (Grafik 38; Tabela 42). Ovako primenjeno etarsko ulje timijana u koncentraciji 0,5% je ispoljilo najjače antifungalno dejstvo od 85,55%. Između ostalih tretmana etarskih ulja primenjenih u koncentraciji 0,1% i 0,5%, kao i delovanja Ekstrasola® nije postojala statistički značajna razlika ($p < 0,05$). Nešto slabiji inhibitorni efekat od 19,07% ispoljio je tretman Bacillomiksom®, dok u koncentraciji od 0,01% ulja nisu uticala antifungalno. Fungicid Svič je potpuno inhibirao razvoj bolesti.



Grafik 38. *In vivo* kontaktno kurativno dejstvo različitih koncentracija etarskih ulja, bioloških preparata Ekstrasola® i Bacillomiksa®, kao i fungicida Svič potapanjem povređenih inokulisanih plodova. Istim slovima označeni su tretmani između kojih nije uočena statistički značajna razlika Tukey HSD testom ($p < 0,05$). Vertikalni barovi označavaju standardnu grešku sredine.

Kontaktna kurativna primena etarskih ulja na povredu, inhibirala je pojavu oboljenja od 6,85-35,95% u odnosu na kontrolu (Grafik 39; Tabela 42). Najjača inhibicija razvoja oboljenja od 35,95% postignuta je delovanjem etarskog ulja pitome nane u koncentraciji od 0,5%, a zatim i inhibicija od 34,07% delovanjem etarskog ulja geranijuma u koncentraciji od 0,5%. Između ostalih tretmana etarskih ulja primenjenih u koncentraciji 0,5% i 0,1%, kao i tretmana Ekstrasolom® i Bacillomiksom® nije postojala statistički značajna razlika ($p < 0,05$). Etarsko ulje geranijuma primenjeno u koncentraciji 0,1% je ispoljilo najslabiji antifungalni efekat, dok ulja primenjena u koncentraciji od 0,01% nisu imala antifungalni efekat. Fungicid Svič je potpuno inhibirao razvoj bolesti.



Grafik 39. *In vivo* kontaktno kurativno dejstvo različitih koncentracija etarskih ulja, bioloških preparata Ekstrasola® i Bacillomiksa®, kao i fungicida Svič aplikacijom direktno na povrede inokulisanih plodova. Istim slovima su označeni tretmani između kojih nije uočena statistički značajna razlika Tukey HSD testom ($p < 0,05$). Vertikalni barovi označavaju standardnu grešku sredine.

Tabela 42. *In vivo* antifungalno dejstvo etarskih ulja na razvoj smeđe truleži plodova inokulisanih *M. fructigena*.

Tretman (Koncentracija)	Način delovanja (% inhibicije ± SE)					
	Fumigantno		Kontaktno			
	Protektivno	Kurativno	Protektivno na ceo plod	Protektivno na povredu	Kurativno ceo plod	Kurativno na povredu
Timijan (0,01%)	0a	0a	0a	0a	0a	0a
Timijan (0,1%)	26,35±4,4b	75,02±4,24c	26,2±3,21b	18,53±2,75bc	29,91±1,57bc	19,12±3,65bcd
Timijan (0,5%)	nt	nt	79,21±2,39cd	25,16±3,6bc	85,55±2,65d	24,27±2,83cde
Geranijum (0,01%)	0a	0a	0	0a	0a	0a
Geranijum (0,1%)	42,24±7,07c	43,77±13,21b	28,43±2,79b	17,84±2,94bc	37,54±6,38bc	6,85±4,9ab
Geranijum (0,5%)	nt	nt	34,07±2,43b	23,86±4,4bc	40,21±9,52bc	35,95±4,83e
Pitoma nana (0,01%)	0a	0a	0a	0a	0a	0a
Pitoma nana (0,1%)	19,51±2,72b	32,29±11,27b	29,02±2,77b	12,79±2,01ab	43,67±5,23bc	22,19±3,31bcde
Pitoma nana (0,5%)	nt	nt	38,03±7,84b	23,62±4,55bc	48,82±5,56c	34,07±6,05de
Ekstrasol [®] (0,5%)	nt	nt	38,08±9,93b	24,72±5,01bc	25,16±5,8bc	15,36±6,07abc
Bacillomix [®] (0,5%)	nt	nt	22,93±6b	30,21±9,01c	19,07±9,65b	14,17±0,89abc
Svič (0,1%)	100d	100d	100d	100d	100d	100f

Legenda: Istim slovima označene su grupe u kolonama između kojih nije uočena statistički značajna razlika Tukey HSD testom ($p < 0,05$); nt-nije testirano; SE-standardna greška sredine.

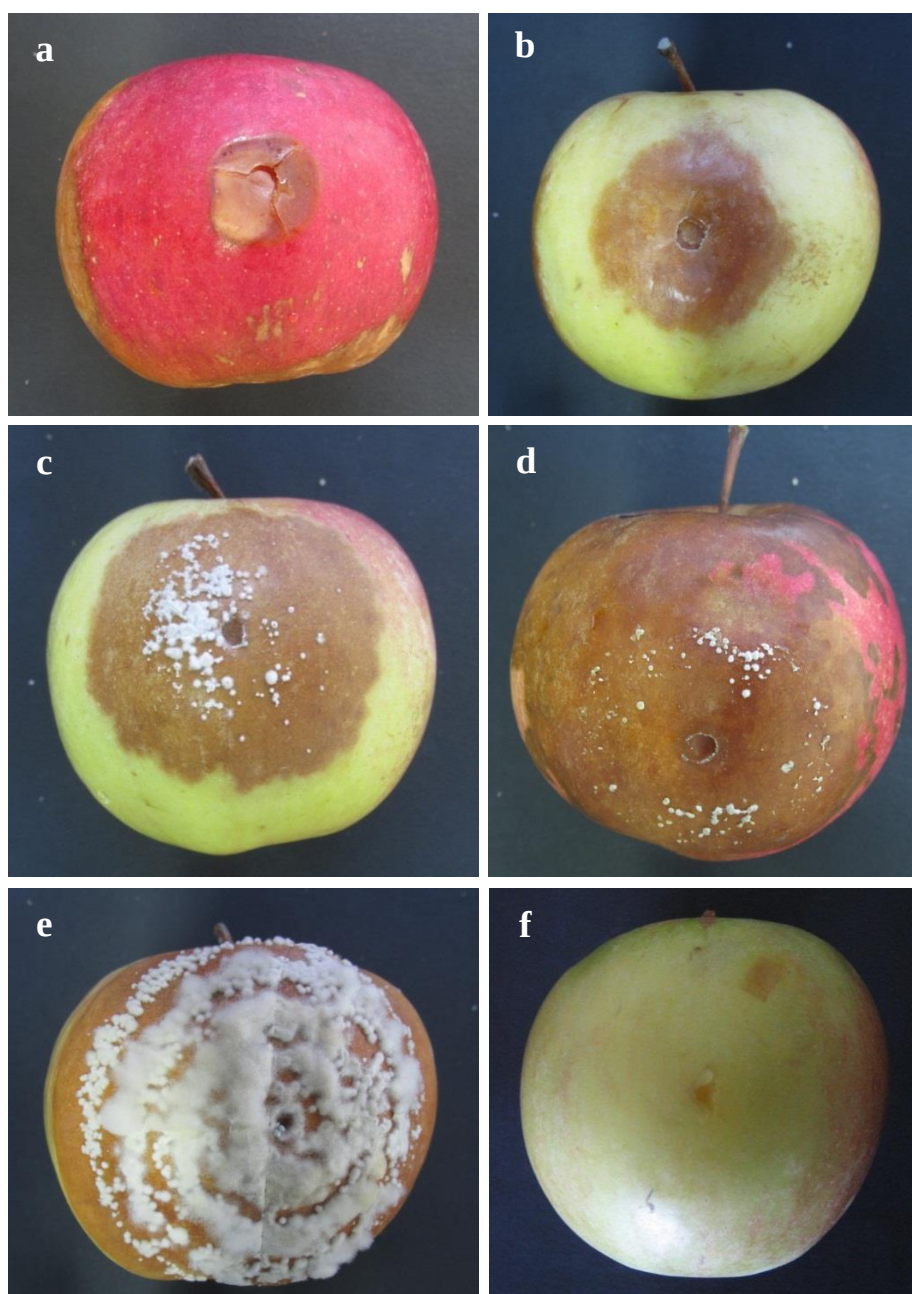
5.7.6. Efikasnost načina primene etarskih ulja u *in vivo* uslovima

Efikasnost različitih načina primene etarskih ulja u *in vivo* uslovima prikazana je u Tabeli 43 i na Slici 66. Etarsko ulje pitome nane primenjeno u različitim tretmanima inhibiralo je pojavu oboljenja od 12,79-48,82%. Najefikasnije delovanje etarskog ulja pitome nane ostvareno je kurativno i to kontaktnom primenom u koncentraciji od 0,5% (48,82%). Značajna inhibicija razvoja oboljenja ispoljena je i kurativnom kontaktnom fazom u koncentraciji od 0,1% (43,67%) i fumigantnom primenom ulja pitome nane (32,29%).

Etarsko ulje geranijuma u različitim tretmanima *in vivo* inhibiralo je pojavu oboljenja od 6,84-43,77%. Najefikasnije delovanje etarskog ulja geranijuma ostvareno je fumigantnom primenom u koncentraciji 0,1% i to kurativno (43,77%) i protektivno (42,24%), kao i kontaktnom primenom u koncentraciji 0,5% sa kurativnim dejstvom (40,21%).

Etarsko ulje timijana najefikasnije je inhibiralo razvoj smeđe truleži od 19,12-85,54%. Najefikasnije delovanje etarskog ulja timijana ostvareno je kontaktnom primenom u koncentraciji 0,5% sa kurativnim (85,54%) i protektivnim dejstvom (79,21%), kao i fumigantnom primenom u koncentraciji 0,1% sa kurativnim dejstvom (75,2%).

Nijedno ispitivano etarsko ulje nije bilo efikasno primenjeno u koncentraciji 0,01%. Sa povećanjem koncentracije u kontaktnoj primeni etarskog ulja povećavala se i njihova efikasnost. Potapanje plodova u emulzije ulja je bilo efikasnije nego nanošenje emulzije ulja na povrede.



Slika 66. *In vivo* efekat etarskih ulja na razvoj smeđe truleži plodova jabuka inokulisanim *M. fructigena*. a-kontaktno kurativno dejstvo 0,5% timijana; b-fumigantno kurativno dejstvo timijana koncentracije 0,1%; c-kontaktno kurativno dejstvo etarskog ulja pitome nane koncentracije 0,1%; d-kontaktno kurativno dejstvo etarskog ulja pitome nane koncentracije 0,5%; e-kontrola; f-dejstvo Sviča.

Tabela 43. Efikasnost različitih načina primene etarskih ulja pitome nane, geranijuma i timijana na razvoj smeđe truleži plodova jabuke inokulisanih izolatima MFSRB-1 *M. fructigena*.

Tretmani		Koncentracija (Način primene ulja)	% Inhibicije		
			Pitoma nana	Geranijum	Timijan
Fumigantno	Protektivno	0,01%	0a	0a	0a
		0,1%	19,51abc	42,24d	26,34bc
	Kurativno	0,01%	0a	0a	0a
		0,1%	32,29bcde	43,77d	75,2d
Kontaktno	Protektivno	0,01% (potapanje)	0a	0a	0a
		0,01% (povreda)	0a	0a	0a
		0,1% (potapanje)	29,02bcde	28,43cd	26,2bc
		0,1% (povreda)	12,79ab	17,84abc	18,53b
		0,5% (potapanje)	38,03cde	34,07cd	79,21d
		0,5% (povreda)	23,61bcd	23,86bcd	25,16bc
	Kurativno	0,01% (potapanje)	0a	0a	0a
		0,01% (povreda)	0a	0a	0a
		0,1% (potapanje)	43,67de	37,54cd	29,91c
		0,1% (povreda)	22,19bc	6,84ab	19,12bc
		0,5% (potapanje)	48,82e	40,21d	85,54d
		0,5% (povreda)	34,07cde	35,95cd	24,27bc

Legenda: Istim slovima označene su grupe u kolonama između kojih nije uočena statistički značajna razlika Tukey HSD testom ($p < 0,05$).

5.7.7. Organoleptičke osobine tretiranih plodova jabuka

Etarska ulja pitome nane, geranijuma i timijana primenjena fumigantno i kontaktno *in vivo* uticala su na promenu organoleptičkih svojstava plodova jabuka nakon tretmana (Tabela 44). Jedini tretman koji nije promenio organoleptičke osobine plodova bilo je ulje geranijuma primenjenim fumigantno u koncentraciji od 0,1%.

Kod ostalih tretmana, najveće promene plodova jabuke bile su u aromi. Izgled plodova nije bio promenjen osim kod fumigantne primene pitome nane i kontaktne i fumigantne primene geranijuma u koncentraciji od 0,1%. Najveće promene plodova u vidu pojave fitotoksičnog efekta i promene u aromi, slatkoći i prihvatljivosti ispoljila je kontaktna primena etarskog ulja timijana u koncentraciji od 0,5%.

Na svim tretiranim plodovima jabuke uočeno je povećanje čvrstoće, kao i blago povećanje kiselosti i slatkoće. Jedino kod kontaktne primene etarskog ulja timijana u koncentraciji od 0,5% nije došlo do povećanja kiselosti i slatkoće.

Povećanje koncentracije etarskih ulja u kontaktnoj primeni uticalo je na pogoršanje izgleda, arome i prihvatljivosti plodova jabuke. Sa druge strane, povećanje koncentracije etarskog ulja pitome nane izazvalo je povećanje kiselosti i slatkoće, a geranijuma povećanje kiselosti plodova jabuke.

Tabela 44. Organoleptičke karakteristike plodova jabuke nakon tretmana etarskim uljem pitome nane, geranijuma i timijana

Etarsko ulje		Koncentracija primene etarskog ulja	Izgled	Aroma	Čvrstoća	Kiselost	Slatkoća	Prihvatljivost
Pitoma nana	Tretmatni							
	Fumigantno	0,1%	4,5	2,71	4,14	3,71	3,29	3,61
	Kontaktno (potapanjem)	0,1%	3	2,95	4,57	3,71	3,57	2,98
0,5%		2	2,14	4,57	4	3,71	2,07	
Geranijum	Fumigantno	0,1%	4,5	4	4,96	4,43	3,86	4,25
	Kontaktno (potapanjem)	0,1%	4,5	2,29	4,29	3,71	3,57	3,4
		0,5%	2	2,57	4,43	4,14	3,43	2,14
Timijan	Fumigantno	0,1%	2	1,29	4,71	3,57	3,29	1,65
	Kontaktno (potapanjem)	0,1%	4	1,71	4,85	4,14	3,42	2,85
		0,5%	1	1	4,42	3,29	1,14	1
Kontrola			4,5	4,14	3,96	3,42	3,42	4,3

Legenda: Ocene organoleptičkih karakteristika plodova nakon tretmana etarskim uljima: izgled plodova (5-odličan svež; 4-dobar; 3-prihvatljiv; 2-loš; 1-vrlo loš); aroma (5-prirodna; 4-gubitak arome; 3-nema arome; 2-blago sumnjiva; 1-jako nepoznata aroma); čvrstoća (5-odlična; 4-čvrsta / sočna, 3-prihvatljiva; 2-tvrda; 1-vrlo tvrda); kiselost (5- vrlo dobra; 4-dobra; 3-prihvatljiva; 2-kisela; 1-prekisela); slatkoća (5-veoma slatka; 4-slatka; 3-prihvatljiva; 2-slabo slatka; 1-bljutava); prihvatljivost (5-vrlo dobra; 4-dobra; 3-prihvatljiva; 2-slabo prihvatljiva; 1-neprihvatljiva).

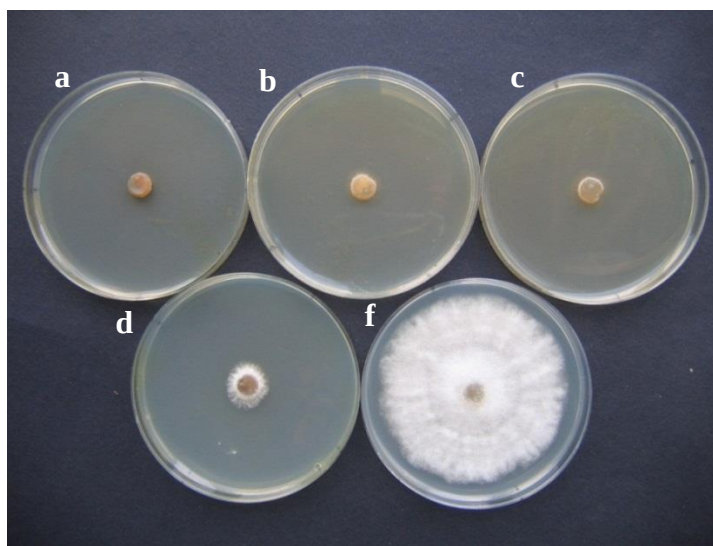
5.7.8. Hemijski sastav etarskih ulja

Hemijski sastav etarskih ulja pitome nane, geranijuma i timijana prikazan je u Prilog 2. Analizom je utvrđen visok sadržaj oksigenovanih monoterpena kod etarskog ulja pitome nane (90,3%) i geranijuma (80,5%), dok ulje timijana pored visokog učešća oksigenovanih monoterpena (50,2%) veliki udeo imaju monoterpenski ugljovodonic (43,3%). Osim oksigenovanih monoterpena u etarskom ulju geranijuma utvrđeni su i oksigenovani seskviterpeni (8,2%) i seskviterpenski ugljovodonic (6,1%), dok kod ulja pitome nane to bili monoterpenski ugljovodonic (5%). Najzastupljeniji pojedinačni sastojci u etarskom ulju pitome nane bili su oksigenovani monoteterpeni mentol (48,2%), menton (25,6%), mentofuran (5,7%) i izo-mentil-acetat (5,4%) zajedno čineći 87,26% ukupnog sastava ulja, a od monoterpenskih ugljovodonika najzastupljeniji je bio limonen (4,1%). U etarskom ulju geranijuma najzastupljeniji sastojci bili su oksigenovani monoterpeni citronelol (34,4%), geraniol (16,8%), citronelil-formijat (6,7%), linalol (5,9%), izo-menton (5,2%), geranil-formijat (3%) i menton (2,4%), zajedno čineći 77,99% ukupnog sastava ulja, kao seskviterpenski ugljovodonik 10-epi-g-eudezmol (4,4%). Dominantni sastojci u etarskom ulju timijana bili su oksigenovani monoterpen timol (32,3%) i monoterpenski ugljovodonik *p*-cimen (31,7%), a od ostalih oksigenovanih monoterpena bili su prisutni u nešto većem procentu i linalol (5,9%), karvakrol (4%), borneol (3,7%) i kamfor (2,8%) ukupno čineći 83,57% sastava ulja, kao i γ -terpinen (3,4%) i kamfen (2,3%) od monoterpenskih ugljovodonika.

5.8. Antifungalno delovanje isparljivih sastojaka tkiva biljaka familije *Brassicaceae* na *Monilinia* spp.

5.8.1. Delovanje isparljivih sastojaka tkiva biljaka familije *Brassicaceae* na porast micelije

Porast kolonija ispitivanih vrsta *M. fructigena*, *M. laxa*, *M. fructicola* i *M. polystroma*, prouzrokovaca smeđe truleži plodova jabučastog i koštičavog voća, kao i drugih testiranih patogena *C. acutatum*, *C. gloeosporoides*, *B. cinerea*, *Alternaria* sp. i *P. expansum*, prouzrokovaca truleži plodova voća i povrća, bio je smanjen ili potpuno inhibiran delovanjem isparljivih produkata nastalih hidrolizom tkiva ispitivanih biljaka familije *Brassicaceae* (Slika 67; Tabela 45; Grafik 40).



Slika 67. Uticaj isparljivih sastojaka oslobođenih hidrolizom tkiva različitih vrsta familije *Brassicaceae* na porast kolonije *M. fructigena* *in vitro* (a-karfiol, b-brokoli, c-keleraba, d-kupus, f-kontrola).

Najjače inhibitorno dejstvo na porast micelije *Monilinia* spp. ispoljili su isparljivi sastojci kupusa i karfiola. Potpunu inhibiciju porasta sa fungistatičnim dejstvom ispoljili su produkti kupusa prema *M. laxa*, *M. fructicola* i *M. polystroma*, kao i sastojci karfiola prema *M. laxa* i *M. fructicola*. Jako inhibitorno dejstvo na porast kolonije *M. polystroma* ispoljili su isparljivi produkti karfiola (96,1%) i brokolija (74,08%). Porast kolonija *M. fructigena*

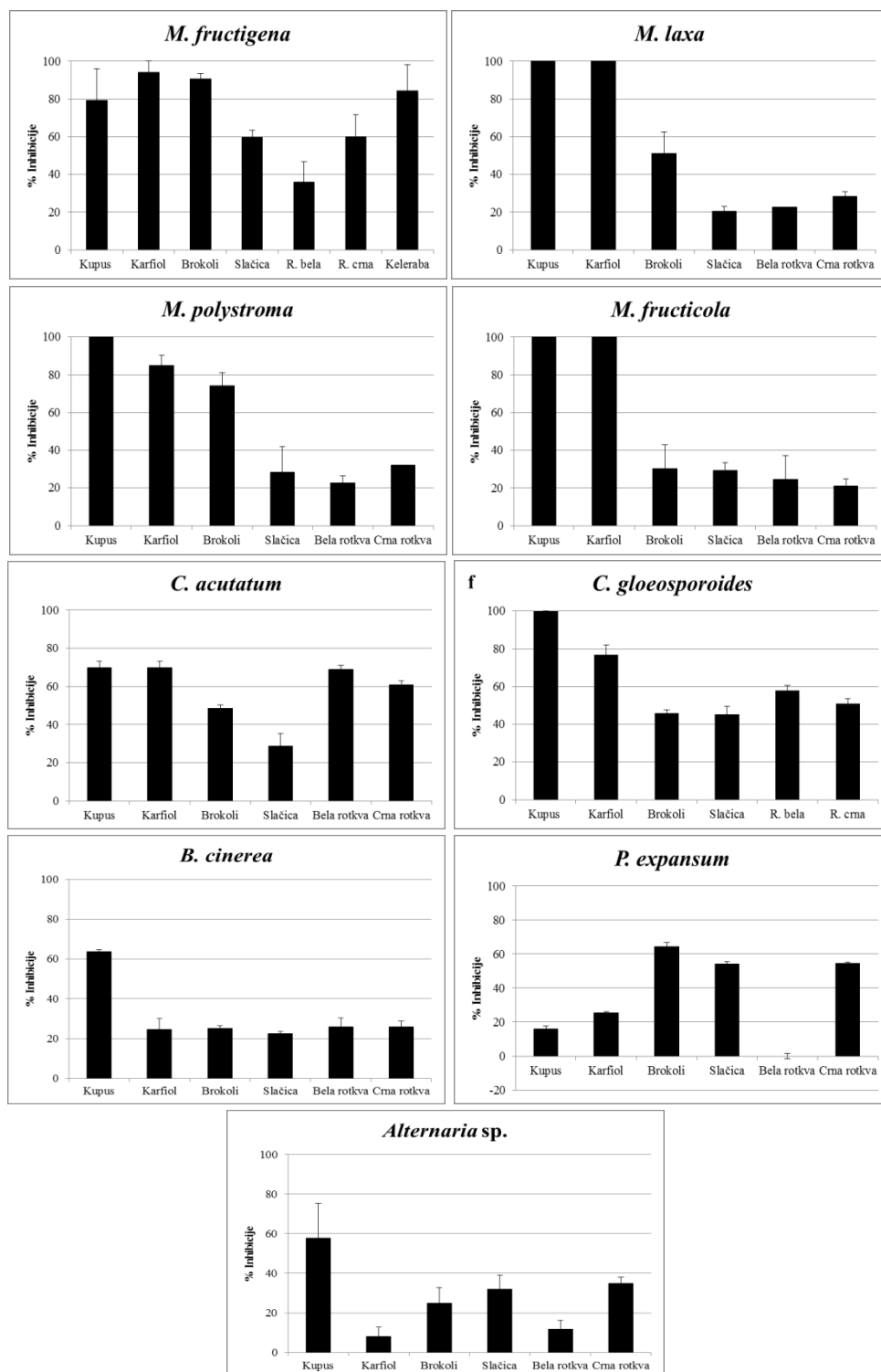
bio je inhibiran pod uticajem isparljivih sastojaka karfiola (94,1%), brokolija (90,45%) i kupusa (79,2%). Isparljivi sastojci kelerabe testirani su samo na porast kolonije *M. fructigena* i ispoljili su inhibitorno dejstvo od 84,14%.

Prema drugim testiranim gljivama potpuna inhibicija porasta kolonija sa fungistatičnim dejstvom uočena je pod uticajem isparljivih sastojaka kupusa na *C. gloeosporoides*. Od svih ispitivanih *Brassicaceae* kupus je ispoljio najjače antifungalno dejstvo na porast kolonija *Alternaria* sp (75,18%) i *B. cinerea* (63,81%), a brokoli na *P. expansum* (64,39%). Isparljivi sastojci kupusa, karfiola, bele i crne rotkve inhibirali su porast kolonija *C. acutatum* od 60,84-69,78%.

Tabela 45. Uticaj isparljivih sastojaka hidrolize biljnog tkiva različitih vrsta i kultivara porodice *Brassicaceae* na porast kolonije gljiva.

Patogen	Isparljivi sastojci vrsta <i>Brassicaceae</i> (% inhibicije $\pm$ SE)						
	Kupus	Karfiol	Brokoli	Slačica	Bela rotkva	Crna rotkva	Keleraba
<i>M. fructigena</i>	79,21 $\pm$ 16,86ab	94,1 $\pm$ 5,9a	90,45 $\pm$ 2,85a	59,74 $\pm$ 3,63ab	36,05 $\pm$ 10,53b	59,83 $\pm$ 11,94ab	84,14 $\pm$ 13,91ab
<i>M. laxa</i>	100 $\pm$ 0a	100 $\pm$ 0a	51,16 $\pm$ 11,19b	20,41 $\pm$ 2,47c	22,48 $\pm$ 0 c	28,24 $\pm$ 2,63c	nt
<i>M. fructicola</i>	100 $\pm$ 0a	100 $\pm$ 0a	30,15 $\pm$ 12,71b	29,34 $\pm$ 4,16b	24,46 $\pm$ 12,61b	21,18 $\pm$ 3,80b	nt
<i>M. polystroma</i>	100 $\pm$ 0a	96,1 $\pm$ 5,64a	74,08 $\pm$ 6,96a	28,40 $\pm$ 13,45bc	22,67 $\pm$ 3,86bc	32,3 $\pm$ 0,15b	nt
<i>C. acutatum</i>	69,78 $\pm$ 3,40a	69,68 $\pm$ 3,40a	48,63 $\pm$ 1,75b	28,71 $\pm$ 6,64c	68,84 $\pm$ 2,12a	60,84 $\pm$ 1,99a	nt
<i>C. gloeosporioides</i>	100 $\pm$ 0a	76,83 $\pm$ 5,34b	45,86 $\pm$ 1,66c	45,15 $\pm$ 4,42c	57,92 $\pm$ 2,63c	50,83 $\pm$ 2,88c	nt
<i>B. cinerea</i>	63,81 $\pm$ 0,95a	24,66 $\pm$ 5,35b	25,24 $\pm$ 1,67b	22,38 $\pm$ 1,67b	26,03 $\pm$ 4,27b	26,03 $\pm$ 2,82b	nt
<i>P. expansum</i>	16,11 $\pm$ 1,58d	25,97 $\pm$ 0,48c	64,39 $\pm$ 2,38a	54,10 $\pm$ 1,58b	3,33 $\pm$ 1,67e	56,47 $\pm$ 0,79b	nt
<i>Alternaria sp.</i>	75,18 $\pm$ 17,60a	8,07 $\pm$ 4,69cd	24,99 $\pm$ 7,64bc	31,98 $\pm$ 7,16b	11,76 $\pm$ 4,57cd	34,92 $\pm$ 3,19b	nt

Legenda: Istim slovima su označene grupe u redovima između kojih nije uočena razlika na osnovu Student's t-testa ($p < 0,05$); nt-nije testiran; SE-standardna greška sredine.



Grafik 40. Uticaj isparljivih satojaka nastalih hidrolizom biljnog tkiva različitih vrsta i kultivara porodice *Brassicaceae* na porast kolonije ispitivanih patogenih. Vertikalni barovi označavaju standardnu grešku sredine.

5.8.2. Delovanje isparljivih sastojaka tkiva biljaka familije *Brassicaceae* na klijanje konidija i dužinu inicijalnih hifa

Pod uticajem isparljivih sastojaka biljaka familije *Brassicaceae* klijanje konidija *Monilinia* spp. bilo je smanjeno ili potpuno inhibirano, dok je kod proklijalih konidija dužina inicijalnih hifa bila jako redukovana (Tabela 46; Grafik 41).

Najjače inhibitorno dejstvo na klijanje konidija *Monilinia* spp. ispoljili su isparljivi sastojci karfiola i slačice. Potpunu inhibiciju klijanja konidija sa fungistatičnim dejstvom ostvarili su isparljivi sastojci karfiola prema svim *Monilinia* spp., kao i sastojci slačice prema *M. laxa* i *M. fructigena*. Jako inhibitorno dejstvo ispoljili su i isparljivi sastojci slačice na klijanje konidija *M. fructigena* (90,71%) i *M. polystroma* (94,14%). Kod proklijalih konidija, isparljivi produkti slačice inhibirali su dužinu inicijalnih hifa *M. fructigena* od 93,38% i *M. polystroma* od 96,57%. Jako inhibitorno dejstvo na dužinu inicijalnih hifa svih *Monilinia* spp. ispoljili su isparljivi sastojci kupusa (67,5-89,03%). Dužina inicijalnih hifa *M. fructicola* bila je jako inhibirana pod uticajem isparljivih sastojaka bele (86,22%) i crne rotkve (85,9%).

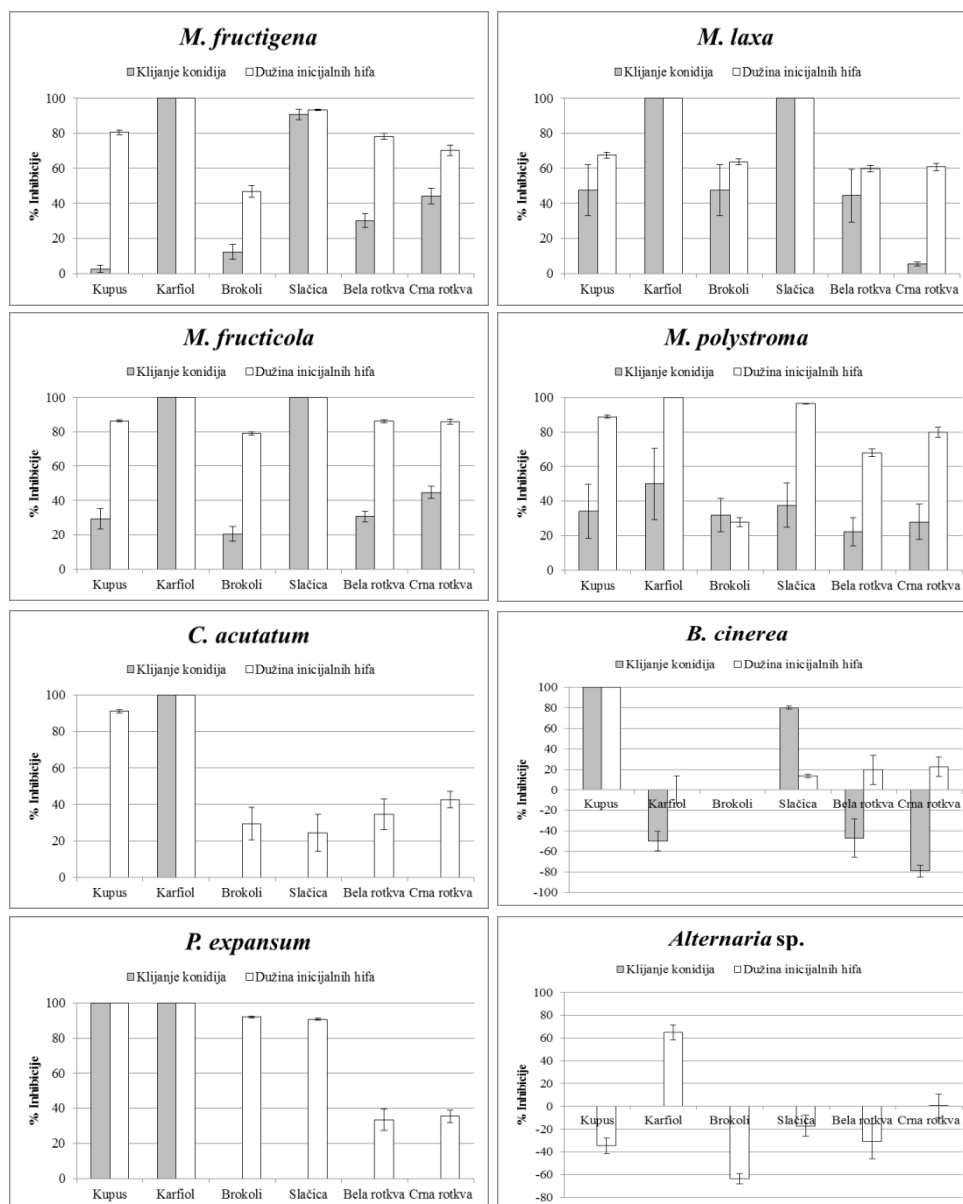
Kod ostalih ispitivanih vrsta gljiva, isparljivi sastojci testiranih *Brassicaceae* su na klijanje konidija i dužinu inicijalnih hifa ispoljile različito dejstvo: inhibitorno, stimulatивно ili su bile bez dejstva (Tabela 46; Grafik 41). Klijanje konidija *C. acutatum* bilo je inhibirano samo pod uticajem isparljivih komponenti karfiola, a *P. expansum* pod uticajem karfiola i kupusa i to potpuno sa fungistatičnim dejstvom. Kod proklijalih konidija najjače inhibitorno dejstvo na dužinu inicijalnih hifa *C. acutatum* ispoljili su sastojci kupusa (91,12%), a na *P. expansum* sastojci brokolija (92,04%) i slačice (90,81%). Klijanje konidija *B. cinerea* bilo je potpuno inhibirano pod uticajem isparljivih sastojaka kupusa, jako inhibitorno dejstvo ispoljili su sastojci slačice (80,2%), dok su stimulatивно dejstvo ispoljili produkti karfiola, bele i crne rotkve. Dužina inicijalnih hifa *B. cinerea* bila je inhibirana pod uticajem isparljivih sastojaka slačice (70,13%), ali i sastojaka bele i crne rotkve, dok sastojci karfiola nisu imali inhibitorno dejstvo. Klijanje konidija *Alternaria* sp. nije bilo inhibirano pod uticajem svih testiranih isparljivih sastojaka *Brassicaceae*. Dužina inicijalnih hifa *Alternaria* sp. bila je inhibirana samo pod uticajem isparljivih sastojaka

karfiola (64,96%), dok su isparljivi sastojci ostalih *Brassicaceae* delovali stimulativno i doveli do izduživanja inicijalnih hifa.

Tabela 46. Uticaj isparljivih sastojaka nastalih hidrolizom biljnog tkiva različitih vrsta i kultivara familije *Brassicaceae* na klijanje konidija i porast inicijalnih hifa gljiva.

Patogen		Isparljivi sastojci vrsta <i>Brassicaceae</i> (% inhibicije $\pm$ SE)					
		Kupus	Karfiol	Brokoli	Slačica	Bela rotkva	Crna rotkva
<i>M. fructigena</i>	Klijanje konidija	2,53 $\pm$ 1,99d	100 $\pm$ 0a	12,24 $\pm$ 4,17d	90,71 $\pm$ 2,98a	30,09 $\pm$ 3,98c	44,12 $\pm$ 4,50b
	Porast inicijalnih hifa	80,56 $\pm$ 1,39c	100 $\pm$ 0a	46,81 $\pm$ 3,45e	93,38 $\pm$ 0,43b	78,21 $\pm$ 1,64c	70,22 $\pm$ 3,07d
<i>M. laxa</i>	Klijanje konidija	47,59 $\pm$ 14,45b	100 $\pm$ 0a	47,41 $\pm$ 14,45b	100 $\pm$ 0a	44,38 $\pm$ 15,21b	5,39 $\pm$ 1,06b
	Porast inicijalnih hifa	67,5 $\pm$ 1,70b	100 $\pm$ 0a	63,68 $\pm$ 1,70bc	100 $\pm$ 0a	59,73 $\pm$ 1,85d	60,85 $\pm$ 2,12cd
<i>M. fructicola</i>	Klijanje konidija	29,29 $\pm$ 6,07c	100 $\pm$ 0a	20,48 $\pm$ 4,38c	100 $\pm$ 0a	30,58 $\pm$ 3,04c	44,66 $\pm$ 3,48b
	Porast inicijalnih hifa	86,29 $\pm$ 0,56b	100 $\pm$ 0a	79,04 $\pm$ 0,95c	100 $\pm$ 0a	86,22 $\pm$ 0,89b	85,9 $\pm$ 1,33b
<i>M. polystroma</i>	Klijanje konidija	34,09 $\pm$ 15,57b	100 $\pm$ 0a	4,01 $\pm$ 9,62c	94,14 $\pm$ 12,83a	39,49 $\pm$ 8,21b	42,84 $\pm$ 10,23b
	Porast inicijalnih hifa	89,03 $\pm$ 0,79b	100 $\pm$ 0a	27,8 $\pm$ 2,67e	96,57 $\pm$ 0,19ab	68,02 $\pm$ 2,28d	79,86 $\pm$ 2,93c
<i>C. acutatum</i>	Klijanje konidija	0b	100 $\pm$ 0a	0b	0b	0b	0b
	Porast inicijalnih hifa	91,12 $\pm$ 0,84a	100 $\pm$ 0a	29,39 $\pm$ 8,93b	24,49 $\pm$ 10,11b	34,42 $\pm$ 8,89b	42,64 $\pm$ 4,58b
<i>C. gloeosporioides</i>	Klijanje konidija	nt	nt	nt	nt	nt	nt
	Porast inicijalnih hifa	nt	nt	nt	nt	nt	nt
<i>B. cinerea</i>	Klijanje konidija	100 $\pm$ 0a	-47,97 $\pm$ 9,24c	nt	80,2 $\pm$ 1,29b	-47,13 $\pm$ 18,64c	-79,13 $\pm$ 5,88c
	Porast inicijalnih hifa	100 $\pm$ 0a	0d	nt	70,13 $\pm$ 1,68b	19,48 $\pm$ 1,67c	22,73 $\pm$ 9,51c
<i>P. expansum</i>	Klijanje konidija	100 $\pm$ 0a	100 $\pm$ 0a	0b	0b	0b	0b
	Porast inicijalnih hifa	100 $\pm$ 0a	100 $\pm$ 0a	92,04 $\pm$ 0,57a	90,81 $\pm$ 0,62a	33,41 $\pm$ 6,15b	35,43 $\pm$ 3,5b
<i>Alternaria sp.</i>	Klijanje konidija	0	0	0	0	0	0
	Porast inicijalnih hifa	-34,53 $\pm$ 6,73bc	64,96 $\pm$ 6,46a	-59,91 $\pm$ 4,74c	-17,18 $\pm$ 9,43b	-30,65 $\pm$ 15,43bc	0,35 $\pm$ 10,29b

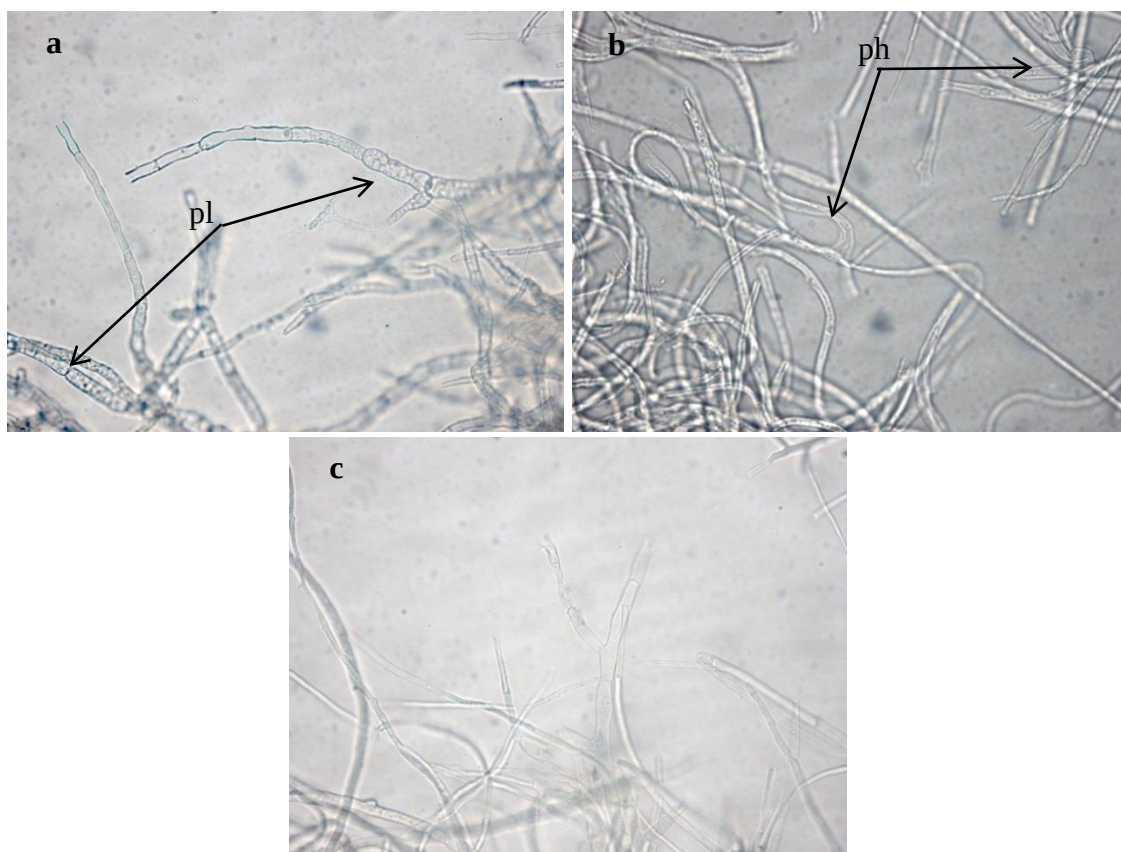
Legenda: Istim slovima su označene grupe u redovima između kojih nije uočena razlika na osnovu Student t-testa ($P < 0,05$); nt-nije testirano; SE-standardna greška sredine.



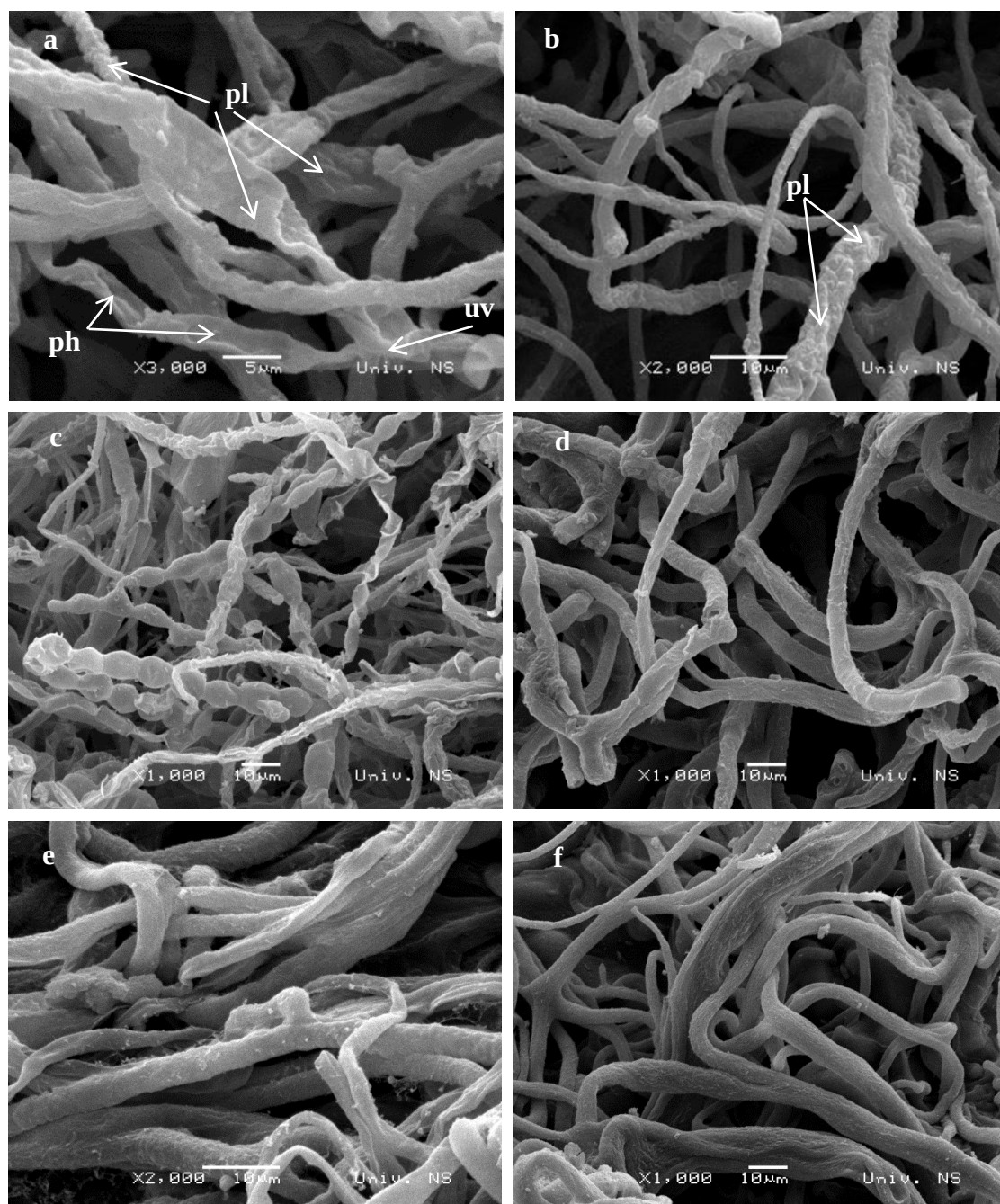
Grafik 41. Uticaj isparljivih sastojaka oslobođenih hidrolizom biljnog tkiva različitih vrsta i kultivara porodice *Brassicaceae* na klijanje konidija i porast inicijalnih hifa gljiva. Vertikalni barovi označavaju standardnu grešku sredine.

5.8.3. Delovanje isparljivih sastojaka tkiva biljaka familije *Brassicaceae* na morfologiju hifa i inicijalnih hifa

Isparljivi sastojci kupusa i karfiola su prouzrokovali promene u morfologiji hifa *M. fructigena* i *M. fruticola*, uključujući obrazovanje plikova na površini hifa, pucanje i uvijanje hifa (Slike 68 a, b i 69 a, b, c, e). Pored značajnog uticaja na morfologiju hifa, isparljivi sastojci tkiva karfiola su inicirali obrazovanje lanaca konidija, ali su konidije u lancima većinom izgubile turgor (Slika 69 c). Hife izolata koje nisu izlagane isparljivim sastojcima tkiva *Brassicaceae* bile su glatke, do blago naborane i punog turgora (Slike 68 c i 69 d, f).



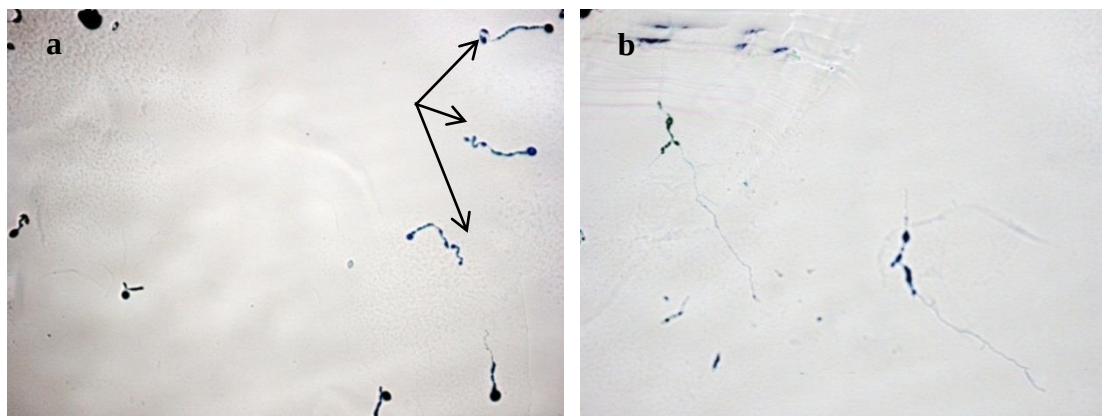
Slika 68. Morfološke promene hifa *M. fructigena* pod uticajem isparljivih produkata kupusa (pl–plikovi; ph–pucanje hifa; c–kontrola).



Slika 69. Skening elektronske mikrofografije micelije izolata *M. fructigena* (a, b, c) i *M. fructicola* (e) izloženih isparljivim sastojcima tkiva kupusa (a, b, e) i karfiola (c) (uv-uvijanje hifa; pl–plikovi; ph–pucanje hifa; d–kontrola *M. fructigena*; f–kontrola *M. fructicola*).

Isparljivi sastojci kupusa uticali su na promene morfologije inicijalnih hifa *M. fructigena*. Nakon klijanja, inicijalne hife su bile znatno kraće od hifa koje nisu izlagane isparljivim sastojcima tkiva ove biljne vrste i bilo je uočeno blago uvijanje njihovih

vrhova (Slika 70 a). U kontrolnom tretmanu konidije su posle 24 h obrazovale dugačke inicijalne hife sa sporadičnim obrazovanjem bočnih grana.



Slika 70. Klijanje konidija *M. fructigena* pod uticajem isparljivih sastojaka kupusa (a) (strelice pokazuju uvijanje vrhova inicijalnih hifa; b-kontrola).

5.8.4. Hemijski sastav biljnog tkiva vrsta familije *Brassicaceae*

Posle pripreme uzoraka biljnog materijala dobijeni su sledeći prinosi ekstrakata iz svežeg tkiva: kupus 0,50%, brokoli 0,21%, bela rotkva 0,62%, crna rotkva 0,44%, slačica 0,37% i karfiol 0,40%. Prinosi dobijeni iz liofilizovanih uzoraka iznosili su: kupus 3,11%, brokoli 1,10%, bela rotkva 3,62%, crna rotkva 3,43%, slačica 2,81% i karfiol 2,21%.

GC-MS analiza autolizata biljnog tkiva različitih vrsta familije *Brassicaceae* pokazala je nizak sadržaj izotiocijanata, dok su najveći broj identifikovanih sastojaka predstavljali derivati masnih kiselina (Prilog 3). Jedino je u biljnom materijalu bele rotkve utvrđen visok sadržaj (*E*)-4-metiltio-3-butenil-izotiocijanata. U uzorcima čuvanim pri -80°C, kao i liofilizovanim uzorcima biljnog tkiva utvrđen je nizak sadržaj derivata glukozinolata. U autolizatima svih ispitivanih vrsta utvrđen je visok sadržaj neofitadiena.

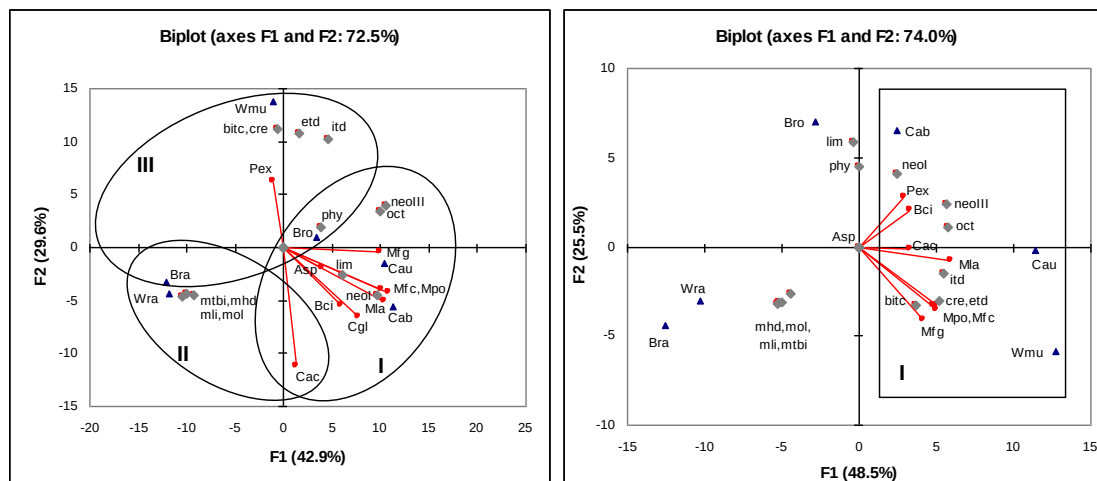
Uporedna analiza isparljivih sastojaka biljnog tkiva i njihovog antifungalnog dejstva

Isparljivi sastojci identifikovani u ekstraktima biljnog materijala *Brassicaceae* su analizirani u cilju utvrđivanja moguće korelacije između njihovog hemijskog sastava i antifungalnog dejstva. Za ovu svrhu korišćena je multivarijaciona analiza, i to metoda

glavne komponente (PCA), gde su kao varijable korišćeni relativni sadržaji isparljivih sastojaka kupusa, karfiola, brokolija, slačice, bele i crne rotkve i njihov uticaj na porast micelije i klijanje konidija devet fitopatogenih gljiva (*M. laxa*, *M. fructigena*, *M. fructicola*, *M. polystroma*, *P. expansum*, *B. cinerea*, *C. acutatum*, *C. gloesporoides* i *Alternaria* sp.). U multivarijacionu analizu su uključeni sastojci sa sadržajem većim od 5%, dok su biplotovi dobijeni na osnovu korelacione matrice sadržaja isparljivih jedinjenja, inhibicije porasta micelije, inhibicije klijanja konidija i inhibicije porasta inicijalnih hifa.

Na osnovu relativnog sadržaja jedinjenja i vrednosti inhibicije porasta micelije izdvojile su se tri grupe, prikazane u levom biplotu (Grafik 42). Analiza glavnih komponentata je pokazala da kumulativna varijabilnost sadržana u prve dve komponente (F1 i F2) iznosi 72,5%, sa učešćem prve glavne komponente od 42,9% i druge od 29,6%. Prva grupa se odlikovala visokim sadržajem izomera neofitadiena, oktanske kiseline, (*E*)-fitola i limonena, koji su bili prisutni u visokom sadržaju u uzorcima kupusa, karfiola i brokolija. Isparljivi sastojci ovih biljaka ispoljili su značajno antifungalno dejstvo na porast micelije većine ispitivanih fitopatogenih gljiva. Druga grupa se odlikovala visokom koncentracijom (*E*)-4-metiltio-3-butenil-izotiocijanata, koji su prisutni u uzorcima bele i crne rotkve. Najosetljivija vrsta na dejstvo ovih sastojaka bila je *C. acutatum*. Treća grupa je bila bogata benzil-tiocijanatom, estrima tetradekanske kiseline i *p*-krezolom, koji su prisutni u uzorku slačice.

Grupisanje na osnovu relativnog sadržaja isparljivih sastojaka i uticaja na klijanje konidija patogena prikazano je u desnom biplotu (Grafik 42). Kumulativna varijabilnost sadržana u prve dve komponente iznosila je 74%, sa učešćem prve glavne komponente od 48,5% i druge od 25,5%. Ovom analizom izdvojila se grupa od kupusa, karfiola i slačice, koja se odlikovala jakim inhibitornim dejstvom na klijanje konidija patogena. Odnosom vektora utvrđeno je da su na desnoj strani dijagrama biplota svi patogeni, osim *Alternaria* sp., pozitivno korelisani sa sadržajem izomera neofitadiena, oktanske kiseline, benzil-izotiocijanata, *p*-krezola i estara tetradekanske kiseline.



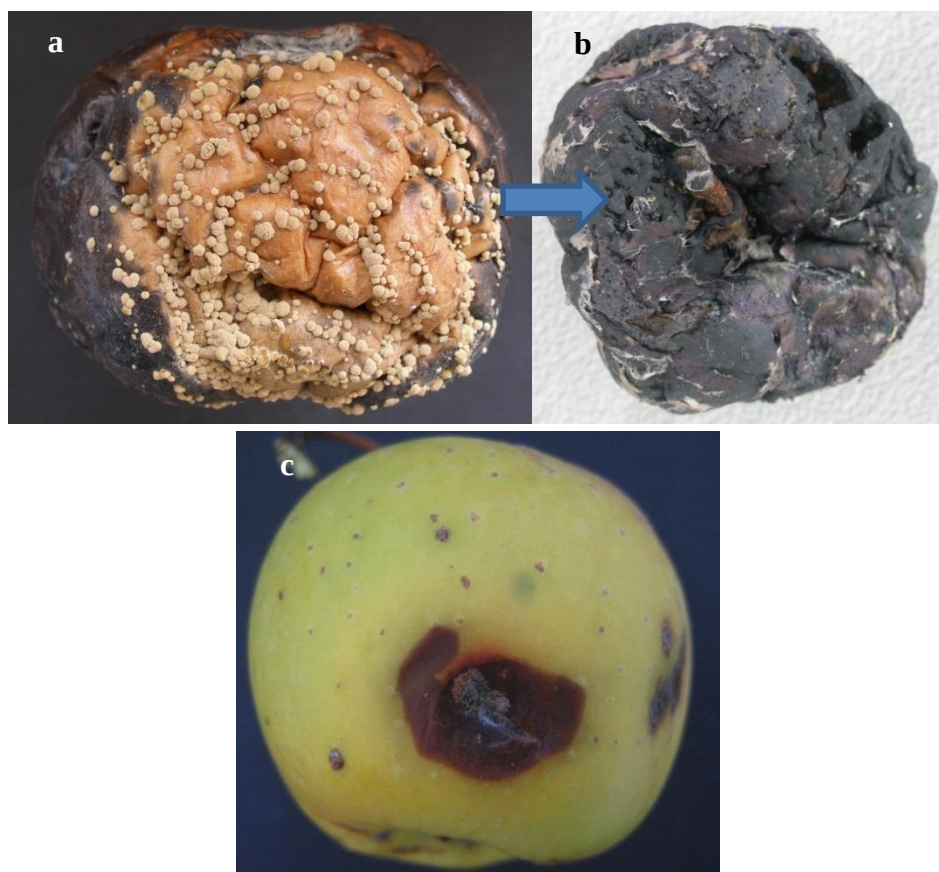
Grafik 42. Metoda glavne komponente (originalne varijable sastojaka sa sadržajem većim od 5% u ukupnom hemijskom sastavu u najmanje jednom ponavljanju (kvadrati), procenat inhibicije porasta micelije (levi biplot) i klijanje konidija (desni biplot) na devet fitopatogenih gljiva (krugovi), šest biljaka familije *Brassicaceae* (trouglovi). Ose F1 i F2 označavaju prvu i drugu glavnu komponentu. Sastojci u biplotovima: lim limonene; cre=*p*-krezol; oct=oktanska kiselina; bits=benzil-izotiocijanat; mtbi=4-metiltio-3-butenil izotiocijanat; etd=etil-tetradekanoat; itd=izopropil-tetradekanoat; neoI=nefitodien (izomer I), neoIII=neofitodien (izomer III); mhd=metil-heksadekanoat; mli=metil-linoleat; mol=metil-oleat; phy=(*E*)-fitol. Fitopatogene gljive: Mla=*Monilinia laxa*; Mfg=*M. fructigena*; Mfc=*M. fructicola*; Mpo=*M. polystroma*; Pex=*Penicillium expansum*; Bci=*Botrytis cinerea*; Cac=*Colletotrichum acutatum*; Cgl=*C. gloeosporoides*; Asp=*Alternaria* sp. Biljni materijal: Cab= kupus; Cau=karfiol; Bro=brokoli; Wmu=bela slačica; Wra=bela rotkva; Bra=crna rotkva.

5.9. Antagonisti *Monilinia* spp.

5.9.1. Identifikacija

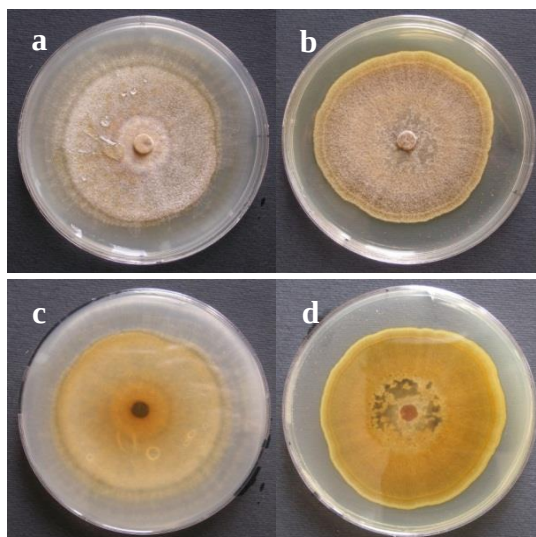
Dobijeni izolati i njihova patogenost

Iz plodova jabuke sa simptomima truleži dobijena su dva izolata: L1 i L2. Plod jabuke sorte Ajdared sa simptomom smeđe truleži (Slika 71a) iz kog je prethodno izolovana *M. polystroma* nakon tri meseca čuvanja bio je potpuno crn. Na plodu su se uočavale stromatične tvorevine crne boje (Slika 71 b). Iz ovog ploda dobijen je izolat L1. Kolonija ovog izolata bila je beličaste do žućkaste boje, ravnog oboda, sa oskudno razvijenom vazдушnom micelijom. U kulturi nije uočena sporulacija. Na naličju Petri kutije kod izolata L1 uočena je žućkasta obojenost u središnjem delu kolonije, dok je prema obodu kolonija bila beličasta (Slika 72 a, c).



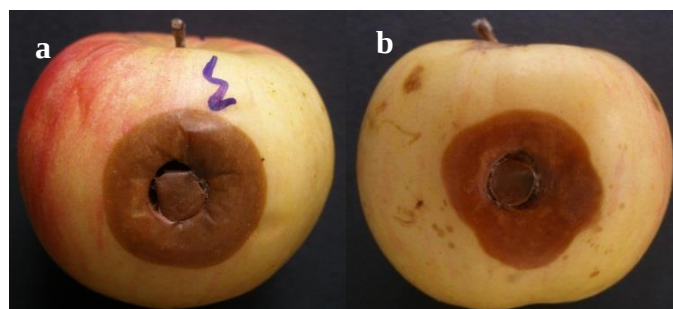
Slika 71. Plodovi jabuke iz kojih su izolovane antagonističke gljive: Simptom smeđe truleži sa prisustvom žućkastih sporodohija (a) i simptom crnila na istom plodu sorte Ajdared posle tri meseca (b); c-simptom smeđe truleži ploda sorte Zlatni Delišeš.

Plod jabuke sorte Zlatni Delišeš ispoljavao je simptom smeđe truleži. Površina zaraženog dela ploda bila je okruglasta, a pega je bila ravnog oboda (Slika 71 c). Izolat L2 koji je dobijen iz ovog ploda jabuke obrazovao je žućkastu do narandžastu koloniju, ravnog oboda sa oskudno razvijenom vazdušnom micelijom. Na naličju Petri kutija kolonija izolata L2 je bila narandžasto obojena i uočen je početak obrazovanja stromatičnih tvorevina u središnjem delu kolonije (Slika 72 b, d). Posle tri nedelje inkubacije, kod izolata L2 i izolata L1 uočena je intenzivna stromatizacija kulture na KDA podlozi.



Slika 72. Izgled kolonija izolata L1 (a–lice, c–naličje) i L2 (b–lice, d–naličje) na KDA podlozi.

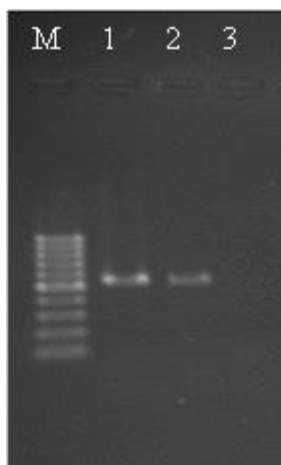
Ispitivani izolati L1 i L2 su ispoljili patogenost na inokulisanim plodovima jabuke sorte Ajdared. Posle pet dana inkubacije pojavili su se simptomi u vidu okruglastih, blago ugnutih pega braonkaste boje. Na zaraženim delovima nije bilo reproduktivnih organa ispitivanih gljiva (Slika 73 a, b). Na kontrolnim plodovima nije došlo do pojave simptoma. Dobijeni reizolati su ispoljili slične morfološke osobine kao izolovane gljive.



Slika 73. Simptomi bolesti na plodovima jabuke sorte Ajdared inokulisanim izolatima L1 (a) i L2 (b).

Molekularne osobine

Upotrebom ITS1 / ITS4 prajmera kod oba ispitivana izolata su dobijeni amplikoni veličine oko 550 bp, dok kod negativne kontrole nije došlo do amplifikacije (Slika 74).



Slika 74. 1,5% agarozni gel sa ITS1 / ITS4 amplikonima izolata L1 i L2 veličine oko 550 bp (M–marker 100 bp; 1-izolat L1; 2-izolat L2; 3–negativna kontrola).

Sekvenciranje i poređenje sekvenci

Nakon sekvencioniranja, konsenzusi nukleinskih kiselina ITS rDNA regiona izolata L1 i L2 su deponovani u GenBank bazu podataka pod pristupnim brojevima KN695551 i KN695552. Između sekvenci dobijenih izolata L1 i L2 utvrđena je razlika u jednom nukleotidu (99% sličnosti). MegaBlast analizom utvrđeno je da su sekvence izolata L1 i L2 bile identične ili su ispoljile 99% nukleotidne sličnosti sa sekvencama istog regiona vrste *Lambertella corni-maris* deponovanih u GenBank bazi podataka. Sekvenca izolata L1 bila je identična sa sedam sekvenci (KC958562, KC958559, KC958557, KC958555, KC958554, KC958553 i AB705239), a sekvenca izolata L2 sa pet sekvenci deponovanih u GenBank bazi podataka (AB705244, AB705243, AB705242, AB705241 i AB705240).

Identifikacija

Na osnovu morfoloških odlika na KDA podlozi, patogenih i molekularnih osobina izolati L1 i L2 su identifikovani kao *Lambertella corni-maris*.

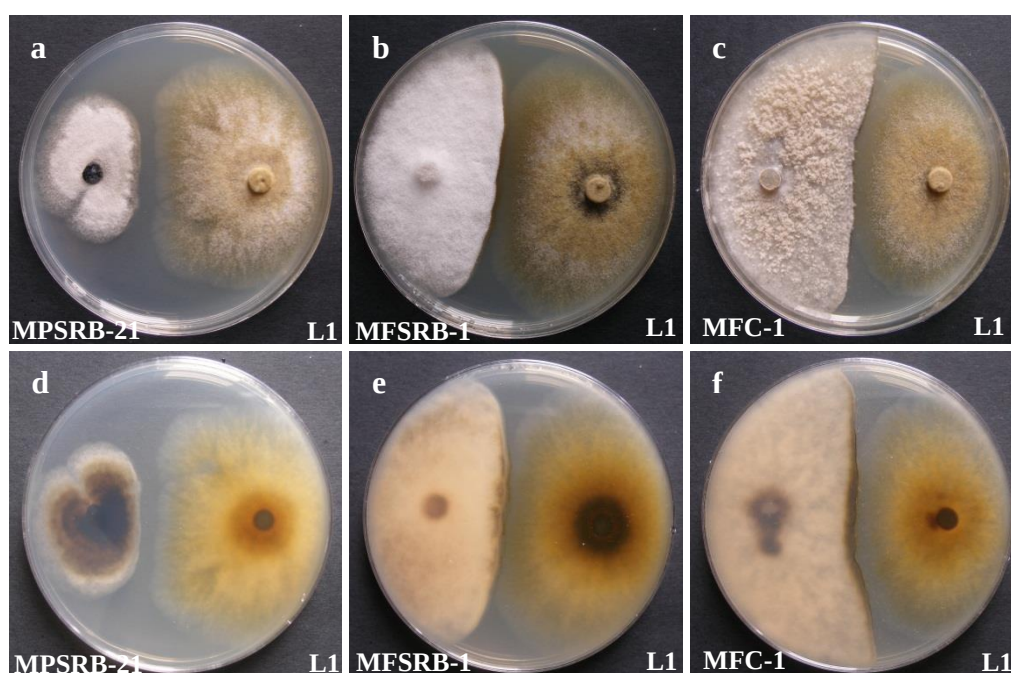
5.9.2. Antagonističko delovanje *L. corni-maris* na porast micelije *Monilinia* spp.

Zajedničkim gajenjem izolata *L. corni-maris* sa izolatima *M. fructigena*, *M. polystroma*, *M. fructicola* i *M. laxa* na KDA podlozi uočen je antagonizam između *L. corni-maris* i vrsta *Monilinia* spp.

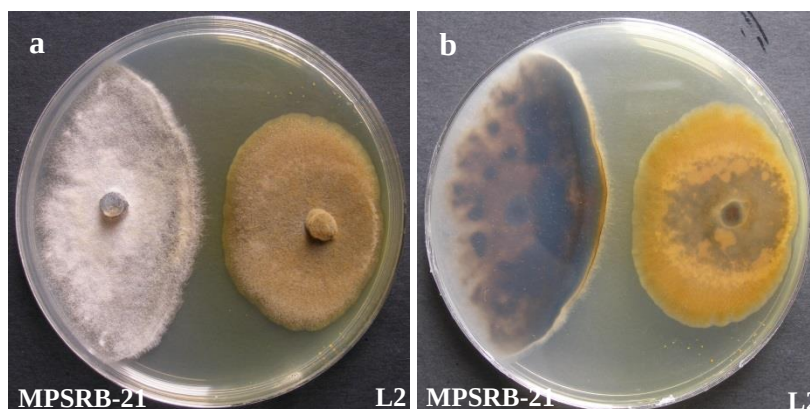
Posle sedam dana inkubacije izolat L1 je inhibirao porast kolonije izolata MFC-1 vrste *M. fructicola* 52,48%, kolonije izolata MPSRB-21 vrste *M. polystroma* 46,77%,

kolonije izolata MFSRB-1 vrste *M. fructigena* 45,54% i kolonije izolata MLX-7 vrste *M. laxa* 38,48% (Slika 75; Tabela 47; Grafik 43). Na mestu kontakta kolonija izolata L1 *L. corni-maris* i kolonija *M. fructigena* i *M. fructicola* došlo je do tamnjenja ivične zone kolonije *M. fructigena* i *M. fructicola*.

Izolat L2 vrste je inhibirao porast kolonije izolata MFC-1 vrste *M. fructicola* 51,26%, kolonije izolata MPSRB-21 vrste *M. polystroma* 41,8%, kolonije izolata MFSRB-1 vrste *M. fructigena* 40,7%, i porast kolonije izolata MLX-7 vrste *M. laxa* 37,34% (Slika 76; Tabela 47; Grafik 43).



Slika 75. Antagonističko delovanje *L. corni-maris* (L1) na *M. polystroma* (MPSRB-21), *M. fructigena* (MFSRB-1) i *M. fructicola* (MFC-1) (a, b, c-lice kultura; d, e, f-naličje kultura).

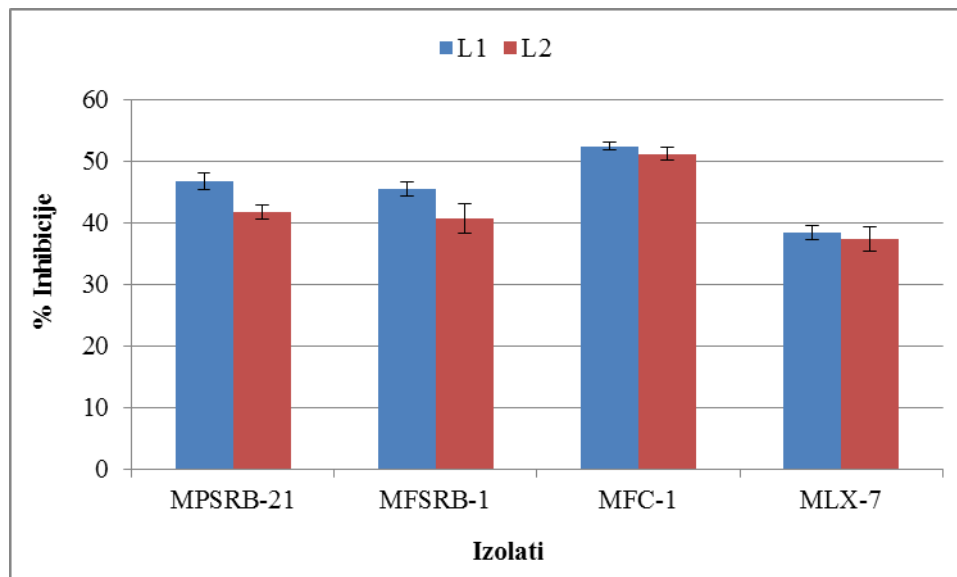


Slika 76. Antagonističko delovanje *L. corni-maris* (L2) na *M. polystroma* (MPSRB-21) (a-lice kulture; b-naličje kulture).

Tabela 47. Antagonističko delovanje izolata L1 i L2 na izolate *Monilinia* spp. posle sedam dana inkubacije.

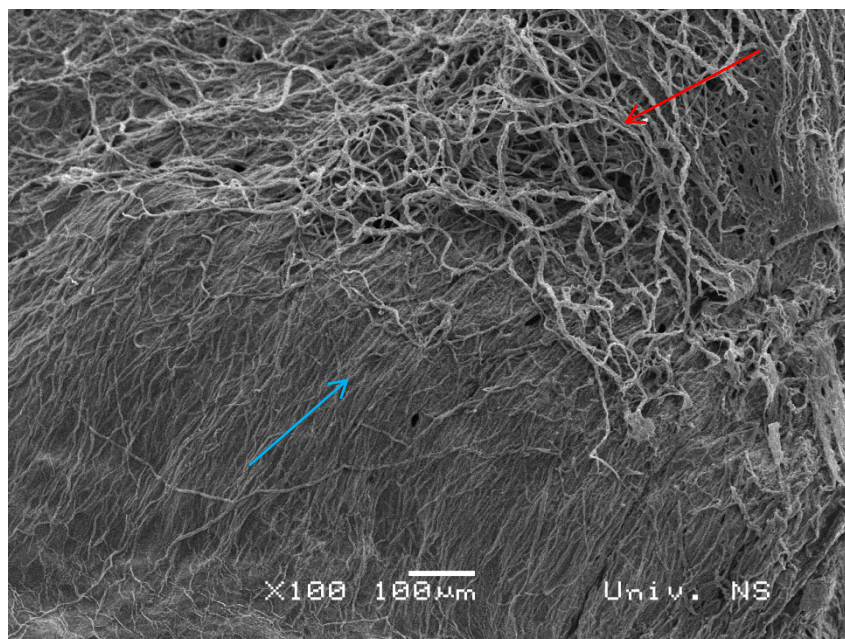
<i>Lambertella corni-maris</i>	% Inhibicije $\pm$ SE			
	<i>M. polystroma</i>	<i>M. fructigena</i>	<i>M. fructicola</i>	<i>M. laxa</i>
	(MPSRB-21)	(MFSRB-1)	(MFC-1)	(MLX-7)
Izolat L1	46,77 $\pm$ 3,4	45,54 $\pm$ 3,26	52,48 $\pm$ 1,22	38,48 $\pm$ 2,88
Izolat L2	41,8 $\pm$ 1,24	40,7 $\pm$ 2,41	51,26 $\pm$ 1,10	37,34 $\pm$ 1,99

Legenda: SE-standardna greška sredine.

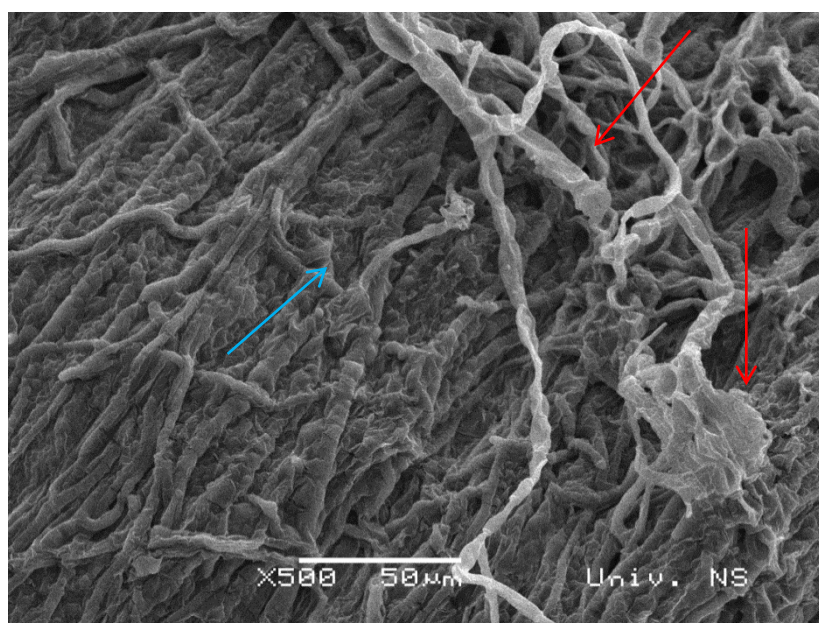


Grafik 43. Antagonističko delovanje izolata L1 i L2 *L. corni-maris* na *M. polystroma* (MPSRB-21), *M. fructigena* (MFSRB-1), *M. fructicola* (MFC-1) i *M. laxa* (MLX-7). Legenda: Vertikalni bar predstavlja standardnu grešku sredine.

Posmatranjem SEM mikrografija kontakta kolonija izolata L1 *L. corni maris* i *M. polystroma* uočena je deformacija hifa *M. polystroma* (Slike 77 i 78).

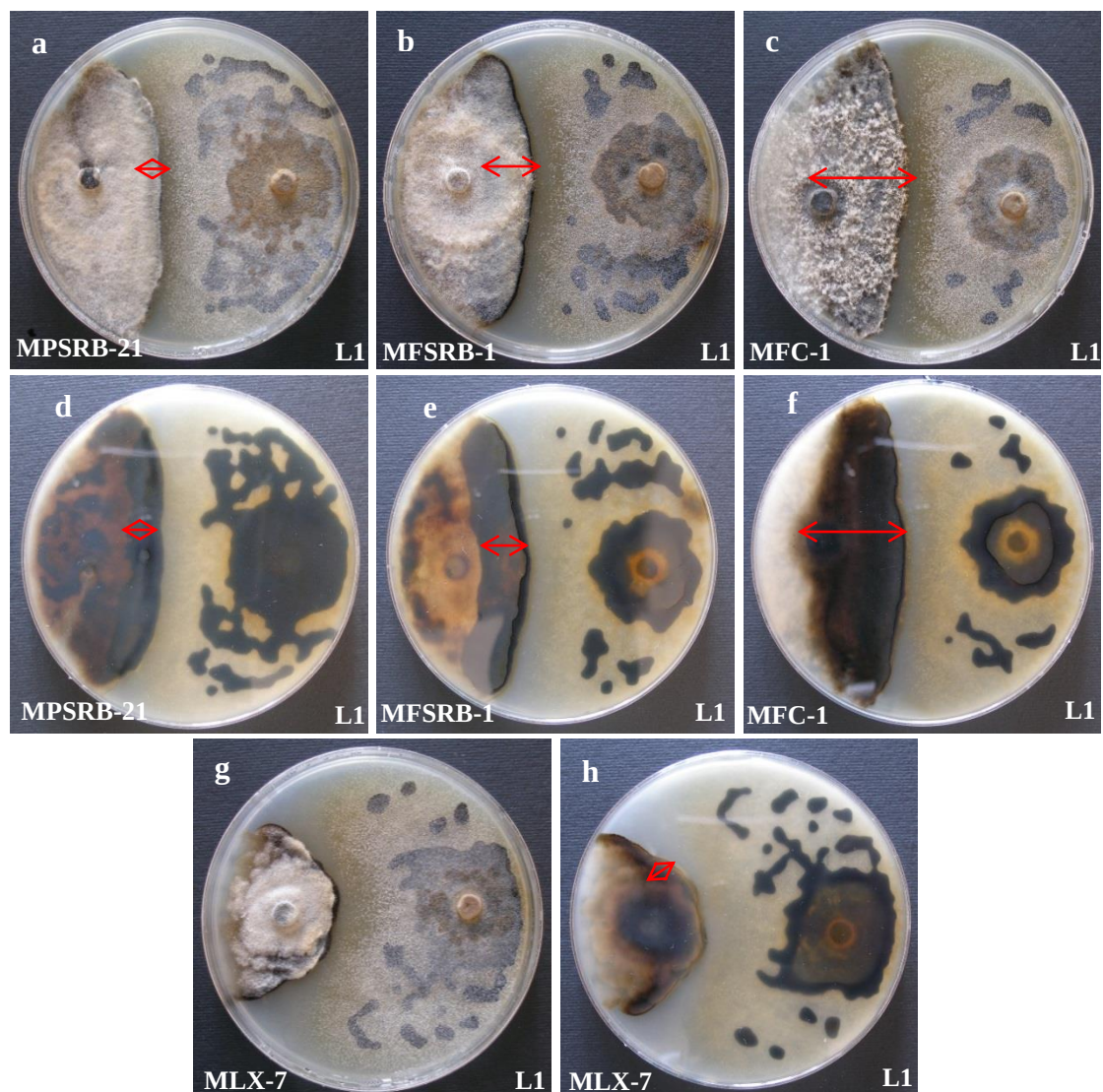


Slika 77. SEM mikrografija kontakta između izolata L1 *L. corni-maris* i *M. polystroma* (plava strelica označava miceliju *L. corni-maris*, dok crvena miceliju *M. polystroma*).



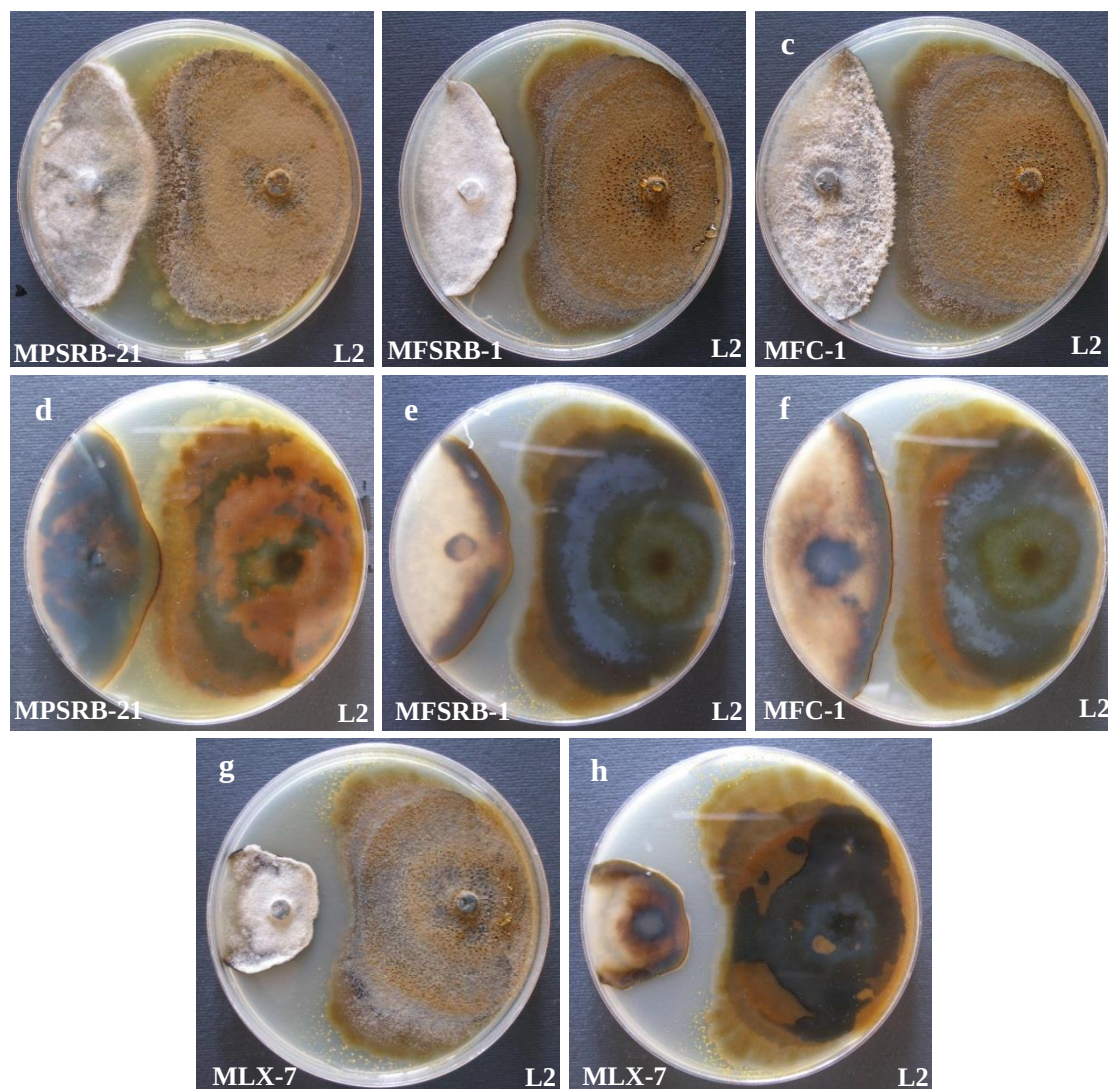
Slika 78. SEM mikrografija kontakta između izolata L1 *L. corni-maris* i *M. polystroma* (plava strelica označava miceliju *L. corni-maris*, dok crvena deformaciju hifa i lanaca konidija *M. polystroma*).

Posle tri nedelje inkubacije izolata L1 *L. corni-maris* i ispitivanih izolata *Monilinia* spp. na naličju Petri kutija uočeno je da je ivična zona kolonija izolata izolata MPSRB-21, MFSRB-1, MFC-1 i MLX-7 promenila boju i bila crno pigmentisana (Slika 79). Crna ivična zona bila je jako široka kod *M. fructicola*, zatim kod *M. fructigena* i *M. polystroma* i najuža kod *M. laxa*. Uočena je i intenzivna stromatizacija u kulturama izolata L1 i L2.



Slika 79. Antagonistično delovanja *L. corni-maris* (L1) prema *M. polystroma* (MPSRB-21), *M. fructigena* (MFSRB-1), *M. fructicola* (MFC-1), *M. laxa* (MLX-7 (a, b, c, g-lice kultura; d, e, f, h-naličje kultura; Strelica označava zonu kolonija *Monilinia* spp. koja je bila crno obojena).

Posle tri nedelje inkubacije izolata L2 i ispitivanih izolata *Monilinia* spp. na naličju Petri kutija takođe je uočena je crna ivična zona kolonija izolata MPSRB-21, MFSRB-1, MFC-1 i MLX-7 (Slika 80). Pored antagonizma L2 prema *M. fructigena* i *M. laxa*, uočena je i pojava koantagonizma *M. fructigena* i *M. laxa* prema izolat L2 *L. corni-maris*.



Slika 80. Antagonističko delovanje *L. corni-maris* (L2) prema *M. polystroma* (MPSRB-21), *M. fructigena* (MFSRB-1), *M. fructicola* (MFC-1), *M. laxa* (MLX-7) posle tri nedelje inkubacije (a, b, c, g-lice kultura; d, e, f, h-naličje kultura).

5.9.3. Ekološke, odgajivačke i patogene osobine dobijenih izolata *L. corni-maris*.

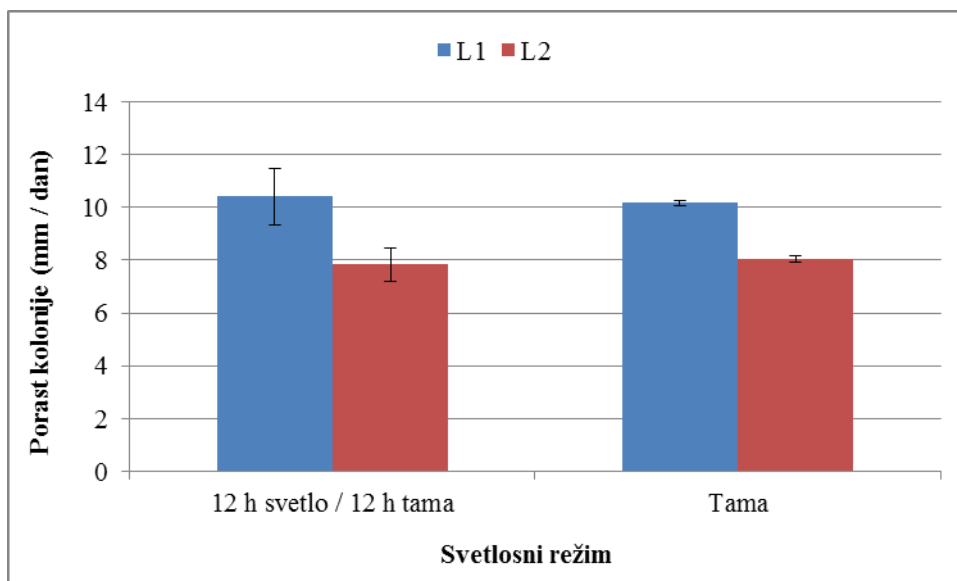
Uticaj svetlosnih režima na porast kolonija

Kolonije izolata L1 su brže rasli od kolonija izolata L2 u oba ispitivana svetlosna režima. U svetlosnom režimu 12 h svetlo / 12 h tama prosečni dnevni porast izolata L1 je iznosio 10,42 mm, a izolata L2 7,83 mm, dok u tami prosečni dnevni porast izolata L1 iznosio je 10,17 mm, a izolata L2 8,05 mm. U svetlosnom režimu 12 h svetlo / 12 h tama i uslovima tame nije utvrđena statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u brzini porasta kolonija izolata L1 i L2 (Tabela 48; Grafik 44).

Tabela 48. Porast kolonije izolata L1 i L2 *L. corni-maris* u uslovima različitih svetlosnih režima

Izolat	Prosečni dnevni porast kolonija (mm / dan)	
	12 h svetlo / 12 h tama	Tama
L1	10,42 ± 1,08a	10,17 ± 0,08a
L2	7,83 ± 0,65a	8,05 ± 0,14a

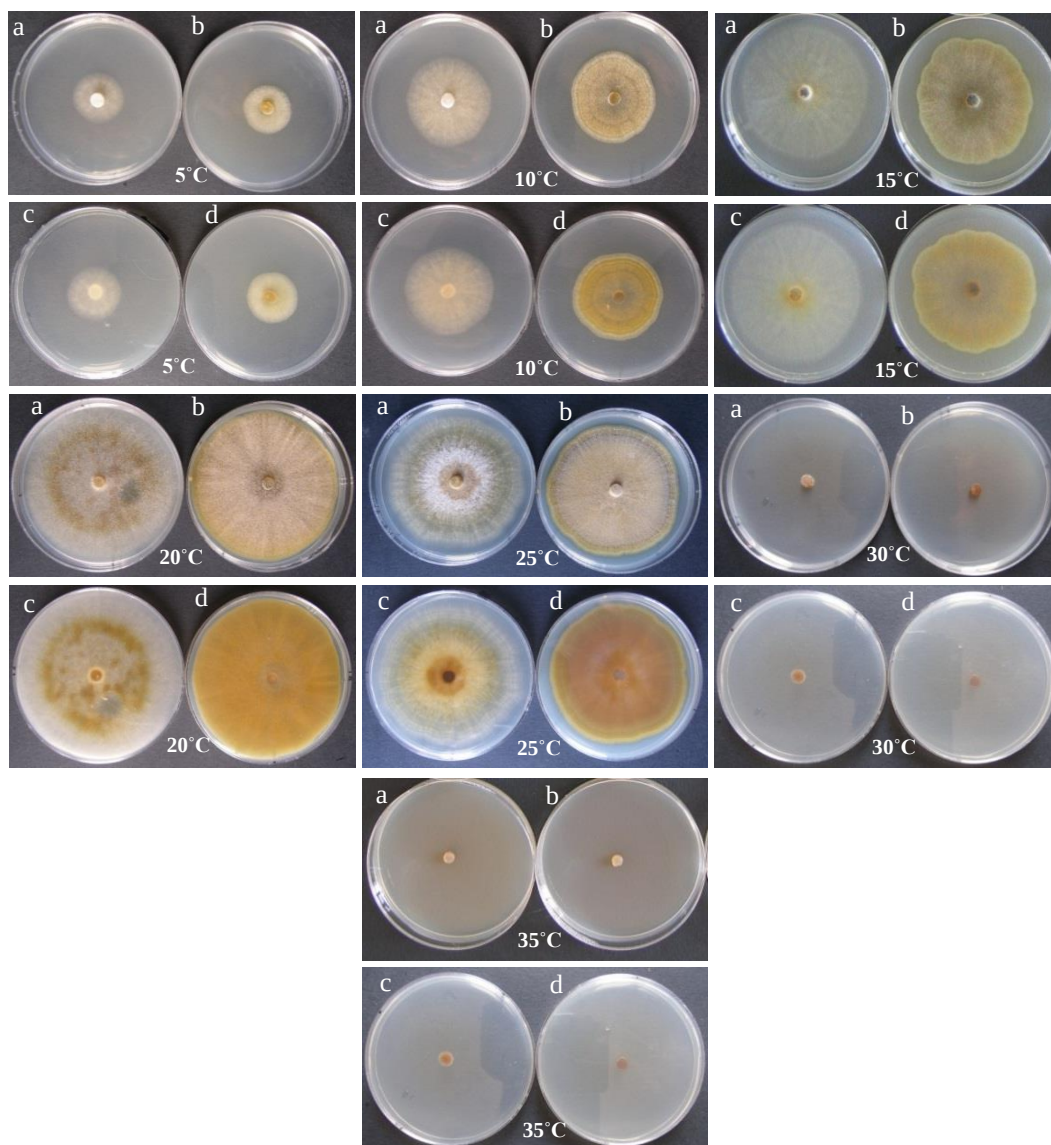
Legenda: Istim slovima su označene grupe u redovima između kojih nije uočena statistički značajna razlika Tukey HSD testom ($p < 0,05$)



Grafik 44. Porast kolonije izolata L1 i L2 *L. corni-maris* u uslovima različitih svetlosnih režima. Legenda: Vertikalni bar predstavlja standardnu grešku sredine.

Uticaj različitih temperatura na porast kolonija

Izolati L1 i L2 su rasli pri temperaturama od 5°C do 30°C, ali ne i pri 35°C (Slika 81; Tabela 49; Grafik 45). Optimalna temperatura za porast ispitivanih izolata bila je 20°C, pri kojoj je izolat L1 ispoljio najbrži prosečni dnevni porast kolonije od 10,92 mm, a izolat L2 8,69 mm. Izolati L1 i L2 su dobro rasli i pri temperaturama od 15°C i 25°C, sporije pri 10°C i 5°C, a najsporije pri 30°C.

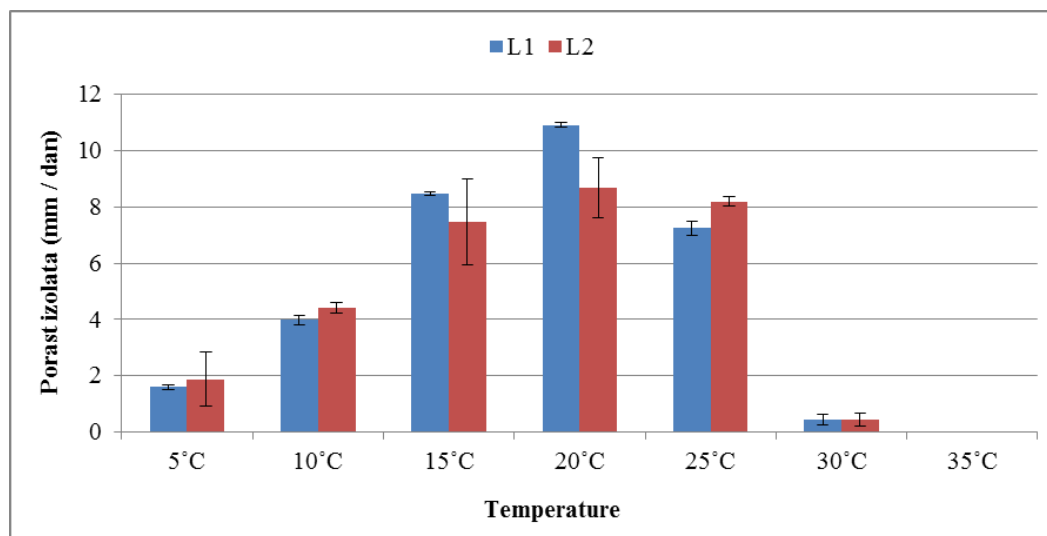


Slika 81. Kolonije izolata L1 (a-lice, c-naličje) i L2 (b-lice, d-naličje) posle sedam dana inkubacije.

Tabela 49. Uticaj različitih temperatura na porast micelije izolata *L. corni-maris*

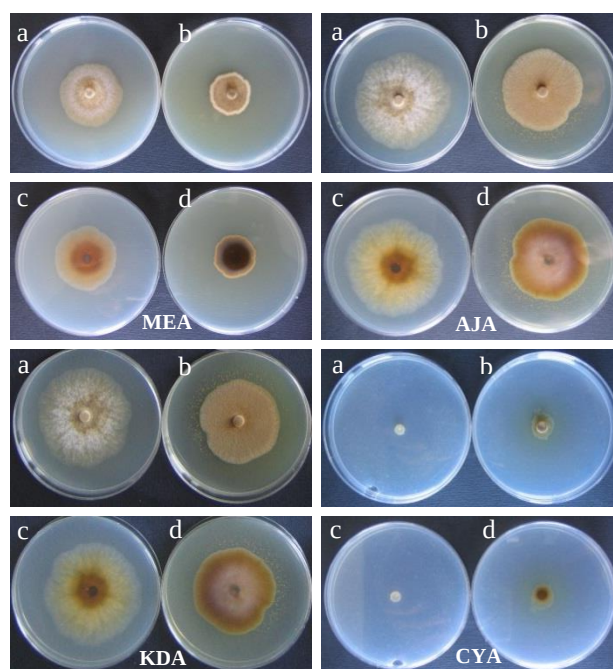
Izolat	Prosečni dnevni porast kolonija (mm / dan $\pm$ SE)						
	5°C	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C
L1	1,59 $\pm$ 0,08b	3,98 $\pm$ 0,18c	8,47 $\pm$ 0,05de	10,92 $\pm$ 0,07f	7,24 $\pm$ 0,24d	0,43 $\pm$ 0,19a	0 $\pm$ 0a
L2	1,88 $\pm$ 0,97b	4,42 $\pm$ 0,19c	7,47 $\pm$ 1,52d	8,69 $\pm$ 1,07ef	8,19 $\pm$ 0,17de	0,44 $\pm$ 0,23a	0 $\pm$ 0a

Legenda: Istim slovima su označene grupe u redovima između kojih nije uočena statistički značajna razlika Tukey HSD testom ($p < 0,05$); SE-standardna greška sredine.

**Grafik 45.** Uticaj različitih temperatura na porast kolonije izolata L1 i L2 vrste *L. corni-maris*. Legenda: Vertikalni bar predstavlja standardnu grešku sredine.

Uticaj različitih podloga na porast kolonija

Kolonije izolata L1 i L2 su dobro rasle na svim hranljivim podlogama, osim na CYA. Na ovoj podlozi kolonije izolata L1 nisu rasle, dok su kolonije izolata L2 najsporije rasle sa prosečnim dnevnim porastom od 1,03 mm (Slika 82; Tabela 50; Grafik 46). Najbrži prosečni dnevni porast kolonija oba izolata bio je na KDA podlozi (7,04 mm kod izolata L1 i 6,87 mm kod izolata L2), zatim na V8 podlozi (6,88 mm kod izolata L1 i 5,72 mm kod izolata L2). Nešto sporiji prosečni dnevni porast kolonija ispoljen je na AJA podlozi (3,98 mm kod izolata L1 i 3,93 mm kod izolata L2) i MEA podlozi (3,36 mm kod izolata L1 i 3,07 mm kod izolata L2).

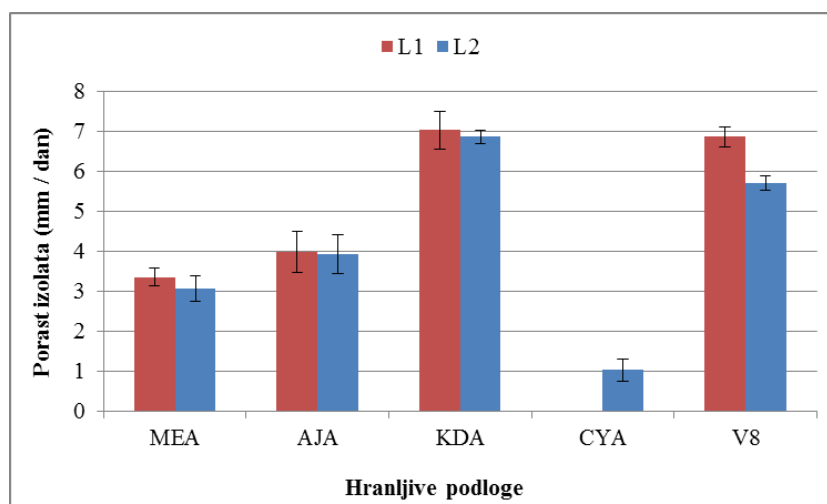


Slika 82. Kolonije izolata L1 (a-lice, c-naličje) i L2 (b-lice, d-naličje) *L. corni-marisi* na različitim hranljivim podlogama posle sedam dana inkubacije. MEA-podloga od slada; AJA-podloga od soka jabuke; KDA-podloga od krompir dekstroznog agara; CYA-Čapekova podloga.

Tabela 50. Uticaj različitih hranljivih podloga na porast kolonija izolata *L. corni-maris*.

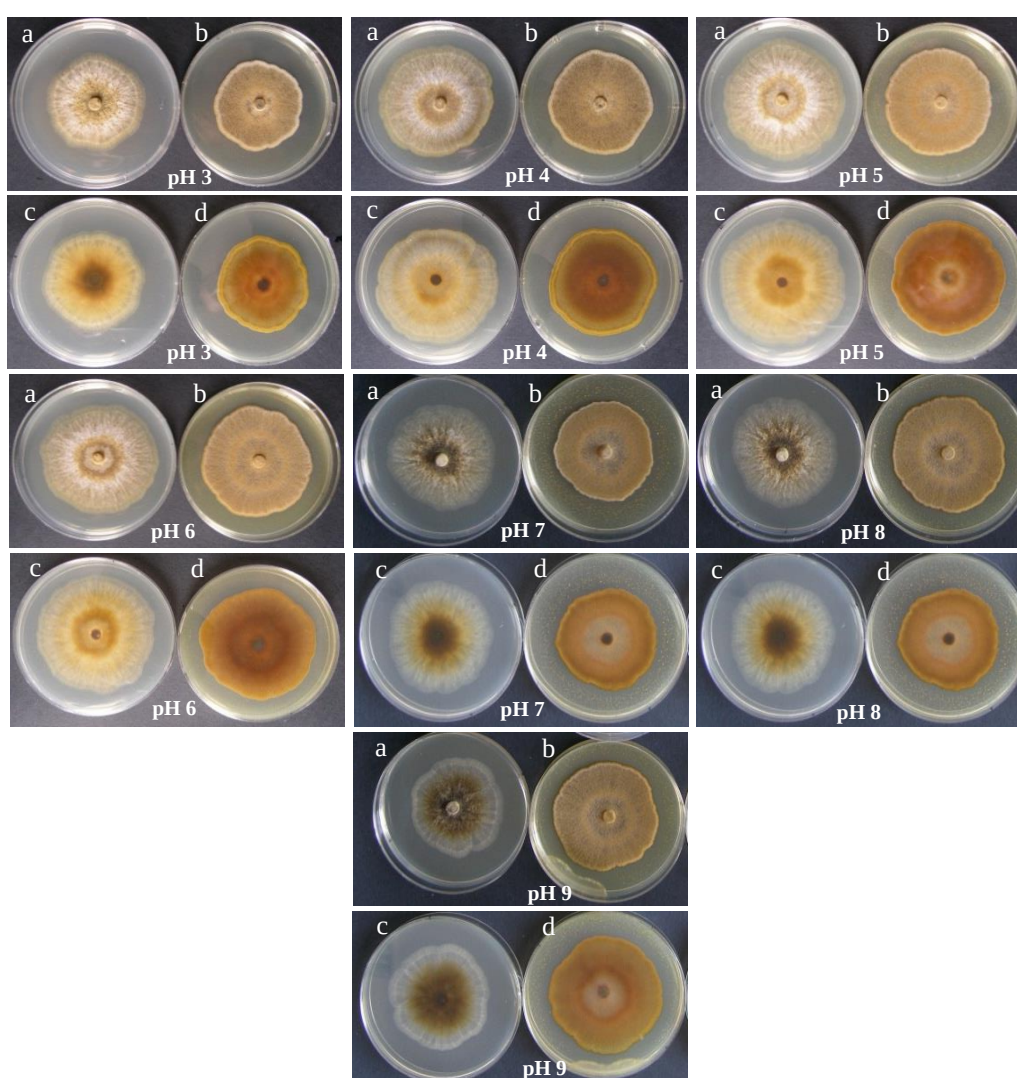
Izolat	Prosečni dnevni porast kolonija na različitim hranljivim podlogama (mm / dan $\pm$ SE)				
	MEA	AJA	KDA	CYA	V8
L1	3,36 $\pm$ 0,21b	3,98 $\pm$ 0,51b	7,04 $\pm$ 0,47cd	0 $\pm$ 0a	6,88 $\pm$ 0,25c
L2	3,07 $\pm$ 0,32b	3,93 $\pm$ 0,49b	6,87 $\pm$ 0,17d	1,03 $\pm$ 0,28a	5,72 $\pm$ 0,18c

Legenda: Istim slovima su označene grupe u redovima između kojih nije uočena statistički značajna razlika Tukey HSD testom ($p < 0,05$); SE-standardna greška sredine. MEA-podloga od slada; AJA-podloga od soka jabuke; KDA-podloga od krompir dekstroznog agara; CYA-Čapekova podloga; V8-podloga od soka od paradajza.

**Grafik 46.** Uticaj različitih hranljivih podloga na porast kolonija izolata L1 i L2 *L. corni-maris*. Legenda: Vertikalni bar predstavlja standardnu grešku sredine. MEA-podloga od slada; AJA-podloga od soka jabuke; KDA-podloga od krompir dekstroznog agara; CYA-Čapekova podloga; V8-podloga od soka od paradajza.

Uticaj različitih pH vrednostima podloge na porast kolonije

Izolati L1 i L2 *L. corni-maris* su rasli pri pH vrednostima podloge od 3 do 9 (Slika 83; Tabela 51; Grafik 47). Najoptimalnija pH vrednost za porast izolata bila je 6, ali su izolati dobro rasli i pri ostalim pH vrednostima podloge. Najbrži prosečni dnevni porast kolonije od 7,41 mm izolata L1 i 7,07 mm izolata L2 ispoljen je pri pH 6. Najsporiji prosečni dnevni porast kolonija izolata L1 od 5,16 mm i izolata L2 od 5,09 mm bio je pri pH 3 podloge. Pri ostalim pH vrednostima prosečni porast kolonija izolata L1 je iznosio od 6,33-7,04 mm, a izolata L2 od 5,4-6,73 mm.

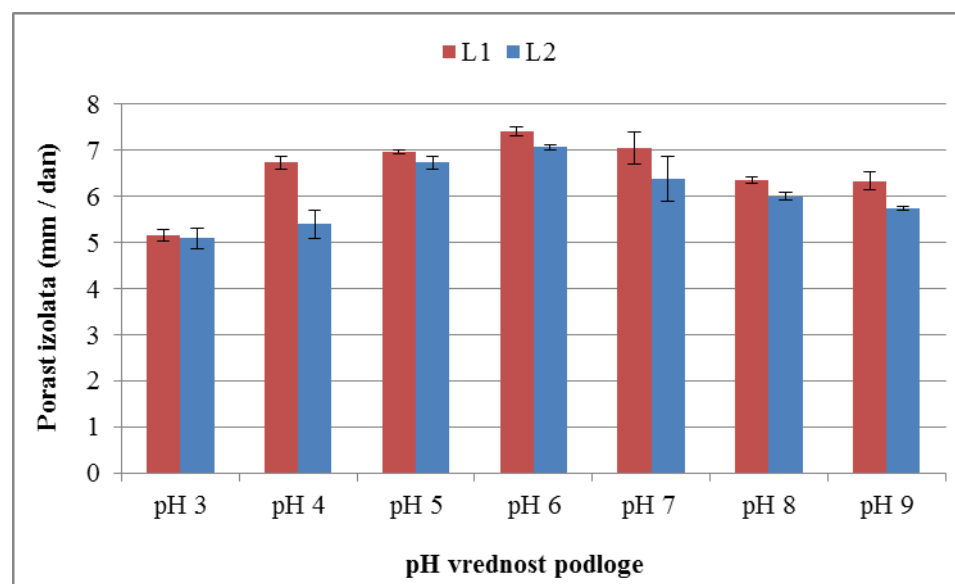


Slika 83. Kolonija izolata L1 (a-lice, c-naličje) i L2 (b-lice kultura, d-naličje) *L. corni-maris* pri različitim pH vrednostima podloge.

Tabela 51. Uticaj različitih pH vrednosti podloga na porast kolonije izolata L1 i L2 *L. corni-maris*

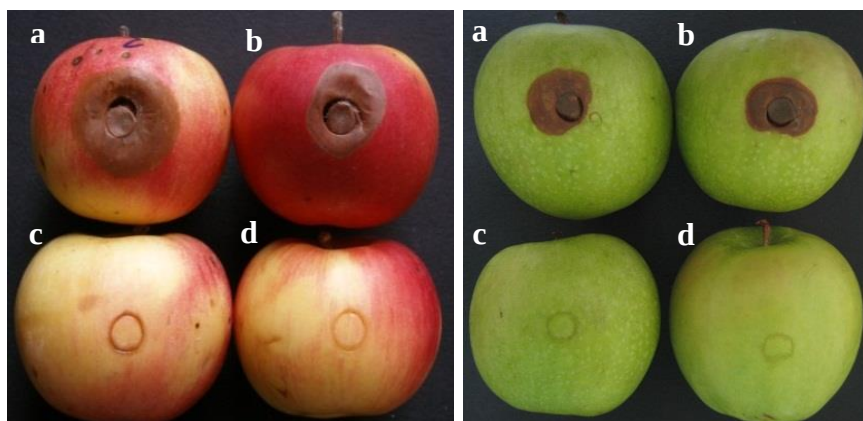
Izolat	Prosečni dnevni porast kolonija (mm / dan $\pm$ SE)						
	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9
L1	5,16 $\pm$ 0,23a	6,73 $\pm$ 0,31bc	6,97 $\pm$ 0,14 bc	7,41 $\pm$ 0,06d	7,04 $\pm$ 0,08cd	6,35 $\pm$ 0,05b	6,33 $\pm$ 0,5b
L2	5,09 $\pm$ 0,12a	5,4 $\pm$ 0,14ab	6,73 $\pm$ 0,04de	7,07 $\pm$ 0,11e	6,38 $\pm$ 0,35de	6 $\pm$ 0,08cd	5,74 $\pm$ 0,19bc

Legenda: Istim slovima u redovima su označene grupe u redovima između kojih nije uočena statistički značajna razlika Tukey HSD testom ($p < 0,05$); SE-standardna greška sredine.

**Grafik 47.** Uticaj različitih pH vrednosti podloga na porast micelije izolata L1 i L2 *L. corni-maris*. Legenda: Vertikalni bar predstavlja standardnu grešku sredine.

Patogene osobine *Lambertella corni-maris*

Na plodovima jabuke sorti Ajdared, Zlatni Delišeš i Greni Smit inokulisanim izolatima L1 i L2 pojavili su se simptomi u vidu okruglastih, blago ugnutnih pega braokaste boje (Slika 84). Virulentnost izolata je izražena kroz prečnik pege na plodu jabuke posle inkubacije od pet dana i prikazana je u Tabeli 52 i Grafiku 48. Na plodovima jabuke sorte Ajdared inokulisanim izolatom L1 prosečni prečnik pege iznosio je 20,69 mm i 21,81 mm na plodovima inokulisanim izolatom L2. Na plodovima jabuke sorte Zlatni Delišeš inokulisanim izolatom L1 prosečni prečnik pege iznosio je 25,63 mm i 24,42 mm na plodovima inokulisanim izolatom L2. Na plodovima jabuke sorte Greni Smit inokulisanim izolatom L1 prosečni prečnik pege iznosio je 19,75 mm i 20,1 mm inokulisanim izolatom L2. Oba izolata su prouzrokovala veće pege na plodovima sorte Zlatni Delišeš ($p < 0,05$). Veličina pege oba izolata je bila manja na sorti Ajdared i Greni Smit i nije se statistički značajno razlikovala.

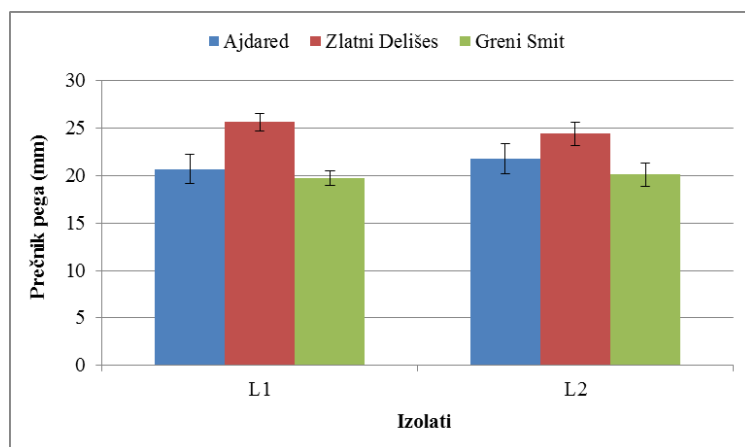


Slika 84. Patogene osobine *Lambertella corni-maris* na sorti Ajdared i Greni Smit (a-izolat L1; b-izolat L2; c, d-kontrola).

Tabela 52. Virulentnost izolata *L. corni-maris* na veštački zaraženim plodovima jabuke.

Izolat	Prosečna veličina pege (mm / dan $\pm$ SE)		
	Ajdared	Zlatni Delišeš	Greni Smit
L1	20,69 $\pm$ 1,21a	25,63 $\pm$ 1,61b	19,75 $\pm$ 1,24a
L2	21,81 $\pm$ 0,92a	24,42 $\pm$ 1,51b	20,1 $\pm$ 0,79a

Legenda: Istim slovima su označene grupe u redovima između kojih nije uočena statistički značajna razlika Tukey HSD testom ($p < 0,05$); SE-standardna greška sredine.



Grafik 48. Virulentnost izolata L1 i L2 *L. corni-marisi* na inokulisanim plodovima jabuke. Legenda: Vertikalni bar predstavlja standardnu grešku sredine.

6. DISKUSIJA

6.1. Simptomi bolesti

Tokom trogodišnjeg ispitivanja etiologije smeđe truleži plodova jabuke u voćnjacima i skladištima u Srbiji, od 2010. do 2012. godine, kao prouzrokovajući ovog oboljenja utvrđene su *M. fructigena*, *M. polystroma*, *M. fructicola* i *M. laxa*. Simptomi smeđe truleži prouzrokovani vrstama roda *Monilinia* opisani su i drugim istraživanjima (Wormald 1954; Byrde and Willetts, 1977; Batra, 1991; Vučković i Babović, 1997; Petroczy and Palkovics, 2009; OEPP / EPPO, 2011; Lesik, 2013; Petroczy et al., 2012; Poniatowska et al., 2013; Di Francesco et al., 2015). Najkarakterističniji i najučestaliji simptom na plodovima zaraženim gljivama *M. fructigena* i *M. polystroma* u vegetaciji bila je smeđa trulež koja je delimično ili potpuno zahvatila plod sa prisustvom žućkastih sporodohija na površini tkiva. Sporadično, pojedini simptomatični plodovi su bili bez sporodohija. Ovakve simptome na plodovima jabuke opisali su i drugi istraživači kao simptome koje prouzrokuje *M. fructigena* (Wormald 1954; Byrde and Willetts, 1977; Batra, 1991), dok o simptomima koje prouzrokuje *M. polystroma* na plodovima jabuke nema mnogo podataka. Petroczy and Palkovics (2009) su prvi put uočili pojavu mnoštva sporodohija žućkaste boje na nezrelim plodovima sorte jabuke Ešton Biter (Ashton Bitter) u Mađarskoj koje formira *M. polystroma*. Nedavno su Di Francesco et al. (2015) opisali simptome koje izaziva *M. polystroma* u Hrvatskoj u vidu okruglastih pega braon do crne boje, pokrivenih sporodohijama žućkaste do kremaste boje na plodovima jabuke sorte Pink Lejdi (Pink Lady). Na plodovima jabuke zaraženim *M. fructicola* uočeni su simptomi smeđe truleži, sa sporadičnom sporulacijom u vidu mase spora žutomrke boje, što su zabeležili i Grabke et al. (2011) na plodovima jabuke zaražene *M. fructicola*. Plodovi zaraženi *M. laxa* ispoljili su simptome smeđe truleži sa prisustvom micelije beličaste boje na površini zaraženog tkiva. Vučković i Babović (1997) i Lesik (2013) takođe navode da *M. laxa* prouzrokuje simptome smeđe truleži na zaraženim plodovima jabuke. Pored simptoma smeđe truleži tokom ovih istraživanja u voćnjacima su uočeni i mumificirani plodovi jabuke, što je karakteristično za *Monilinia* spp. (Byrde and Willetts, 1977; Batra, 1991).

U skladištima su svi zaraženi plodovi jabuke ispoljili simptome u vidu truleži crne boje ili smeđe truleži kod kraće čuvanih plodova. Trulež crne boje na plodovima

jabuke u skladištima prouzrokovana *Monilinia* spp. opisana je i od strane **Byrde and Willetts (1977)**. Na plodovima jabuke zaraženim *M. fructigena* i *M. polystroma* uočeno je obrazovanje beličastih micelijskih nakupina, ali ne i na plodovima zaraženim *M. fructicola* i *M. laxa*. Retku ili gotovo potpuno odsutnu sporulaciju *Monilinia* spp. na površini zaraženog tkiva u skladištima uz pojavu skupina gusto isprepletanih hifa beličaste boje opisuje **Wormald (1954)**. Sporulacija *Monilinia* spp. na površini zaraženih plodova je uslovljena smenom svetla i tame, tako da uslovi u hladnjačama nisu optimalni za obrazovanje spora patogena (**Wormald, 1954**).

6.2. Identifikacija *Monilinia* spp.

Iz sakupljenih plodova jabuke sa simptomima smeđe truleži i crnila plodova dobijeni su izolati čije su morfološke i molekularne osobine proučene. Na osnovu morfoloških osobina kultura gljiva izdvojilo se pet grupa izolata.

Prva grupa izolata je obrazovala kolonije beličaste do sivkaste boje, ravnog oboda i nije sporulisala na KDA podlozi i prema literaturnim podacima ispoljila je najviše sličnosti sa *M. fructigena* (**Byrde and Willetts, 1977; Mordue 1979b; van Leeuwen and van Kesteren, 1998; Lane, 2002; OEPP / EPPO, 2009**). Druga grupa izolata obrazovala je kolonije sličnog izgleda kao i izolati prve grupe, ali su uočene i stromatične tvorevine u kolonijama što je karakteristika *M. polystroma* (**van Leeuwen et al., 2002; Holb, 2004b; Petroczy and Palkovics, 2009; OEPP / EPPO, 2009; Poniatowska et al., 2013**), ali i nekih izolata *M. fructigena* (**Poniatowska et al., 2013**). Izolati treće grupe obrazovali su sivkaste kolonije, ravnog oboda, bez sporulacije, sa brojnim stromatičnim tvorevinama raspoređenim u obliku koncentričnih krugova, što je u skladu sa literaturnim podacima za *M. polystroma* (**van Leeuwen et al., 2002; Holb, 2004b; Petroczy and Palkovics, 2009; OEPP / EPPO, 2009; Poniatowska et al., 2013**). Četvrta grupa izolata obrazovala je sivkaste kolonije, režnjevito oboda, izgleda rozete i slabo razvijene vazdušne micelije bez sporulacije, što je u skladu sa literaturnim opisom kolonija *M. laxa* (**Byrde and Willetts, 1977; Mordue 1979c; van Leeuwen and van Kesteren, 1998; Lane, 2002; OEPP / EPPO, 2009**). Izolati pete grupe obrazovali su sivkaste kolonije, ravnog oboda, dok su na površini vazdušne micelije bile obrazovane mase spora, što je u skladu sa literaturnim podacima za *M. fructicola* (**Byrde and Willetts, 1977; Mordue, 1979a; van Leeuwen and van Kesteren, 1998**;

Lane, 2002; OEPP / EPPO, 2009). Na V8 podlozi izolati su obrazovali jednoćelijske hijalinske konidije u lancima što je opisano za *Monilinia* vrste (**Byrde and Willetts, 1977; Mordue, 1979a; Mordue 1979b; Mordue 1979c; Batra, 1991; van Leeuwen et al., 2002).**

U cilju identifikacije izolata *Monilinia* spp. dobijenih iz plodova jabuka poreklom iz Srbije urađena je molekularna detekcija primenom Multiplex PCR (**Cote et al., 2004**). Amplikoni specifični za *M. fructigena* dobijeni su kod prve i druge grupe izolata, amplikoni specifični za vrstu *M. polystroma*, kod treće grupe izolata, amplikoni specifični za vrstu *M. laxa*, kod četvrte grupe izolata, dok amplikoni specifični za *M. fructicola* kod izolata pete grupe. Multiplex PCR metoda razvijena od strane **Cote et al. (2004)** pruža pouzdanu molekularnu detekciju i identifikaciju vrsta ovog roda, što je potvrđeno i u ovim ispitivanjima, kao i u drugim istraživanjima (**OEPP / EPPO, 2009; Poniatowska et al. 2013; Hrutić, 2014**). Na osnovu morfoloških osobina i amplifikacije specifičnih PCR produkata izolati prve i druge grupe su identifikovani kao *M. fructigena*, izolati treće grupe kao *M. polystroma*, izolati četvrte grupe kao *M. laxa* i pete grupe kao *M. fructicola*.

6.3. Morfološka karakterizacija *Monilinia* spp.

Poređenjem ispoljenih morfoloških karakteristika kolonija na KDA podlozi (izgleda, boje, oboda, sporulacije, obrazovanja stromatičnih tvorevina) nije uočena značajna varijabilnost među izolatima *M. polystroma*, *M. fructicola* i *M. laxa*, dok su morfološke osobine izolata kolonija *M. fructigena* varirale na KDA podlozi. Kod *M. fructigena*, uočeno je da pojedini izolati mogu da obrazuju kolonije koje su tamnije obojene uz formiranje stromatičnih tvorevina, što je vidljivo na naličju Petri kutija. Slično, obrazovanje stromatičnih tvorevina izolata *M. fructigena* na KDA podlozi, poreklom iz Poljske, uočili su i **Poniatowska et al. (2013)**. Imajući u vidu da je intenzivno obrazovanje stromatičnih tvorevina u kulturama osobina izolata *M. polystroma* (**van Leeuwen et al., 2002; Holb, 2004b; Petroczy and Palkovics, 2009; OEPP / EPPO, 2009; Poniatowska et al., 2013**), ova osobina izolata *M. fructigena* može da dovede do pogrešne identifikacije vrste. Morfološko variranje izolata *M. fructigena* su zabeležili i **Petroczy et al. (2012)** i **Munoz et al. (2008)**. Kolonije pojedinih izolata *M. fructigena* mogu biti sličnog izgleda kao *M. laxa* (**Munoz et al.,**

2008; Petroczy et al., 2012).

Ispitivani izolati *M. fructicola* su ispoljili brži prosečni dnevni porast od izolata *M. fructigena*, *M. polystroma* i *M. laxa*. Brži prosečni dnevni porast kolonija izolata *M. fructicola* od izolata *M. laxa* i *M. fructigena* su uočili i **De Cal and Melgarejo (1999)**, **van Leeuwen and van Kesteren (1998)**, **OEPP / EPPO (2009)**, **Petroczy et al. (2012)**, **Poniatowska et al. (2013)** i **Hrustić (2014)**, a od izolata *M. polystroma* **Petroczy et al. (2012)** i **Poniatowska et al. (2013)**. Između ispitivanih izolata *M. polystroma*, *M. laxa* i *M. fructicola* nije uočena razlika u prosečnom dnevnom porastu što su zabeležili i **Poniatowska et al. (2013)** kod izolata *Monilinia* spp. poreklom iz Poljske. Sa druge strane, u istraživanjima **van Leeuwen et al. (2002)** uočen je brži porast izolata *M. polystroma*, poreklom iz Japana, od *M. fructigena*, kao i u ispitivanjima **Petroczy et al. (2012)** kod mađarskih izolata *M. polystroma*, koji su imali brži porast kolonija od *M. fructigena* i *M. laxa*. Među izolatima *M. fructigena*, poreklom iz Srbije, uočeno je značajno variranje u porastu kolonija što su zabeležili **Petroczy et al. (2012)** kod mađarskih izolata *M. fructigena*. **Petroczy et al. (2012)** su uočili variranje u porastu kolonija *M. laxa*, za razliku od srpskih izolata *M. laxa* iz plodova jabuke.

Pored posmatranja makroskopskih osobina izolata, ispitivane su mikroskopske osobine izolata. Svi izolati obrazovali su jednoćelijske, hijalinske konidije limunastog oblika u lancima na plodovima jabuke i V8 podlozi što je karakteristično za vrste roda *Monilinia* spp. (**Wormald, 1954; Byrde and Willetts, 1977; Mordue, 1979a; Mordue 1979b; Mordue 1979c; Batra, 1991; van Leeuwen et al., 2002; Zhu et al., 2005; Petroczy and Palkovics, 2006; Duchoslavova et al., 2007; Pellegrino et al., 2009; Petroczy and Palkovics, 2009; Munda and Viršček Marn, 2010; Šućur, 2010; Hilber-Bodmer et al., 2010; Ondejkova et al., 2010; Zhu and Guo, 2010; Grabke et al., 2011; Hu et al., 2011; Hilber-Bodmer et al., 2012; Poniatowska et al., 2013; Martini et al., 2013; Chen et al., 2013; Martini et al., 2014; Hrutić, 2014; Peter et al., 2015**). Iniciranje sporulacije izolata *M. polystroma*, *M. fructigena* i *M. laxa* poreklom iz Srbije u *in vitro* uslovima obavljeno je na V8 podlozi, jer ove vrste osim *M. fructicola*, ne sporulišu na KDA podlozi, što su opisali i drugi autori (**Byrde and Willetts, 1977; Batra, 1991; OEPP / EPPO 2009**). Utvrđeno je da su sve vrste obrazovale veće konidije na inokulisanim plodovima jabuke nego na V8 podlozi.

Veličina konidija izolata *M. fructigena* obrazovanih u *in vitro* i *in vivo* uslovima bila je veća od izolata *M. polystroma*, *M. fructicola* i *M. laxa* što su uočili i drugi istraživači (van Leeuwen et al., 2002; Petroczy and Palkovics, 2009; Poniatowska et al., 2013).

Prosečna dužina i širina konidija izolata *M. fructigena* sa V8 podloge i plodova jabuke poreklom iz Srbije bila je u skladu sa opisanim veličinama konidija *M. fructigena* (Wormald, 1954; Byrde and Willetts, 1977; Mordue 1979b; Batra, 1991; van Leeuwen et al., 2002; Šućur, 2010; Poniatowska et al., 2013; Hrustić, 2014). Samo je minimalna dužina konidija *M. fructigena* bila je manjih dimenzija u odnosu na literaturno opisane vrednosti za vrstu *M. fructigena* (Wormald, 1954; Byrde and Willetts, 1977; Mordue 1979b; Batra, 1991; van Leeuwen et al., 2002; Šućur, 2010; Poniatowska et al., 2013; Hrustić, 2014).

Prosečna dužina i širina konidija izolata *M. polystroma* sa plodova jabuke je bila u skladu sa literaturnim podacima o veličinama konidija *M. polystroma* (van Leeuwen et al., 2002; Petroczy and Palkovics, 2009; Zhu and Guo, 2010; Hilber-Bodmer et al., 2012; Poniatowska et al., 2013; Martini et al., 2014), dok je prosečna dužina konidija *M. polystroma* sa V8 podloge bila manja u odnosu na opisane veličine konidija ove vrste (van Leeuwen et al., 2002; Petroczy and Palkovics, 2009; Zhu and Guo, 2010; Hilber-Bodmer et al., 2012; Poniatowska et al., 2013; Martini et al., 2014). Međutim, maksimalne i minimalne vrednosti izmerenih dužina i širina konidija odstupale u odnosu na ekstremne vrednosti dužina i širina konidija izmerenih od strane ostalih autora (van Leeuwen et al., 2002; Petroczy and Palkovics, 2009; Zhu and Guo, 2010; Hilber-Bodmer et al., 2012; Poniatowska et al., 2013; Martini et al., 2014).

Prosečna dužina i širina konidija izolata *M. laxa* poreklom iz Srbije, sa plodova jabuke i V8 podloge, odgovarale su literaturnim podacima veličine konidija *M. laxa* (Wormald, 1954; Byrde and Willetts, 1977; Mordue 1979c; Batra, 1991; Šućur, 2010; Hu et al., 2011; Poniatowska et al., 2013; Hrustić, 2014). Takođe, prosečna dužina i širina konidija izolata *M. fructicola*, poreklom iz Srbije, dobijenih sa inokulisanih plodova jabuke i V8 podloge bila je u skladu sa opisanim veličinama konidija *M. fructicola* (Wormald, 1954; Byrde and Willetts, 1977; Mordue, 1979a; Batra, 1991; van Leeuwen et al., 2002; Zhu et al., 2005; Petroczy and Palkovics, 2006; Duchoslavova et al., 2007; Petroczy and Palkovics, 2009; Pellegrino et al.,

2009; Munda and Viršček Marn, 2010; Hilber-Bodmer et al., 2010; Ondejkova et al., 2010; Grabke et al., 2011; Hu et al., 2011; Hilber-Bodmer et al., 2012; Martini et al., 2013; Chen et al., 2013; Poniatowska et al., 2013; Hrustić, 2014; Peter et al., 2015).

Pored dimenzija konidija i način klijanja konidija, broj inicijalnih hifa po konidiji, dužina inicijalnih hifa i udaljenost prvih bočnih grana na inicijalnoj hifi od konidije su morfološke osobine koje se koriste za identifikaciju *Monilinia* vrsta (Mordue, 1979a; Mordue 1979b; Mordue 1979c; van Leeuwen and van Kesteren, 1998; van Leeuwen et al., 2002; OEPP / EPPO, 2009). Konidije *M. fruticola* i *M. laxa* su obrazovale jednu inicijalnu hifu, dok su konidije *M. polystroma* i *M. fructigena* klijale u jednu ili dve inicijalne hife. Ovakva osobina u broju obrazovanih inicijalnih hifa po konidiji je opisana i u drugim istraživanjima (Mordue, 1979a; Mordue 1979b; Mordue 1979c; van Leeuwen and van Kesteren, 1998; van Leeuwen et al., 2002; OEPP / EPPO, 2009). Najduže inicijalne hife obrazovala je *M. fructigena*, zatim *M. polystroma* i *M. fruticola* i najkraće *M. laxa*. Van Leeuwen and van Kesteren (1998) su uočili da *M. laxa* obrazuje najkraće inicijalne hife, a nešto duže *M. fruticola* i *M. fructigena*. Ukupna dužina inicijalnih hifa izolata *M. polystroma* poreklom iz Srbije je bila kraća od japanskih izolata *M. polystroma* (van Leeuwen et al., 2002). Formiranje prvih bočnih grana na inicijalnim hifama bilo je na najvećoj udaljenosti kod *M. fruticola*, zatim kod *M. polystroma*, *M. fructigena* i na najmanjoj udaljenosti kod konidije *M. laxa* što je u saglasnosti sa opisanim dužinama inicijalnih hifa do prvih bočnih grana *M. fruticola*, *M. fructigena* i *M. laxa* (De Cal and Melgarejo, 1999; van Leeuwen and van Kesteren, 1998). Pojedini izolati *M. fructigena*, poreklom iz Srbije, su obrazovali inicijalne hife na udaljenosti kraćoj od 60 µm, što je suprotno od istraživanja De Cal and Melgarejo (1999) da samo izolati *M. laxa* obrazuju prve bočne grane na udaljenosti kraćoj od 60 µm. Do sada nema opisa ovog morfolškog parametra za *M. polystroma*.

M. fructigena, *M. polystroma*, *M. fruticola* i *M. laxa* su obrazovale mikrokonidije u kulturama tri nedelje starosti. Izolati *M. fruticola* poreklom iz Srbije su obrazovali mikrokonidije u obliku sitnih struktura crne boje neravnomerno raspoređenih na površini kultura izolata odgajanih na KDA podlozi. Ovakva osobina obrazovanja mikrokonidijskog stadijuma *M. fruticola* uočena je i u drugim

istraživanjima (Byrde and Willets, 1977; OEPP / EPPO, 2009). Izolati *M. fructigena*, *M. polystroma* i *M. laxa* su obrazovali mikrokonidijski stadijum na V8 podlozi, koji za razliku od *M. fructicola* okularno nije bio vidljiv. Slično, Willetts (1969) je opisao mikrokonidijski stadijum u kulturama izolata *M. fructigena* koji nije bio vidljiv golim okom. Pravljenjem preparata i posmatranjem pod svetlosnim i skening elektronskim mikroskopom nije uočena razlika između četiri vrste u morfologiji mikrokonidijskog stadijuma i veličini mikrokonidija. Mikrokonidije *Monilinia* spp. su bile okruglaste i obrazovale su se na fíjalidama. Pojedinačne ili grupe fíjalida su se formirale direktno ili na mikrokonidioforama na vegetativnim hifama i lancima konidja. Ovakav opis mikrokonidijskog stadijuma *M. fructicola*, *M. laxa* i *M. fructigena* dali su Willetts and Collonge (1969), dok mikrokonidijski stadijum *M. polystroma* do sada nije bio opisan. Prosečna veličina mikrokonidija sve četiri vrste bila je u opsegu veličina mikrokonidija *Monilinia* vrsta u literaturnim podacima (Calavan and Keitt, 1948; Mordue, 1979a; Mordue, 1979c; Byrde and Willetts, 1977; Batra, 1991).

6.4. Ekološke i odgajivačke osobine *Monilinia* spp.

Ispitivanjem uticaja različitih svetlosnih režima na porast kolonija *Monilinia* spp. utvrđeno je da su svi ispitivani izolati podjednako dobro rasli pri svetlosnom režimu konstantne tame i veštačke smene svetla i tame (12 h svetlo / 12 h tama). Najmanji porast i inhibitorno delovanje na porast kolonija svih izolata *Monilinia* spp. uočeno je pri svetlosnom režimu 12 h UV svetlo / 12 h tama. Slično, De Cal and Melgarejo (1999) su zabeležili inhibitorno delovanje svetlosnog režima 16 h UV svetlo / 8 h tama na porast kolonija izolata *M. fructigena*, *M. fructicola* i *M. laxa*. Jedino najsporije rastući izolat MFSRB-6 vrste *M. fructigena* nije ispoljio razliku u prosečnom dnevnom porastu u različitim svetlosnim režimima. Samo su izolati *M. fructicola* sporulisali u svim svetlosnim režimima. U različitim svetlosnim režimima kolonije *M. polystroma*, *M. fructicola* i *M. laxa* nisu ispoljile variranje u morfološkim osobinama, dok su u uslovima tame pojedini izolati *M. fructigena* u kulturi obrazovali stromatične tvorevine.

Porast kolonija sve četiri vrste je ispoljen u temperaturnom opsegu od 5-30°C, dok je optimalna temperatura za porast bila 25°C. Byrde and Willetts (1977), Šućur (2010), Hrustić (2014) i Papavasileiou et al. (2015) su takođe zabeležili 25°C kao

optimalnu temperaturu za porast *M. fructigena*, *M. laxa* i *M. fructicola*. U ovim istraživanjima je utvrđeno da se *M. polystroma* na osnovu ove ekološke osobine ne razlikuje od ostalih *Monilinia* vrsta. Izolati *Monilinia* spp. su ispoljili dobar porast i pri 20°C. **Boesewinkel and Corbin (1970)** navode da se razvoj *M. fructigena* i *M. laxa* odvija u intervalu od 5-25°C, sa optimumom od 20°C. Najsporije rastući izolat MFSBR-6 *M. fructigena* se izdvojio po ujednačenom porastu kolonije pri temperaturama od 15-30°C. Kolonije sve četiri vrste nisu rasle pri 35°C što se i navodi kao temperatura na kojoj nema razvoja kolonija *M. fructigena*, *M. laxa* i *M. fructicola* (**Byrde and Willetts, 1977**).

Izolati *M. fructigena*, *M. fructicola*, *M. laxa* i *M. polystroma* su obrazovali kolonije na svim hranljivim podlogama. Najbrži porast kolonija *Monilinia* spp. zabeležen je na V8 i KDA podlogama. Slično, **Hu et al. (2011)** su zabeležili brz porast kolonija kineskih izolata *M. fructigena*, *M. fructicola* i *M. laxa* na V8 i KDA podlogama, dok je **Hrustić (2014)** utvrdila da *M. fructicola* najbrže raste na KDA podlozi, a *M. laxa* i *M. fructigena* na MEA podlozi. U Srbiji je i **Šućur (2010)** uočila da većina izolata *M. fructigena* poreklom iz jabučastog i koštičavog voća ima bolji razvoj na KDA podlozi, ali i podlozi od ovsa i jabuke sa ekstraktom kvasca, dok izolati *M. laxa* na podlozi od šargarepe. Izolati *M. fructigena*, *M. polystroma* i *M. laxa* su jedino sporulisali na V8 podlozi, dok su izolati *M. fructicola* obilno sporulisali na KDA i V8 podlozi, zatim na MEA, a slabije na CYA i AJA podlogama. Sposobnost sporulacije *M. fructicola* na različitim hranljivim podlogama zabežio je **Batra (1991)**. **Hu et al. (2011)** nisu uspeali da iniciraju sporulaciju *M. fructigena*, *M. polystroma* i *M. laxa* na V8 podlozi, dok je *M. fructicola* obilno sporulisala. Na KDA, MEA i V8 podlogama svi ispitivani izolati su obrazovali kompaktnu miceliju, dok su na AJA i CYA podlogama kolonije bile slabije razvijene. Značajno variranje u morfološkim osobinama ispoljili su izolati *M. laxa* koji na AJA, CYA i V8 podlogama nisu obrazovali karakteristične kolonije izgleda rozete, što je opisano i kod izolata *M. laxa*, poreklom iz koštičavog voća, na CYA, V8 i podlozi od vodenog agara (**Hrustić, 2014**).

U ispitivanju uticaja kiselosti hranljive podloge, utvrđeno je da *M. fructigena* najbrže raste pri pH 3 i 4. Najsporije rastući izolat *M. fructigena* je ujednačeno rastao na podlogama čija je pH iznosila od 3 do 6. Kiselu sredinu kao optimalnu za porast izolata *M. fructigena* su zabeležili i **Byrde and Willetts (1977)**, **Holb (2004b)** i **Hrustić**

(2014). Izolati *M. polystroma* su ispoljili najbrži porast pri pH vrednostima podloge od 3 do 6. **Holb (2004b)** je takođe uočio i da izolati *M. polystroma* brže rastu u kiseloj sredini pri pH vrednosti podloge od 4,5. Izolati *M. fructicola* su ispoljili najbrži porast pri pH vrednostima podloge od 6 do 8, dok **Hrustić (2014)** navodi slabo kiselu sredinu kao optimalnu za porast izolata *M. fructicola*. Izolati *M. laxa* su najbrže rasli pri pH vrednosti od 5 do 8, dok je **Hrustić (2014)** zabeležila da su pri pH vrednosti podloge od 7 izolati *M. laxa* najbrže rasli. Izolati *M. fructicola* su dobro sporulisali pri svim pH vrednostima, a najintenzivnije pri pH 7 i pH 8. Izolati *M. fructicola* i *M. laxa* su ispoljili variranje u ispoljenim morfološkim osobinama pri različitim pH vrednostima podloge. Pri pH 3 i pH 4 podloge izolati *M. laxa* nisu obrazovali kolonije karakterističnog izgleda rozete, dok izolati *M. fructicola* su obrazovali tamno sive kolonije sa oskudnom sporulacijom. Variranje u morfološkim osobinama kolonija *M. laxa* i *M. fructigena* je uočila i **Hrustić (2014)**, gde izolati *M. laxa* pri pH vrednostima podloge od 3, 4 i 9 nisu obrazovali karakteristične kolonije izgleda rozete, a izolati *M. fructigena* pri pH vrednostima 3 i 4 kolonije sivkaste boje i režnjevito oboda.

6.5. Patogene osobine *Monilinia* spp.

Na inokulisanim plodovima jabuke sorte Ajdared, Zlatni Delišeš i Greni Smit svi ispitivani izolati su izazvali pojavu tipičnih simptoma smeđe truleži. Posle mesec dana inkubacije na površini zaraženog tkiva plodova inokulisanih izolatima *M. polystroma*, obrazovan je dobro razvijen stromatični sloj, što su uočili i **van Leeuwen et al. (2002)** na plodovima jabuke inokulisanim izolatima *M. polystroma* poreklom iz Japana.

M. fructigena je bila najvirulentnija na plodovima sve tri sorte jabuke. Virulentnost ostalih vrsta je varirala. Na plodovima jabuke sorte Ajdared i Zlatni Delišeš *M. laxa* je bila srednje virulentna, a *M. fructicola* slabo virulentna. *M. polystroma* je na plodovima jabuke sorte Zlatni Delišeš bila jako virulentna, na plodovima sorte Ajdared jako i srednje virulentna. Na plodovima sorte Greni Smit nije bilo razlike u virulentnosti između *M. polystroma*, *M. laxa* i *M. fructicola*. O poređenju virulentnosti *M. fructigena*, *M. polystroma*, *M. fructicola* i *M. laxa* na inokulisanim plodovima jabuke nema puno podataka. **Van Leeuwen et al. (2002)** su poređenjem virulentnosti izolata *M. polystroma* poreklom iz Japana i evropskih izolata *M. fructigena*, dobijenih iz različitih voćnih vrsta pokazali da ne postoji značajna razlika u

njihovoj virulentnosti na inokulisanim plodovima jabuke sorte Cox's Orange Pipin i sortama kruške Conference i Doyenne de Comice. **Munoz et al. (2008)** su utvrdili da su izolati *M. fructigena*, poreklom iz Španije, bili virulentniji od izolata *M. laxa* na inokulisanim plodovima jabuka sorte Zlatni Delišeš. U ovim istraživanjima je utvrđeno i da su sve ispitivane vrste bile virulentnije na plodovima sorte Zlatni Delišeš u odnosu na plodove sorti Ajdared i Greni Smit. Prema **Byrde and Willetts (1977)** pH vrednost tkiva može da utiče na infekciju i kolonizaciju patogena, što može biti razlog različite virulentnosti vrsta na različitim sortama jabuke. **Holb and Chauhan (2004)** su dokazali da glukoza, saharoza i fruktoza deluju stimulativno na porast micelije *M. fructigena* i *M. polystroma* u hranljivim podlogama, tako da šećeri akumulirani u tkivu domaćina možda mogu da obezbede povoljne uslove za infekciju i kolonizaciju patogenom.

Histopatološkim ispitivanjima plodova jabuke sorte Ajdared zaraženim *M. fructigena* i *M. polystroma* praćena je stromatizacija biljnog tkiva. Posle mesec dana inkubacije *M. polystroma* je obrazovala mnogo kompaktniji stromatični sloj od *M. fructigena* koji je probijao kutikulu i razvijao se na površini zaraženog tkiva (ektostroma). Ektostroma je bila sačinjena od gusto isprepletanih hifa gljive (medula) i spoljašnjeg sloja gusto isprepletanih hifa sa melaniziranim zidovima (rind). **Willetts (1968)** takođe opisuje da izolati *Monilinia* spp. mogu da obrazuju rind na hifalnom omotaču na površini zaraženog tkiva, dok **Batra (1991)** smatra da vrste iz sekcije *Juntoriae*, a kojoj pripada i *M. polystroma*, ne obrazuju rind kao sastavni element ektostrome. *M. fructigena* je takođe obrazovala ektostromu, ali građenu samo od medule što odgovara opisu stroma *M. fructigena* (**Batra, 1991**). Pored vidljivih razlika u građi ektostrome između *M. fructigena* i *M. polystroma*, uočene su razlike u stromatičnom sloju unutar biljnog tkiva (entostroma). Entostroma je bila formirana u plodovima zaraženim *M. polystroma* u vidu isprekidanog sloja prozenhimskih ćelija, ali nije bila diferencirana kod plodova zaraženih *M. fructigena*.

Posle četiri meseca inkubacije, uočeno je povećanje stroma na presecima plodova zaraženih *M. fructigena* i *M. polystroma*. Ektostroma je postala deblja posebno kod *M. polystroma* koja izazvala i deformaciju biljnog tkiva. Kod *M. polystroma* granica između ektostrome i entostrome bila je teško uočljiva. *M. fructigena* je posle četiri meseca inkubacije, formirala entostromu, ali ona nije bila izdiferencirana kao što je opisuje **Batra (1991)**.

Jedna od diferencijalnih karakteristika između *M. polystroma* i *M. fructigena* bilo je intenzivno obrazovanje melanina u stromi *M. polystroma*. **Henson (1999)** je definisao melanine kao tamne pigmentisane polimere koji štite organizme prilikom delovanja nepovoljnih faktora, ali i da imaju ulogu u hidrofobnosti, anastomozi i da utiču na propustljivost ćelijskog zida. **Rehnstrom and Free (1996)** su dokazali da melanini kod izolata *M. fructicola* obezbeđuje zaštitu prilikom nepovoljnih faktora kao što su visoke temperature, isušivanje, UV svetlost i delovanje hidrolitičkih enzima. Sprečavanje brze razgradnje zaraženih plodova, može da obezbedi preživljavanja gljive i povećanja primarnog inokuluma u sledećoj sezoni (**Byrde and Willetts, 1977**). Smatra se da i polisaharidi, koji se nalaze na površini hifa omogućavaju bolje povezivanje hifa i na taj način daju čvrstinu i konzistenciju stromatičnom sloju (**Byrde and Willetts, 1977**). Moguće je da se uočena razlika u strukturi stroma ove dve vrste odražava i na sposobnost uspešnijeg održavanja i preživljavanja *M. polystroma* na zaraženim plodovima jabuke.

6.6. Molekularne osobine *Monilinia* spp.

U ispitivanjima specifičnosti različitih prajmera za detekciju *Monillinia* vrsta utvrđeno je da samo prajmeri od strane **Cote et al. (2004)** omogućavaju pouzdanu molekularnu detekciju i identifikaciju sve četiri vrste roda *Monilinia* spp. Prajmeri specifični za *M. fructigena* dizajnirani od strane **Ioos and Frey (2000)** i **Hughes et al. (2000)** u ovim istraživanjima su amplifikovali pored izolata *M. fructigena* i izolate *M. polystroma*, iako ih **OEPP / EPPO (2009)** navode kao specifične za molekularnu detekciju *M. fructigena*, koji ne amplifikuju *M. polystroma*. **Ioos and Frey (2000)** i **Hughes et al. (2000)** su dizajnirali prajmere na osnovu sekvenci ITS rDNA regiona pre opisa *M. polystroma* kao nove vrste (**van Leeuwen et al., 2002**), koja se od *M. fructigena* razlikuje u pet nukleotida. **Hu et al. (2011)** su takođe pokazali da prajmeri specifični za *M. fructigena* dizajnirani od strane **Ioos and Frey (2000)** mogu da amplifikuju *M. yunnanensis*, koja je na osnovu molekularnih osobina ITS rDNK veoma slična *M. fructigena* i *M. polystroma*.

Sekvence ITS rDNK regiona 19 izolata *Monilinia* spp. su analizirane u cilju identifikacije vrsta, filogenetske analize i razvijanja PCR-RFLP metode. Dobijene sekvence izolata *M. fructigena*, *M. polystroma*, *M. laxa* i *M. fructicola* su bile identične

sa deponovanim sekvencama iste vrste u GenBank bazi podataka čime je potvrđena njihova identifikacija. **Poniatowska et al. (2013)** i **Hrustić (2014)** su takođe na osnovu sekvenci ITS rDNK regiona izvršili molekularnu identifikaciju kojom je potvrđen identitet vrsta. Međusobnim poređenjem dobijenih sekvenci nije uočena varijabilnost u ITS rDNK regionu između izolata iste vrste, što su uočili i **Hu et al. (2011)** kod izolata *Monilinia* spp. poreklom iz Kine, dok je razlika u jednom nukleotidu sekvenci ovog regiona uočeno kod pojedinih izolata *M. laxa* (**Petroczy et al., 2012; Hrutić, 2014**) i *M. fructicola* (**Petroczy et al., 2012**).

Poteškoće korišćenjem konvencionalnih metoda identifikacije vrsta ovog roda, kao i nedovoljna pouzdanost pojedinih PCR metoda ukazale su potrebu za razvojem pouzdanijih metoda njihove molekularne identifikacije. Imajući u vidu da samo prajmeri dizajnirani od strane **Cote et al. (2004)** omogućavaju pouzdanu molekularnu identifikaciju *M. polystroma* u ovom istraživanju je po prvi put ispitana primena PCR-RFLP metode za molekularnu identifikaciju *M. polystroma*. Virtuelnom RFLP analizom dobijenih sekvenci i sekvenci ITS rDNK regiona deponovanih u GenBank bazi podataka sa *HhaI* enzimom utvrđeno je prisustvo tri restrikciona mesta kod *M. polystroma* i dva restrikciona mesta za ovaj enzim kod *M. fructigena*, *M. laxa* i *M. fructicola*. Dve sekvence *M. fructigena* iz GenBank baze podataka (AB70882 i FJ51891) su imale tri restrikciona mesta i bile su identične sa ostalim sekvencama *M. polystroma* deponovanim u GenBank bazi podataka, što upućuje da su verovatno ove sekvence deponovane pod pogrešnim imenom gljive. Digestijom ITS1 / ITS4 PCR produkata restrikcionim enzimom *HhaI* dobijeni su međusobno identični elektroforetski profili kod izolata *M. polystroma*, a koji su se jasno razlikovali od profila *M. fructigena*, *M. fructicola* i *M. laxa*. **Snyder and Jones (1999)** su na osnovu ovog regiona razvili PCR-RFLP metodu korišćenjem *MseI* restrikcionog enzima koja omogućava razdvajanje *M. fructicola* i *M. laxa*.

Filogenetska analiza dela ITS rDNK regiona *Monilinia* spp. pokazala je da svaka vrsta formira stabilnu granu sa visokim bootstrap brojem. Takođe, potvrđena je i filogenetska bliskost između *M. fructigena* i *M. polystroma*. Izolati četiri vrste analizirani u ovom radu su se grupisali sa ostalim izolatima iste vrste poreklom iz različitih zemalja, što je u saglasnosti sa njihovom identifikacijom. Filogenetski međuodnos *Monilinia* vrsta na osnovu ITS genomnog regiona je ispitivan i u drugim

istraživanjima (Hu et al., 2011; Poniatowska et al., 2013; Hrutić, 2014). Hu et al. (2011) su na osnovu ITS rDNK regiona razdvojili vrste roda *Monilinia*, ali su i pokazali da za filogeniju vrsta ovog roda ovaj region nije dovoljno informativan. Poniatowska et al. (2013) su na osnovu filogenetske analize ITS rDNK regiona dobili razdvajanje sekvenci u dva klastera koja se dele u dve podgrupe. *M. fructigena* i *M. polystroma* su se razdvojile u okviru prvog klastera, a *M. laxa* i *M. fructicola* u okviru drugog klastera. Takođe, i Hrutić (2014) je pokazala slično razdvajanje ove četiri vrste.

6.7. Zastupljenost *Monilinia* spp. u voćnjacima i skladištima jabuke u Srbiji

U toku trogodišnjeg istraživanja od 2010. do 2012. godine praćena je geografska rasprostranjenost *Monilinia* spp. na plodovima jabuke u Srbiji. *M. fructigena* je utvrđena kao dominantni prouzrokovatelj smeđe truleži plodova jabuke pre i posle berbe u Srbiji. *M. fructigena* je utvrđena u 76,98% uzoraka u voćnjacima, dok je skladištima utvrđena u 77,58% uzoraka. *M. fructigena* kao najznačajniji prouzrokovatelj smeđe truleži plodova jabuke je utvrđena i drugim istraživanjima (Byrde and Willetts, 1977; van Leeuwen et al., 2000; Holb and Sherm, 2007). Tokom ovih istraživanja prvi put su u Srbiji identifikovane *M. fructicola* i *M. polystroma* kao paraziti plodova jabuke u voćnjacima i skladištima u Srbiji. Takođe, potvrđen je nalaz od strane Vučković i Babović (1997) i Ivanović i Ivanović (2001) da *M. laxa* može da parazitira plodove jabuke u Srbiji. Ipak, *M. fructicola* i *M. laxa* su utvrđene samo sporadično kao prouzrokovatelji smeđe truleži plodova jabuke u Srbiji. Generalno, *M. fructicola* i *M. laxa* su vrste koje su do sada opisane kao značajni prouzrokovatelji sušenja cvetova, grančica i truleži plodova na koštičavom voću, ugrožavajući samo sporadično proizvodnju jabučastog voća u svetu (Wormald, 1954; Byrde and Willetts, 1977; Batra, 1991), pa je njihova trenutna mala zastupljenost na plodovima jabuke u Srbiji u skladu sa podacima iz sveta. *M. fructicola* je vrsta koja je introdukovana u Evropu i nalazi se na Karantinskoj listi štetnih organizama za Evropu (Baker, 2011). *M. fructicola* je opisana kao prouzrokovatelj truleži plodova jabuke u Nemačkoj (Grabke et al., 2010), Češkoj (Duchoslavova et al., 2007) i Italiji (Martini et al., 2014), ali bez podataka rasprostranjenosti ove vrste i gubitaka u prinosu jabuke. Iako je i na plodovima jabuke u Srbiji utvrđeno da *M. fructicola* samo sporadično prouzrokuje smeđu trulež i dalje postoji značajan oprez, imajući u vidu njenu sposobnost da prouzrokuje latentne infekcije (Michailides, 2007) i obilnije

sporuliše (Villarino et al., 2010). Utvrđeno je i da *M. fructicola* ima sposobnost da stvara polni stadijum koji može biti značajan u epidemiologiji ovog patogena (Hong and Michailides, 1998). Takođe, njena prilagodljivost višim temperaturama (Papavasileiou et al., 2015), imajući u vidu globalno otopljanje naše planete, može da predstavlja opasnost u voćarskoj proizvodnji.

M. polystroma utvrđena je na plodovima jabuke u Mađarskoj (Petroczy and Palkovics, 2009), Češkoj (OEPP / EPPO, 2011), Poljskoj (Poniatowska et al., 2013), Italiji (Martini et al., 2014) i Hrvatskoj (Di Francesco et al., 2015). Sva saopštenja o prisustvu *M. polystroma* se odnose na sporadičnu pojavu ovog parazita, dok o njenoj većoj zastupljenosti nema podataka. U lokalitetu Bela Crkva *M. polystroma* bila je u 2011. godini zastupljena u većem broju uzoraka (62,07%) u poređenju sa *M. fructigena* (33,93%). Veća zastupljenost *M. polystroma* (69,45%) u odnosu na *M. fructigena* (30,55%) uočena je i tokom 2012. godine. Na ovom lokalitetu prisustvo *M. fructicola* i *M. laxa* nije utvrđeno. Takođe, prema literaturnim podacima *M. polystroma* nije opisana do sada kao prouzrokovatelj truleži plodova jabuke posle berbe. O zastupljenosti vrsta roda *Monilinia* u kompleksnim patosistemima, gde je prisutno više od jedne vrste ovog roda postoje istraživanja koja se odnose na zasade koštičavih voćaka (Michailidis, 1987; Villarino et al., 2013; Papavasileiou et al., 2015). Tako je u SAD utvrđeno povećanje zastupljenosti *M. fructicola* u odnosu na *M. laxa* (Michailides, 1987). Do sličnih zapažanja u zasadima koštičavih voćaka u Evropi došli su i istraživači u Španiji (Villarino et al., 2013) i Grčkoj (Papavasileiou et al., 2015). *M. fructigena* je utvrđena kao prevalentna vrsta na kajsiji, breskvi i šljivi u poređenju sa *M. laxa*, dok su *M. fructicola* i *M. polystroma* bile zastupljene u veoma malom procentu u voćnjacima u Poljskoj (Poniatowska et al., 2013). Sa druge strane, Papavasileiou et al. (2015) su utvrdili prevalentnost *M. laxa*, kao patogena sušenja cvetova i grančica, dok je *M. fructicola* bila prevalentniji patogen plodova većine ispitivanih domaćina u Grčkoj. Ovi istraživači su pretpostavili da se *M. laxa* bolje adaptira nižim temperaturama naročito u periodu cvetanja, dok je *M. fructicola* prilagodljivija višim temperaturama naročito u periodu berbe.

O mogućoj opasnosti od širenja *M. polystroma* postoje samo sporadični podaci. *M. polystroma* je na osnovu morfoloških, molekularnih i patogenih osobina veoma slična *M. fructigena* što je čini potencijalno opisanim, jer je *M. fructigena* karantinska

vrsta za Severnu Ameriku i Australiju, a i u Evropi pričinjava značajne štete u voćarskoj proizvodnji. **Van Leeuwen et al. (2002)** kao i rezultati ove disertacije su pokazali intenzivnu stromatizaciju biljnog tkiva ploda jabuke inokulisanih *M. polystroma* zbog čega ova vrsta može da ima bolju sposobnost preživljavanja u prirodi, a time i bolju sposobnost stvaranja primarnog inokuluma.

6.8. Antifungalno dejstvo etarskih ulja

Od 14 etarskih ulja, na osnovu ispoljenog antifungalnog dejstva prema *M. fructigena*, izdvojila su se etarska ulja pitome nane, timijana i geranijuma, koja su detaljnije ispitivana u uslovima *in vitro* i *in vivo*. Etarska ulja timijana, geranijuma i pitome nane ispoljila su jako inhibitorno dejstvo kontaktnom i fumigantnom primenom u *in vitro* uslovima na porast micelije i klijanje konidija *M. fructigena*. U istraživanjima drugih autora utvrđeno je antifungalno delovanje etarskog ulja timijana (**Dafferera et al., 2003; Pina-Vaz et al., 2004**), nane (**Sellamuthu et al., 2013**) i geranijuma (**Radulović et al., 2011; Boukhatem et al., 2013**). Etarska ulja timijana i geranijuma primenjena u istoj zapremini imale su istu MIC na porast micelije, dok je etarsko ulje pitome nane ispoljilo nešto slabije kontaktno delovanje. U *in vitro* uslovima klijanje konidija bilo je osetljivije od porasta micelije na delovanje fumigantne i kontaktne faze timijana i fumigantne faze geranijuma i pitome nane. Do sličnih zapažanja su došli **Berrera-Nesha et al. (2008)** u ispitivanju antifungalnog delovanja etarskih ulja na klijanje konidija i porast kolonija *C. gloeosporoides* i **Duduk et al. (2015)** na klijanje konidija i porast kolonija *C. acutatum*.

Pored ispitivanja etarskih ulja u *in vitro* uslovima istraživano je kontaktno i fumigantno delovanje etarskih ulja *in vivo*. Sva ulja su ispoljila antifungalno delovanje kontaktnom i fumigantnom fazom, ali ipak u mnogo višim koncentracijama nego u *in vitro* uslovima, što su uočili i drugi autori (**Feng et al., 2011; Phillips et al., 2012; Duduk et al., 2015**).

Ispitivanjima kontaktnog delovanja ulja dokazano je da sva ulja imaju jače dejstvo primenjena kurativno, nego protektivno, pri čemu je etarsko ulje timijana ispoljilo najjače inhibitorno delovanje. Takođe, ispitivanjima dva različita načina aplikacije dokazano je jače antifungalno delovanje potapanjem plodova nego nanošenjem emulzija samo na mesto povrede. Različiti načini primene kontaktne faze

etarskih ulja, kao što su prskanje ili potapanje su primenjivani u kontroli oboljenja plodova višnje, citrusa, jabuke, breskve i kupusa (**Tiwari et al., 1998; Smid et al., 1994; Dixit et al., 1995, loc. cit. Sivakumar and Bautista-Banos, 2014**). O potencijalu delovanja kontaktne faze etarskih ukazuje i istraživanje od strane **Lopez-Reyes et al. (2010)** kojim je dokazano da su etarska ulja timijana, *Satureja montana* i origana u koncentraciji od 1% ispoljili značajno inhibitorno delovanje na razvoj oboljenja veštački inokulisanih plodova jabuke gljivama *P. expansum* i *B. cinerea*. Slično, **Lopez-Reyes et al. (2013)** su uočili da etarska ulja origana, timijana i *Satureya hortensis* ispoljavaju izraženo antifungalnog dejstvo prema *M. laxa* i *B. cinerea* na plodovima kajsije i šljive.

Fumigantnom primenom, etarska ulja timijana i geranijuma su u koncentraciji 0,1% ispoljila jače antifungalno delovanje od kontaktne faze, dok je kontaktna primena etarskog ulja pitome nane bila efikasnija od fumigantne faze u istoj koncentraciji. Takođe, uočeno je da etarska ulja primenjena u koncentraciji od 0,01% po zapremini vazduha nisu ispoljila antifungalno delovanje. **Laird and Phillips (2011)** navode da su prednosti fumigantne primene etarskih ulja u poređenju sa kontaktnom primenom veća efikasnost, a time i primena u nižim koncentracijama.

Organoleptička svojstva plodova jabuke nakon tretmana etarskim uljima bila su promenjena. Jedini tretman koji nije promenio organoleptičke osobine plodova bilo je uljem geranijuma primenjenim fumigantno u koncentraciji 0,1%. Isparljivi sastojci timijana izazvali su fitotoksični efekat na plodovima jabuke i smanjili su značajno aromu plodova. Prema **Mari and Guizzardi (1998)** fumigacija plodova višnje timolom utiče da takvi plodovi nemaju komercijalnu upotrebu. Sa druge strane, **Martinez-Romero et al. (2005)** su uočili da na grožđu i višnjama koji su tretirani parama timola nema promena organoleptičkih osobina plodova, kao i u navodima **Lopez-Reyes et al. (2010)**. Slično kao i etarsko ulje timijana, etarsko ulje pitome nane primenjeno kontaktno i fumigantno je uticalo na pogoršanje organoleptičkih osobina plodova jabuke u ovim istraživanjima. Međutim, **Martinez-Romero et al. (2005)** su uočili da mentol, najzastupljenija komponenta etarskog ulja pitome nane, nema uticaja na organoleptičke osobine plodova grožđa i višnje. Iako tretman etarskim uljem geranijuma primenjen fumigantno nije promenio organoleptičke osobine plodova primenjen kontaktno uticao je na smanjenje opšte prihvatljivosti. Jedini tretman koji nije promenio organoleptičke osobine plodova bilo je etarskim uljem geranijuma primenjenim fumigantno, dok je

primenjeno kontaktno uticalo na smanjenje opše prihvatljivosti plodova. Prevazilaženje promene organoleptičkih svojstava plodova postiže se fumigantnom primenom etarskih ulja (**Antunes and Cavaco, 2010; Laird and Phillips, 2011**).

Antifungalno delovanje etarskih ulja vezuje se za uglavnom za aktivnost dominantnih sastojaka (**Mari and Guizzardi, 1998**), mada i manje zastupljeni sastojci ulja mogu učestvovati sinergistički **Marino et al., (2001)**. Hemijskom analizom utvrđeno je da su najzastupljenije sastojci etarskog ulja timijana bili timol (32,3%) i *p*-cimen (31,7%), što su zabeležili i **Pina-Vaz et al., (2004)** za etarsko ulje timijana iste vrste. Jak antifungalni potencijal timola je utvrđen i u drugim istraživanjima (**Kurita et al., 1981; Muller-Riebau et al., 1995; Tsao and Zhou, 2000**). Takođe, antifungalno delovanje je utvrđeno i za *p*-cimen, kao i sinergistički efekat antifungalnog delovanja timola i *p*-cimen (Pina-Vaz et al., 2004). I drugi manje zastupljeni sastojci etarskog ulja timijana - karvakrol, terpinen, linalol, borneol, kamfor, terpinol i kamfen poseduju antimikrobno dejstvo (**Griffin et al., 1999**). Iako je karvakrol zastupljen u malom procentu, njegovo jako antimikrobno delovanje je dokazano (**Kurita et al., 1981; Muller-Riebau et al., 1995; Griffin et al., 1999; Tsao and Zhou, 2000**). Najzastupljeniji sastojci etarskog ulja geranijuma su bili citronelol (34%) i geraniol (16,8%), dok su manje zastupljeni sastojci bili citronelil-formijat, linalol i izo-menton. **Tanović et al. (2009)** su takođe utvrdili u etarskom ulju geranijuma (*P. graveolens*) visok sadržaj citronelola, geraniola, linalola i citronelil-formijata. Sličan hemijski sastav etarskog ulja geranijuma (*P. graveolens*) opisali su i **Boukhatem et al. (2013)**, kod koga je citronelol bila najzastupljenija komponenta, zatim citronelil-formijat. U ovom etarskom ulju geraniol je bio manje zastupljen u odnosu na sadržaj geraniola u etarskom ulju testiranom na *M. fructigena*. Antimikrobno delovanje citronelola uočeno je i u drugim istraživanjima (**Griffin et al., 1999; Tsao and Zhou, 2000; Kishore et al., 2007**), dok su antifungalno delovanje geraniola na *Candida albicans* dokazali **Griffin et al. (1999)**. Antibakterijsko, pesticidno i antioksidativno dejstvo etarskog ulja geranijuma se vezuje za oksigenovane monoterpe, najčešće citronelol, geraniol, izo-menton, linalol, citronelil-formijat i geranil-formijat (**Babu and Kaul, 2005; Bouzenna and Krichen, 2012**), ali i za menton i linalol (**Griffin et al., 1999; Marković, 2011**). Najzastupljeniji sastojci u etarskom ulju pitome nane bili su mentol (48,2%) i menton (25,6%), dok su manje zastupljeni bili mentofuran, izomentil-acetat i limonen. Visok

sadržaj mentola (46,25%) i mentona (21,69%) u etarskom ulju pitome nane su zabeležili **Sellamuthu et al. (2013)** koji su u etarskom ulju pitome nane utvrdili i visok sadržaj izomentona (14,5%), sastojka koji je u ispitivanom etarskom ulju pitome nane korišćenom u ovim istraživanjima bio zastupljen samo u tragovima. Jako antimikrobno delovanje delovanje mentola uočili su i **Griffin et al. (1999)** i **Tsao and Zhou (2000)**, a mentona **Griffin et al. (1999)**. Od manje zastupljenih sastojaka u etarskom ulju pitome nane bio je i limonen čije antifungalno delovanje opisuju **Kishore et al. (2007)**.

6.9. Antifungalno delovanje isparljivih sastojaka tkiva biljaka familije *Brassicaceae*

Isparljivi sastojci hidrolize sedam odomaćenih sorti kupusnjača, koje se široko koriste u našoj zemlji, ispoljili su inhibitorno dejstvo na porast micelije četiri *Monilinia* vrste i pet vrsta gljiva, prouzrokovaca propadanja plodova jabuke. Pod uticajem isparljivih sastojaka biljaka familije *Brassicaceae* klijanje konidija *Monilinia* spp. bilo je smanjeno ili potpuno inhibirano, dok je dužina inicijalnih hifa kod proklijalih konidija bila jako redukovana. Kod ostalih ispitivanih vrsta gljiva, isparljivi sastojci testiranih *Brassicaceae* su na klijanje konidija i izduživanje inicijalnih hifa ispoljile različito dejstvo: inhibitorno, stimulatивно ili su bile bez dejstva. Najjače inhibitorno dejstvo na porast micelije ispoljili su isparljivi sastojci kupusa, karfiola i brokolija. Klijanje konidija najjače su inhibirali sastojci karfiola, slačice i kupusa, a izduživanje inicijalnih hifa sastojci slačice, kupusa, bele i crne rotkve.

Biološki najaktivniji isparljivi sastojci *Brassicaceae* su izotiocijanati, koji se oslobađaju hidrolitičkom razgradnjom glukozinolata pod uticajem enzima mirozinaze. Količina i sastav glukozinolata varira u biljkama zavisno od fenofaze razvoja, biljnog dela i uslova životne sredine (**Abdel-Farid et al., 2006**). U cilju ostvarivanja najvećeg prinosa glukozinolata, biljni materijal kupusnjača pripremljen je prolećnom setvom i sakupljen 15 dana posle setve (**Rosa et al., 1996; Smolinska and Horbowicz, 1999**). Odmah nakon žetve nadzemni delovi biljaka su zamrznuti u tečnom azotu i čuvani na -80°C do liofilizacije, da bi se sadržaj glukozinolata sačuvao u biljnom tkivu i sprečilo njihovo razlaganje. Ovakav način pripreme korišćen je od strane i drugih autora (**Kirkegaard et al., 1996; Fan et al., 2008**). Međutim, hemijska analiza isparljivih sastojaka autolizata biljnog tkiva *Brassicaceae* korišćenih u ovim istraživanjima

pokazala je da su najveći broj jedinjenja derivati masnih kiselina i da su izotiocijanati prisutni u niskom sadržaju. Visok sadržaj (*E*)-4-metiltio-3-butenil-izotiocijanata utvrđen je samo u biljnom materijalu bele rotkve. U uzorcima čuvanim pri -80°C, kao i liofilizovanim uzorcima biljnog tkiva utvrđen je nizak sadržaj derivata glukozinolata, tako da njihova niska koncentracija u liofilizovanom biljnom materijala nije bila posledica razgradnje prilikom čuvanja.

Utvrđena je povezanost sastava autolizata sa jačinom njihovog inhibitornog delovanja, kao i izdvajanje pojedinačnih sastojaka potencijalno odgovornih za ovo antifungalno dejstvo. Na osnovu ispoljenog inhibitornog dejstva na porast micelije izdvojile su se tri grupe metabolita ispitivanih *Brassicaceae*. Prva grupa sa visokim sadržajem izomera neofitadiena, oktanske kiseline, (*E*)-fitola i limonena, prisutnih u uzorcima kupusa, karfiola i brokolija, ispoljila je značajno antifungalno dejstvo na porast micelije većine ispitivanih fitopatogenih gljiva. U istraživanjima **Peres et al. (2012)** neofitadien je identifikovan kao jedna od glavnih komponenti ekstrakata *Laurencia dendroidea* sa ispoljenim antifungalnim dejstvom prema *C. lagenarium*. **Marongiu et al. (2013)** su uočili da je antifungalno dejstvo isparljivih sastojaka *Apium graveolens* L. bilo u korelaciji sa sadržajem i koncentracijom neofitadiena. Takođe, neofitadien i fitol su jedni od glavnih sastojaka ekstrakata lišća *Cardiospermum halicacabum* koje je ispoljilo antimikrobno delovanje (**Jeyadevi et al., 2013**). Za fitol je utvrđeno da poseduje antimikrobno delovanje prema humanim patogenima (**Pejin et al., 2014; Ghaneian et al., 2015**), koje se zbog svoje stabilnosti i slabe toksičnosti prema ljudima može koristiti kao sredstvo za površinsku dezinfekciju (**Ghaneian et al., 2015**). Limonen je opisan kao glavni sastojak etarskog ulja *Citrus recundita* sa ispoljenim antifungalnim dejstvom prema biljnim patogenima (**Chutia et al., 2009**), dok su **Oh et al. (1993)** i **Marei et al. (2012)** pokazali jako antifungalno dejstvo limonena na porast micelije *Rhizoctonia solani*, *F. oxysporum*, *P. digitatum* i *A. niger*. Inhibicija porasta micelije pod uticajem oktanske kiseline utvrđena je prema *A. solani*, *C. lagenarium* i *F. oxysporum* (**Liu et al., 2008**).

Druga grupa isparljivih komponenti ispitivanih biljaka familije *Brassicaceae* koja se izdvojila visokim sadržajem (*E*)-4-metiltio-3-butenil-izotiocijanata, prisutnih u uzorcima bele i crne rotkve, najjače inhibitorno dejstvo ispoljila je na porast micelije *C. acutatum*. (*E*)-4-metiltio-3-butenil-izotiocijanat je karakteristični izotiocijanat vrste *R.*

sativus (Nakamura et al., 2001; Beevi et al., 2009). Mari et al. (2008) su utvrdili da je 4-metiltiobutenil-izotiocijanat ispoljio najjače inhibitorno delovanje prema *M. laxa* *in vitro* u poređenju sa ostalim ispitivanim izotiocijanatima (alil, butenil, benzil i 2-feniletil-izotiocijanat). Nizak procenat inhibicije porasta micelije *M. laxa* pod uticajem bele i crne rotkve je verovatno posledica niske koncentracije ovog izotiocijanata u biljnom tkivu u poređenju sa čistim jedinjenjem koji je ispitivan u radu Mari et al. (2008). Ovaj izotiocijanat, kojim je bogata dajkon rotkva, odlikuje se antibakterijskim (Beevi et al., 2009), antimutagenim (Nakamura et al., 2001) i antikarcinogenim dejstvom (Beevi et al., 2010), kao i sprečavanjem genotoksičnog efekta mikotoksina zearalenona (Ben Salah-Abbes et al., 2009).

Treća grupa isparljivih komponenti je bila bogata benzil-izotiocijanatom, estrima tetradekanske kiseline i *p*-krezolom, prisutnih u uzorku slačice i ispoljila je umereno inhibitorno delovanje prema svim ispitivanim patogenima. Inhibitorno dejstvo benzil-izotiocijanata utvrđeno je na porast micelije *Sclerotinia sclerotiorum* (Kurt et al., 2011), benzil-izotiocijanata i tetradekanske kiseline prema *A. alternata* (Troncoso-Rojas et al., 2005; Liu et al., 2008) i *F. oxysporum* (Smolinska et al., 2003; Liu et al., 2008). Antifungalno dejstvo *p*-krezola potvrđeno je u radovima Kurita et al. (1981) i Pizzolitto et al. (2015).

Inhibicija klijanja konidija svih patogena, osim *Alternaria* sp., pozitivno je bila korelisana sa sadržajem izomera neofitadiena, oktanske kiseline, benzil-izotiocijanata, *p*-krezola i estara tetradekanske kiseline, prisutnih u uzorcima kupusa, karfiola i slačice. Inhibitorno dejstvo oktanske kiseline utvrđeno je na klijanje konidija *C. lagenarium* i *F. oxysporum* (Liu et al., 2008), benzil-izotiocijanata prema *M. laxa* (Mari et al., 2008), *A. alternata* (Troncoso-Rojas et al., 2005), *S. sclerotiorum* (Kurt et al., 2011) i *F. oxysporum* (Smolinska et al., 2003), kao i tetradekanske kiseline prema *Penicillium* i *Aspergillus* vrstama (Stojanović-Radić et al., 2010). Liu et al. (2014) su pokazali jako inhibitorno dejstvo mešavine različitih zasićenih masnih kiselina prema više fitopatogenih gljiva, uključujući *B. cinerea* i *C. gloeosporioides*.

Derivati masnih kiselina su bili najzastupljenija isparljiva jedinjenja nastala hidrolizom biljnog tkiva familije *Brassicaceae*, zbog čega se može pretpostaviti da je antifungalno dejstvo ispitivanih *Brassicaceae* vezano za ova jedinjenja. Masne kiseline se odlikuju antifungalnim dejstvom, koje je jače kod zasićenih masnih kiselina među

koje spadaju oktanska i tetradekanska kiselina (Liu et al., 2008; Stojanović-Radić et al., 2010), koje su identifikovane i u ovim ispitivanjima. Takođe, u radu su identifikovana i jedinjenja iz grupe terpena, fenola i izotiocijanata za koje se navodi u literaturi da poseduju antifungalno ili antimikrobno dejstvo (Kurt et al., 2011; Smolinska et al., 2003; Troncoso-Rojas et al., 2005; Mari et al., 2008; Liu et al., 2008; Marei et al., 2012; Pejin et al., 2014; Ghaneian et al., 2015; Pizzolitto et al., 2015). Iako se antifungalno dejstvo uglavnom vezuje za dominantne sastojke, prisustvo i drugih sastojaka određuje antifungalno dejstvo, kroz moguće sinergističko ili antagonističko dejstvo. Antifungalno dejstvo smeše više masnih kiselina ispoljilo je jače antifungalno dejstvo, nego pojedinačne masne kiseline (Liu et al., 2014), što je primećeno i kod izotiocijanata (Troncoso-Rojas et al., 2005).

Isparljivi sastojci kupusa i karfiola izazvali su morfološke promene uvijanja vrhova inicijalnih hifa *M. fructigena*, kao i obrazovanje plikova na površini hifa, pucanje i uvijanje hifa *M. fructigena* i *M. fruticola*. Opisane promene slične su morfološkim promenama hifa nastalim pod uticajem različitih etarskih ulja (Soylu et al., 2006; Soyly et al., 2010), koje su kao i testirani isparljivi sastojci *Brassicaceae* smeše različitih hemijskih jedinjenja. Mehanizmi delovanja nekih od ovih jedinjenja su opisani u literaturi. Smatra se da se mehanizam delovanja masnih kiselina zasniva na njihovoj direktnoj inkorporaciji u lipidni deo membrana, što dovodi do promene u konformaciji proteina u membranama, isticanja ćelijskog soka, propadanja citoplazme i umiranja ćelija (Avis and Belanger, 2001). Mehanizam antifungalnog delovanja monoterpena nije potpuno poznat, ali pored njihove interakcije sa ćelijskim membranama, utvrđeno je da limonen inhibira aktivnost pektinmetilesteraze i celulaze gljiva. Inhibiranje aktivnosti pektinmetilesteraze dovodi do promena u strukturi ćelijskog zida, što se odražava nepovoljno na porast, integritet membrana i njihovu propustljivost. Inhibiranje aktivnosti celulaza utiče na razvoj i širenje bolesti (Marei et al., 2012).

6.10. *Lambertella corni-maris* patogen ploda jabuke i antagonista *Monilinia* spp.

Iz plodova jabuke sa simptomima smeđe truleži i crnila dobijena su dva izolata koja su na osnovu morfoloških i molekularnih osobina identifikovani kao *Lambertella corni-maris*. Izolati su ispoljili variranje u boji kolonija, gde je izolat *L. corni-maris*,

poreklom iz sorte Ajdared obrazovao kolonije beličaste do žućkaste, dok izolat *L. corni-maris* poreklom iz sorte Zlatni Delišeš narandžasto obojene kolonije. **Dumont (1971)** takođe navodi sličan izgled kolonije *L. corni-maris* na KDA podlozi, ali i da je ovo morfološki najvarijabilnija vrsta ovog roda. U kolonijama oba izolata *L. corni-maris* obrazovale su se stromatične tvorevine. Između sekvenci ITS rDNK regiona dobijenih izolata utvrđena je razlika u jednom nukleotidu i sekvence su bile identičke ili su ispoljile 99% nukleotidne sličnosti sa deponovanim sekvencama ovog regiona vrste *L. corni-maris* u GenBank pazi podataka. Variranje od jednog do četiri nukletida u ITS regionu i ribozomalnim podjedinicama (velika podjedinica LSU i mala podjedinica SSU) *L. corni-maris* su uočili **Wiseman et al. (2015)**.

Novija ispitivanja opisuju *L. corni-maris* kao prouzrokovача propadanja plodova jabuke tokom čuvanja u Americi (**Wiseman et al., 2015**), ali je ona opisana i u ranijim istraživanjima kao patogen plodova jabuke u Švajcarskoj i Japanu (**Dumont, 1971**). Pored jabuke vrsta je opisana i kao patogen plodova kruške i drugih drvenastih vrsta (**Dumont, 1971**). Sa druge strane, **Harada (1998)** je opisao *L. corni-maris* kao mikoparazita *M. fructigena*. Takođe, veliki broj istraživanja odnosi se na identifikaciju sekundarnih metabolita ove vrste za koje je pokazano da imaju baktericidno i fungicidno delovanje (**Dumont, 1971; Murakami et al., 2004; Murakami et al., 2005a; Murakami et al., 2005b; Murakami et al., 2007; Hirose et al., 2014**). Zbog toga je posebna pažnja u ovim istraživanjima usmerena ka ispitivanju antagonističke i patogene prirode dobijenih izolata *L. corni-maris*, kao i karakterizaciji ove nove gljive u našoj zemlji.

Proverom patogenosti, utvrđena je patogena priroda dobijenih izolata *L. corni-maris*, čija virulentnost je ispitivana veštačkim inokulacijama plodova različitih sorti jabuke. Oba izolata su bila virulentnija na plodovima sorte Zlatni Delišeš u odnosu na Greni Smit i Ajdared. Poređenjem virulentnosti izolata *L. corni-maris* i *Monilinia* vrsta je uočeno da su obe vrste najvirulentnije na plodovima jabuke sorte Zlatni Delišeš, ali i da je *L. corni-maris* bila slabije virulentna od *Monilinia* vrsta. Simptomi na inokulisanim plodovima bili su u vidu smeđe truleži, dok **Wiseman et al. (2015)** navode smeđe truleži na plodovima jabuke sorte Fudži.

Izolati su dobro rasli u tami i svetlosnom režimu 12 h svetlo / 12 h tama. Optimalna temperatura za porast izolata *L. corni-maris* bila je 20°C, ali su dobro rasli i

pri temperaturama od 15°C i 25°C. Najsporiji porast uočen je pri 30°C, dok pri 35°C nisu rasli. **Wiseman et al. (2015)** navode da izolati *L. corni-maris* rastu pri temperaturama od 0°C i 20°C, kao i da ne rastu pri 30°C. Najoptimalnije podloge za porast izolata *L. corni-maris* bile su V8 i KDA podloge, dok je najnepovoljnija bila Čapekova podloga. Kolonije izolata su rasle pri svim pH vrednostima podloga od 3 do 9, ali najbrže pri pH 6 i najsporije na pH 3 i 4. U zahtevu prema pH sredine značajno su se razlikovali od izolata *M. fructigena* poreklom sa plodova jabuke.

U ovim istraživanjima je ispitivano antagonističko delovanje dva dobijena izolata *L. corni-maris* prema *M. fructigena*, *M. fructicola*, *M. laxa* i *M. polystroma*. Pojava da u prirodnim uslovima *L. corni-maris* ima sposobnost da postane jedini prouzrokovatelj truleži plodova jabuke, a koji su već bili zaraženi gljivom *M. polystroma* do sada nije opisana. Jedino je **Harada (1990)** uočio da je *L. corni-maris* sposobna da kolonizuje plod jabuke koji je već bio zaražen *M. fructigena* (**loc. cit. Hirose et al., 2014**). Posle sedam dana zajedničke inkubacije porast kolonija ispitivanih izolata *Monilinia* spp. bio je inhibiran, međutim direktan kontakt kolonija *L. corni-maris* i *M. fructigena*, *M. polystroma*, *M. fructicola* i *M. laxa* samo je sporadično utvrđen. Posle tri nedelje zajedničkog gajenja *L. corni-maris* i *Monilinia* spp. bila je vidljiva promena boje i tamnjenje ivica kolonija *Monilinia* spp.. Osim toga, uočen je i koantagonizam *M. fructigena* i *M. laxa* prema jednom izolatu *L. corni-maris*. Prema **Tuininga et al. (2005)** pojava kada obe vrste deluju antagonistički jedna na drugu se naziva koantagonizam. Zašto posle nedelju dana nije došlo do pojave koantagonizma ostaje nepoznato? Možda na početku borbe *L. corni-maris* ima jaču izraženu antagonističku prirodu, ali kasnije i *M. fructigena* i *M. laxa* počinju da se prilagođavaju nastaloj situaciji i da bi opstale počinju da deluju inhibitory na *L. corni-maris*. Ova pojava nije uočena kod izolata *M. polystroma* i *M. fructicola*.

Posmatranjem pod skening elektronskim mikroskopom utvrđeno je da nema direktnog parazitiranja druge gljive, tako da je lučenje antifungalnih komponenti mogući mehanizam antagonističkog delovanja *L. corni-maris*. Prvi je **Sproston (1963)** izolovao hidroksi-1,4-naftokvinon ili lambertelin iz kulture *L. hickeyae*, a kasnije i iz *L. corni-maris* i dokazao njeno fungicidno i baktericidno delovanje (**loc.cit. Dumont, 1971**). Ispitivanjima sekundarnih metabolita gljive *L. corni-maris* dokazano je osim lambertelina i prisustvo lambertelola (A, B i C) i neolambertelina. **Murakami et al.,**

2004, Murakami et al., 2005a; Murakami et al., 2005b; Murakami et al., 2007). **Murakami et al. (2004)** su dokazali da lambertelol A i B, kao i lambertelin mogu značajno da inhibiraju klijanja konidija *M. fructicola*. **Murakami et al. (2007)** su utvrdili da se lambertelol A i B, kao i lambertelin izlučuju u visokim koncentracijama prilikom gajanja *M. fructigena* i *L. corni-maris*, pri čemu se lambertelol A i B i lambertelin nalaze u najvećoj koncentraciji u zoni između kolonija ove dve gljive. Daljim istraživanjima **Hirose et al. (2014)** su objasnili mehanizam antagonizma između *L. corni-maris* i *M. fructigena* i utvrdili da *L. corni-maris* izlučuje lambertelol A i B kao prekursore za sintezu lambertelina. U odsustvo *M. fructigena* pH vrednost sredine u kojoj se nalazi *L. corni-maris* je neutralna i lambertelol A i B prelaze u lambertelin. Lambertelin je toksičan ne samo za *M. fructigena* već i za *L. corni-maris*, ali ga ona razlaže i neutrališe njegovo toksično dejstvo. Na mestu kontakta ove dve gljive, lambertelol A i B difunduju u sredinu oko *M. fructigena* koja je kisela i transformišu se u lambertelin koji inhibira *M. fructigena*.

Hirose et al. (2014) su pretpostavili da *Lambertella* sp. ne može da prodre kroz nepovređeno tkivo, već da prvo *M. fructigena* prodire u tkivo domaćina, a zatim opadaju mehanizmi otpornosti domaćina i tek tada u plod prodire *Lambertella* spp. Sa druge strane, **Wiseman et al. (2015)** su nedavno utvrdili da *L. corni-maris* prouzrokuje trulež plodova jabuke u skladištu i pretpostavili da prodire kroz povrede na površini ploda jabuke. Ipak, **Harada (1998)** nije utvrdio da li *L. corni-maris* samo inhibira *M. fructigena* zbog hrane i prostora ili i koristi hranu iz *M. fructigena*. Prema svim činjenicama može se reći da je ova gljiva sposobna da bude i patogen i antagonista. Sličan fenomen uočen je i u istraživanjima **Harrison (1935)**. Ovaj autor navodi da na mumificiranim plodovima kajsije prethodno zaraženim *M. fructicola* dolazi do pojave apotecija druge vrste koju je identifikovao kao *Sclerotinia aestivalis*, na osnovu čega je pretpostavio da iako *S. aestivalis* ima patogenu sposobnost verovatno može da bude i parazit stromatičnog tkiva *M. fructicola*.

7. ZAKLJUČAK

Na osnovu obavljenih istraživanja u okviru ove doktorske disertacije dobijeni su rezultati iz kojih se mogu izvesti sledeći zaključci:

- U toku trogodišnjih ispitivanja od 2010. do 2012. godine, četiri *Monilinia* vrste: *M. fructigena*, *M. laxa* i po prvi put u našoj zemlji vrste *M. fructicola* i *Monilia polystroma* su identifikovane kao prouzrokovaci smeđe truleži i crnila plodova jabuke u voćnjacima i skladištima u Srbiji.

- Najzastupljenija vrsta u voćnjacima u periodu od 2010. do 2012. godine je bila *M. fructigena* (76,98%), dok su manje zastupljene bile *M. polystroma* (14,78%), *M. laxa* (5,15%) i *M. fructicola* (3,09%). U skladištima je dominantno bila prisutna *M. fructigena* (77,58%), a manje zastupljene *M. polystroma* (8,62%), *M. fructicola* (6,9%) i *M. laxa* (6,9%).

- Kolonije *M. fructigena* na KDA podlozi su bile ravnog oboda beličaste do sivkaste boje, bez prisutne sporulacije. Kod pojedinih izolata *M. fructigena* uočena je stromatizacija u kulturi. *M. polystroma* je na KDA podlozi obrazovala kolonije sivkaste boje, ravnog oboda, bez sporulacije, sa koncentrično raspoređenim stromatičnim tvorevinama. Kolonije *M. laxa* na KDA podlozi bile su sivkaste boje, režnjevito oboda, izgleda rozete i slabo razvijene vazdušne micelije bez sporulacije. Kolonije *M. fructicola* na KDA podlozi bile su sivkaste, ravnog oboda, sa masom spora na površini vazdušne micelije.

- Prosečni dnevni porast kolonija na KDA podlozi je bio najbrži kod *M. fructicola*, dok je kod ostalih vrsta porast bio ujednačen.

- Konidije izolata *Monilinia* spp. su bile jednoćelijske, hijalinske, limunastog oblika i formirale su se u lancima na plodovima jabuke i V8 podlozi. Konidije izolata bile su veće na inokulisanim plodovima jabuke nego na V8 podlozi. Izolati *M. fructigena* su obrazovali najveće konidije, nešto manje *M. polystroma* i najmanje *M. fructicola* i *M. laxa* na inokulisanim plodovima jabuke i V8 podlozi.

- Konidije *M. fructigena* i *M. polystroma* klijaju u jednu ili dve inicijalne hife, a konidije *M. laxa* i *M. fructicola* u jednu inicijalnu hifu. Najduže inicijalne hife obrazuje *M. fructigena*, a zatim *M. polystroma* i *M. fructicola*, a najkraće *M. laxa*. *M. fructicola* je formirala prve bočne grane na inicijalnim hifama na najvećoj udaljenosti od konidije,

zatim *M. polystroma*, *M. fructigena* i na najmanjoj udaljenosti *M. laxa*.

- Mikrokonidije su se formirale na fjalidama koje se obrazuju pojedinačno ili u grupama na vegetativnim hifama ili lancima konidija. Nije uočena razlika između vrsta na osnovu građe mikrokonidijskog stadijuma i veličine mikrokonidija, ali je po prvi put opisan mikrokonidijski stadijum *M. polystroma*.

- U svetlosnom režimu 12 h svetlo / 12 h tama i uslovima konstantne tame kolonije izolata sve četiri vrste su dobro rasle. Najpovoljnija temperatura za porast izolata bila 25°C, dok nije bilo porasta na 35°C. Dobar porast kolonija *M. polystroma* uočen je pri temperaturama od 15°C i 20°C, dok kod ostalih *Monilinia* vrsta i pri 20°C i 30°C. Najbrži prosečni dnevni porast sve četiri vrste ispoljen je na V8 i KDA podlogama. *M. fructigena* je najbrže rasla na podlozi pH 3-4, *M. polystroma* pH 3-6, *M. fructicola* pH 6-8 i *M. laxa* pH 5-8. Izolati *M. fructigena*, *M. polystroma* i *M. laxa* su sporulisali samo na V8 podlozi. *M. fructicola* je sporulisala pri svim ispitivanim ekološkim i odgajivačkim uslovima, osim na temperaturi od 35°C. Najintenzivnija sporulacija *M. fructicola* utvrđena je pri temperaturama 20-30°C, na V8 i KDA podlogama i pri pH 7-8.

- *M. polystroma* i *M. fructigena* su stromatizovale veštački inokulisane plodove jabuke.. Histopatološka analiza posle jednog i četiri meseca inkubacije je pokazala da *M. polystroma* intenzivnije stromatizuje biljno tkivo i obrazuje stromu složenije građe u odnosu na *M. fructigena*.

- *M. fructigena* je bila najvirulentnija na plodovima sve tri sorte jabuke. Na plodovima jabuke sorte Ajdared i Zlatni Delišeš *M. laxa* je bila srednje virulentna, a *M. fructicola* slabo virulentna. *M. polystroma* je na plodovima jabuke sorte Zlatni Delišeš bila jako virulentna, na plodovima sorte Ajdared jako i srednje virulentna. Na plodovima sorte Greni Smit nije bilo razlike u virulentnosti između *M. polystroma*, *M. laxa* i *M. fructicola*. Intenzitet sporulacije *M. fructicola*, *M. fructigena* i *M. polystroma* se razlikovao zavisno od sorte, dok je kod *M. laxa* bio najniži na sve tri sorte.

- Najpogodniji prajmeri za molekularnu detekciju i identifikaciju sve četiri vrste bili su prajmeri opisani od strane **Cote et al. (2004)**. Dobijene sekvence ITS rDNK regiona 19 izolata *Monilinia* spp. pokazale su da na osnovu ovog regiona nije bilo variranja unutar populacije vrste. Filogenetskom analizom dela ITS rDNK regiona *Monilinia* spp. izolati iz Srbije su se grupisali sa izolatima istih vrsta iz sveta, vrste su

bile jasno razdvojene u pojedinačne grane i potvrđena je filogenetska bliskost između *M. fructigena* i *M. polystroma*.

- Na osnovu nukleotidne razlike ITS rDNK regiona četiri vrste, u ovom istraživanju je razvijena nova PCR-RFLP metoda za specifičnu detekciju *M. polystroma* zasnovana na digestiji ITS1 / ITS4 PCR produkata *HhaI* restrikcionim enzimom.

- U *in vitro* uslovima etarska ulja pitome nane, geranijuma i timijana ispoljila su jako inhibitorno delovanje kontaktnom i fumigantnom fazom na porast micelije, klijanje konidija i porast inicijalnih hifa *M. fructigena*. U *in vivo* ispitivanjima etarska ulja su ispoljila slabije inhibitorno delovanje nego u *in vitro* ispitivanjima. Najefikasnije delovanje u *in vivo* uslovima ispoljilo je etarsko ulje timijana primenjeno kontaktno u koncentraciji od 0,5% sa kurativnim (85,54%) i protektivnim dejstvom (79,21%) kao i fumigantnom primenom u koncentraciji 0,1% sa kurativnim dejstvom (75,2%). Primena etarskih ulja negativno se odrazila na organoleptičke osobine plodova jabuke, osim kod fumigantne primena etarskog ulja geranijuma u koncentraciji od 0,1%. Najzastupljeniji sastojci etarskog ulja timijana su bili timol (32,3%) i p-cimen (31,7%), dok su manje zastupljeni bili karvakrol, terpinen, linalol, borneol, kamfor, terpinol i kamfen. U etarskom ulju geranijuma najzastupljeniji sastojci su bili citronelol (34%) i geraniol (16,8%), dok su manje zastupljeni bili citronelil-formijat, linalol i izo-menton. U etarskom ulju pitome nane najzastupljeniji sastojci su bili mentol (48,2%) i menton (25,6%), dok su manje zastupljeni bili mentofuran, izomentil-acetat i limonen.

- Isparljivi proizvodi hidrolize sedam odomaćenih sorti familije *Brassicaceae* ispoljili su inhibitorno dejstvo na porast micelije, klijanje konidija i izduživanje inicijalnih hifa četiri *Monilinia* vrste i pet vrsta gljiva, prouzrokovaca propadanja plodova jabuke. Najjače inhibitorno dejstvo na porast micelije ispoljili su isparljivi proizvodi kupusa, karfiola i brokolija. Klijanje konidija najjače su inhibirali proizvodi karfiola, slačice i kupusa, a izduživanje inicijalnih hifa sastojci slačice, kupusa, bele i crne rotkve. Na osnovu ispoljenog inhibitornog dejstva na porast micelije izdvojile su se tri grupe metabolita ispitivanih *Brassicaceae*. Prva grupa imala je visok sadržaj izomera neofitadiena, oktanske kiseline, (*E*)-fitola i limonena, prisutnih u uzorcima kupusa, karfiola i brokolija. Druga grupa isparljivih komponenti ispitivanih biljaka familije *Brassicaceae* se izdvojila visokim sadržajem (*E*)-4-metiltio-3-butenil-izotiocijanata, prisutnih u uzorcima bele i crne rotkve. Treća grupa isparljivih komponenti je bila

bogata benzil-izotiocijanatom, estrima tetradekanske kiseline i p-krezolom, prisutnih u uzorku slačice. Inhibicija klijanja konidija svih patogena pozitivno je bila korelisana sa sadržajem izomera neofitadiena, oktanske kiseline, benzil-izotiocijanata, p-krezola i estara tetradekanske kiseline, prisutnih u uzorcima kupusa, karfiola i slačice.

- U ovom istaživanju je prvi put u Srbiji opisana i okarakterisana *Lambertella corni-maris* kao patogen plodova jabuke i antagonista *M. polystroma*, *M. fructigena*, *M. laxa* i *M. fructicola*.

8. LITERATURA

- Abdel-Farid, I. B., Choi, Y. H., Kim, H. K., van den Hondel, C.A.M.J.J., van der Meijden, E., and Verpoorte, R. (2006): The role of secondary metabolites in *Arabidopsis* and *Brassica* in the interaction with fungi. *Current Topics in Plant. Biology*, 7: 47-73.
- Alaniz, S., Hernandez, L., Domasco, D. and Mondino, P. (2012): First report of *Colletotrichum acutatum* and *C. fragariae* causing bitter rot of apple in Uruguay. *Plant Disease*, 96: 458.
- Aleksić, G. A. (2006): Karakteristike *Venturia inaequalis* u agroekološkim uslovima Srbije. Doktorska disertacija. Poljoprivredni fakultet Univerzitet u Novom Sadu. Novi Sad.
- Altindag, M., Sahin, M., Esithen, A., Ercisli, S., Guleryuz, M., Donmaz, M. F., Sahin, F. (2006): Biological control of brown rot (*Monilinia laxa* Ehr.) on apricot (*Prunus ameniaca* L. cv. *Hacihaliloglu*) by *Bacillus*, *Burholdria*, and *Pseudomonas* application under *in vitro* and *vivo* conditions. *Biological control*, 38: 369-372.
- Alwakeel, S. S. (2013): Molecular identification of isolated fungi from stored apples in Riyadh, Saudu Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 20: 311-317.
- Amiri, A. and Bompeix, G. (2005): Diversity and population dynamics of *Penicillium* spp. on apples in pre- and postharvest evironments: consequences for decay development. *Plant Pathology*: 54, 74-81.
- Amiri, A., Dugas, R., Pichot, A. L. and Bompeix, G. (2008): *In vitro* and *in vivo* activity of eugenol oil (*Eugenia caryophyllata*) against four important postharvest apple pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 126:13–19.
- Anderson, B. and Thrane, U. (2006): Food borne fungi in fruit and cereals and their production of mycotoxins. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 571: 137-152.
- Antunes, M. D. C. and Cavaco A. M. (2010): The use of essential oils for postharvest decay control. *Flavour and Fragrance Journal*, 25: 351-366.

- Arras, G. and Usai, M. (2001): Fungitoxic activity of 12 essential oils against four postharvest citrus pathogens: chemical analysis of *Thymus capitatus* oil and its effect in subatmospheric pressure conditions. *Journal of Food Protection*, 64: 1025-1029.
- Arsenijević, M. i Gavrilović, V. (2005): *Phomopsis perniciosa* Grove - uzročnik truleži uskladištenih plodova jabuke. *Pesticidi i Fitomedicina*, 20: 189-194.
- Arsenijević, M. i Jančurović, J. (1988): O nalazu *Pestalotiopsis* sp. (Syn. *Pestalotia* sp.) na uskladištenim plodovima jabuke. *Zaštita bilja*, 186: 443-449.
- Arsenijević, M., Stojčić, J. i Trkulja, V. (1997): Dosadašnji rezultati istraživanja i perspektiva praktične primene bioloških mera suzbijanja parazita gajenih biljaka. *Zaštita Bilja*, 48(1): 5-21.
- Avis, T. J. and Belanger, R. R. (2001): Specificity and mode of action of the antifungal fatty acid cis-9-heptadecanoic acid produced by *Pseudozyma flocculosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2956-960.
- Babović, M., Bulajić, A. i Tošić, B. (1994): *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc izazivač propadanja uskladištenih plodova jabuke. Zbornik rezimea sa trećeg jugoslovenskog kongresa o zaštiti bilja, Vrnjačka Banja, str. 50.
- Babović, M., M., Marković, S., Stojanović, S. i Pantelić, Z. (1979): Proučavanje uzroka propadanja plodova jabuke u uslovima skladišta. *Zaštita bilja*, 147: 83-87.
- Babović, V. M., Jakovljević, D. i Kranjaja, V. S. (1997): *Botrytis cinerea* prouzrokovatelj truleži uskladištenih plodova jabuke. Zbornik rezimea trećeg jugoslovenskog savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor, str. 100.
- Babu, K. G. D. and Kaul, V. K. (2005): Variation in essential oil composition of rose-scented geranium (*Pelargonium* sp.) distilled by different distillation techniques. *Flavour and Fragrance Journal*, 20: 222-231.
- Baker, M. (2011): Pest risk assessment of *Monilinia fructicola* for EU territory and identification and evaluation of risk management options. *EFSA Journal*, 9: 2119. Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M. (2008): Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 446–475.
- Balaž, J., Stojšin, B. i Bagi, F. (1999): Ispitivanje antagonističkog delovanja *Trichoderma* sp. prema *Monilia fructigena* i *Monilia laxa* prouzrokovateljima

- truleži plodova jabuke. Zbornik rezimea IV jugoslovenskog Savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor, str 6-10.
- Bannon, F., Gort, G., van Leeuwen, G., Holb, I. and Jeger, M. (2009): Diurnal patterns in dispersal of *Monilinia fructigena* conidia in an apple orchard in relation to weather factors. *Agricultural and Forest Meteorology*, 149: 518-525.
- Baroncelli, R., Screenivasaprasad, M. R., Thom, and Sukno, S. A. (2014): First report of bitter rot caused by *Colletotrichum godetiae* in the United Kingdom. *Plant Disease*, 98: 1000.
- Barrera-Necha, L. L., Bautista-Banos, S., Flores-Moctazuma, H. E. and Estudillo, A. R. (2008): Efficiency of essential oils on the conidial germination, growth of *Colletotrichum gloeosporoides* (Penz.) and Sacc and control of postharvest diseases in papaya (*Carica papaya* L.). *Plant Pathology Journal*. 1-5.
- Baruah, P., Sharma, R. K., Singh, R. S. and Ghosh, A. C. (1996): Fungicidal activity of some naturally occurring essential oils against *Fusarium moniliforme*. *Journal of Essential Oil Research*, 8: 411-412.
- Batra, L. R. (1991): *World Species of Monilinia (Fungi): Their Ecology, Biosystematics and Control*. Berlin, Germany.
- Batra, L. R., Harada, Y. (1986): A field record of apothecia of *Monilinia fructigena* in Japan and its significance. *Mycologia*, 78: 913-917.
- Beevi, S.S., Mangamoori, L.N., Dhand, V., Ramakrishna, D.S. (2009): Isothiocyanate profile and selective antibacterial activity of root, stem, and leaf extracts derived from *Raphanus sativus* L. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6: 129-136.
- Beevi, S. S., Mangamoori, Subathrama M, and Edula, J. R. (2010): Hexane extract of *Raphanus sativus* L. roots inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human cancer cells by modulating genes related to apoptotic pathways. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65: 200-209.
- Ben Salah-Abbès J, Abbes S, Ouanes Z, Abdel-Wahhab MA, Bacha H, Oueslati R. (2011): Isothiocyanate from the Tunisian radish (*Raphanus sativus*) prevents genotoxicity of Zearalenone *in vivo* and *in vitro*. *Mutation Research*, 677: 59-65.
- Berrie, A. M. and Holb, I. (2014): Apple Scab. In *Compendium of Apple and Pear Diseases*, ed. by Sutton, T. B., Aldwinckle, H. S., Angelo, A. M. and Wallgenbach, J. F. APS Press, St. Paul, Minesota, pp. 8-11.

- Biggs, A. R. and Stensvand, A. (2014): Apple Scab. In Compendium of Apple and Pear Diseases, ed. by Sutton, T. B., Aldwinckle, H. S., Angelo, A. M. and Wallgenbach, J. F. APS Press, St. Paul, Minesota, pp. 8-11.
- Boehm E.W.A., Ma, Z. and Michailides, T.J. (2001): Species-specific detection of *Monilinia fructicola* from California stone fruits and flowers. *Phytopathology*, 91: 428– 439.
- Boesewinkel, H. J. and Corbin, J. B. (1970): A new record of brown rot, *Sclerotinia* (*Monilinia*) *laxa* in New Zealand. *Plant. Dis. Rep.*, 54:504-506.
- Boneterra, A. Mari, Casalini, L. and Montesinos, E. (2003): Biological control of *Monilinia laxa* and *Rhizopus stolonifer* in postharvest of stone fruit by *Pantoea agglomerans* EPS125 and putative mechanisms of antagonism. *International Journal of Food Microbiology*, 84: 93-104.
- Boukhatem, N. M., Kameli, A. and Saidi, F. (2013): Essential oil of Algerian rose-scented geranium (*Pelargonium graveolens*): Chemical composition and antimicrobial activity against food spoilage pathogens. *Food Control* 34: 208-213.
- Bouzenna, H. and Krichen, L., (2012): *Pelargonium graveolens* L'Her. and *Artemisia arborescens* L. essential oils? Chemical composition, antifungal activity against *Rhizoctonia solani* and insecticidal activity against *Rhyssopertha dominica*. *Natural Product Research*. 27: 841-846.
- Byrde, R. J. W. and Willetts, H. J. (1977): The Brown Rot Fungi of Fruit. Their Biology and Control. Pergamon Press, Oxford.
- Cabi. org (2016): <http://www.cabi.org/isc/datasheet/34747>.
- Calavan, E. C. and Keitt, G. W. (1948): Blossom and spur blight (*Sclerotinia laxa*) of sour cherry. *Phytopathology*, 38: 857-882.
- Carbone, I. and Kohn, L.M. (1993): Ribosomal DNA sequence divergence within internal transcribed spacer 1 of the *Sclerotiniaceae*. *Mycologia*, 85: 415-427.
- Carta, C. M., Moretti, D. I. and Peana, A. T. (1996): Activity of the oil of *Salvia officinalis* against *Botrytis cinerea*. *Journal of Essential Oil Research*, 8: 399-404.

- Castoria, R and Wright, S. A. I. (2010): Host responses to biological control agents. In: Postharvest pathology, Plant Pathology in the 21st century. Edited by Prusky, D and Gullino, M. L. Springer Science + Business Media B. V., pp. 171-182.
- Celar, F. and Valič, N. (1999): Pojava glive *Monilinia laxa* f. sp. *mali* v u Sloveniji. Zbornik predavanj in referatov s 4. Slovenskega posvetovanja o varstvu rastin, Portorož, 485-488.
- Charron, C. S., Sams, C. E. (1999): Inhibition of *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* by shredded leaves of *Brassica species*. Journal of the American Society of Horticultural Science, 124, 462-467.
- Chen, F., Liu, X., Schnabel, G. (2013): First report of brown rot caused by *Monilinia fructicola* in Sweet cherry in Maryland. Plant Disease, 97: 145.
- Christian, J. E., Goggi, A. S. (2008): Aromatic plant oils as fungicide for organic corn production. Crop Science, 48: 1941-1951.
- Chutia, M., Bhuyan, P.D., Pathak, M.G., Sarma, T.C., Boruah, P. (2009): Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. LWT - Food Science Technology 42: 777-780.
- Cooke, D.E.L., D.M., Guy, D.C., Russell, J., Unkles, S.E. Duncan J.M. (1996): Relatedness of Group I species of *Phytophthora* as assessed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPDs) and sequences of ribosomal DNA Mycological Research 100: 3297-303
- Covey, R. P. and Harris, P. C. (2014): Phytophthora fruit rot. In Compendium of Apple and Pear Diseases, ed. by Sutton, T. B., Aldwinckle, H. S., Angelo, A. M. and Wallgenbach, J. F. APS Press, St. Paul, Minesota, pp. 40-41.
- Cote, M. J., Tardif, M. C. and Meldrum, A. J. (2004): Identification of *Monilinia fuctigena*, *M. fructicola*, *M. laxa*, and *Monilia polystroma* on inoculated and naturally infected fruit using multiplex PCR. Plant Disease, 88: 1219-1225.
- Dafferera, D. J., Ziogas, B. N. and Polissiou, 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: 39-44.

- Day J. P. and Shattock R. C. (1997): Aggressiveness and other factors relating to displacement of populations of *Phytophthora infestans* in England and Wales. *European Journal of Plant Pathology* 103: 379-391.
- De Cal, A. and Melgarejo, P. (1999): Effects of long-wave UV light on *Monilinia* growth and identification of species. *Plant Disease*, 83: 63-65.
- De Cal, A., Larena, I., Linán, M., Torres, R., Lamarca, N., Usall, J., Domenichini, P., Bellini, A., Eribe, X. and Melgarejo, P. (2009): Population dynamics of *Epicoccum nigrum*, a biocontrol agent against brown rot in stone fruit. *Journal of Applied Microbiology*, 106: 592-605.
- De Cal, A., Sagasta, E. M. and Melgarejo, P. (1988): Antifungal substances produced by *Penicillium freuetans* and their relationships to biocontrol of *Monilinia laxa*. *Phytopathology* 78: 888-893.
- Demirci, B., Baser, K. H. C., Tabanca, N. and Wedge, D. E. (2006): Antifungal activity of *Haplopappus greenei* essential oil towards phytopathogenic *Colletotrichum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 3146–3150.
- Deng, J., Li, W., Peng, X. L. and Ha, X. X. (2013): Study on the potential of antifungal activity of essential oils against fungal pathogens of fruits and vegetables. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 5(12):443-446.
- Duchoslavova, J., Siruckova, I., Zapletalova, E., Navratil, M. and Safarova, D. (2007): First report of brown rot caused by *Monilinia fructicola* on various stone and pome fruits in the Czech Republic. *Plant Disease*, 91: 907.
- Di Francesco, A., Fruk, M., Martini, C., Jemrić, T., Mari, M. (2015): First report of asiatic brown rot (*Monilinia polystroma*) on apple in Croatia. *Plant Disease* 99: 1181-1182.
- Duduk, N., Obradović, A. and Ivanović, M. (2010a): Effects of essential oils from thyme, cinnamon and clove on mycelial growth of *Colletotrichum acutatum*. *Pesticidi i Fitomedicina*, 25: 151-156.
- Duduk, N., Ivanović, M., Gašić, K. and Obradović, A. (2010b): *In vitro* antifungal activity of *Brassicaceae* spp. tissue compounds on strawberry root pathogens. IOBC/WPRS working groups: Biological control of fungal and bacterial plant pathogens “Climate change: Challenge or threat to biocontrol?” June 7 – 11, Graz, Austria. Book of abstracts, 105.

- Duduk, N., Vasić, M. i Ivanović, M. (2011): Uticaj isparljivih komponenti različitih etarskih ulja na porast micelije *Monilinia fructigena* in vitro. Zbornik rezimea XI Savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor, str. 35-36.
- Duduk, N., Vasić, M. i Vico, I. (2012): Antifungalno dejstvo isparljivih komponenti hidrolize tkiva biljaka *Brassicaceae* prema prouzrokovateljima antraknoze. Knjiga apstrakata IX Kongresa Mikrobiologa Srbije, Beograd, 1 stranica bez paginacije.
- Duduk, N., Marković, T., Vasić, M., Duduk, B., Vico, I. and Obradović, A. (2015): Antifungal activity of three essential oils against *Colletotrichum acutatum* the causal agent of strawberry anthracnose. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 18: 529-537.
- Dumont, K. P. (1971): *Sclerotiniaceae* II. *Lambertella*. *Memoirs of New York Botanical Garden*. 22 (1): 1-178.
- Đurić, T., Bočarov-Stančić, A., Balaž, J., Nikolić, N. i Laco, D. (2003): Antagonistička vrednost *Bacillus subtilis* u suzbijanju *Monilia fructigena*. Zbornik rezimea VI Savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor, str. 93.
- Elshafie, H. S., Mancini, E., Camelea, I., De Martino, L. and De Feo, V. (2015): *In vivo* antifungal activity of two essential oils from Mediterranean plants against postharvest brown rot disease of peach fruit. *Industrial Crops and Products*, 66: 11-15.
- Fahey, J. W., Zalcmann, A. T. and Talalay, P. (2001): The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, 56: 5–51.
- Fan J. Y., Guo, L. Y., Xu, J. P., Luo, Y. and Michailides, T. J. (2010): Genetic Diversity of populations of *Monilinia fructicola* (Fungi, Ascomycota, Helotiales) from China. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 57: 206–212.
- Fan, C. M., Xiong G. R., Qi, P., Ji, G. H. and He, Y. Q. (2008): Potential biofumigation effects of *Brassica oleracea* var. *caulorapa* on growth of fungi. *Journal Phytopathology*, 156: 321-325.
- Faostat (2015). [<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>].
- Feng, W., Chen, J. Zheng, X. and Liu, Q. (2011): Thyme oil to control *Alternaria alternata* in vitro and in vivo as a fumigant and contact treatments. *Food Control*, 22: 78-81.

- Forster, H. and Adaskaveg, J. E. (2000): Early brown rot infections in sweet cherry fruit are detected by *Monilinia*-specific DNA primers. *Phytopathology* 90: 171–178.
- Fulton, C. E., van Leeuwen, G. C. M and Brown, A. E. (1999): Genetic variation among and within *Monilinia* species causing brown rot of stone and pome fruits. *European Journal of Plant Pathology*, 105: 495 -500.
- Fulton, C. E., A. E. Brown (1997): Use of SSU rDNA group-I intron to distinguish *Monilinia fructicola* from *M. laxa* and *M. fructigena*. *FEMS Microbiology Letters* 157, 307–312
- Gell, I., Cubero, J. and Melgajero, P. (2007): Two different approaches for universal diagnosis of brown rot and identification of *Monilinia* spp. in stone fruit trees. *Journal of Applied Microbiology* 103: 2629–2637.
- Ghaneian, M. T., Ehrampoush, M. H., Jebali, A., Hekmatimoghaddam, S. and Mahmoudi, M. (2015): Antimicrobial activity, toxicity and stability of phytol as a novel surface disinfectant. *Environmental Health Engineering and Management Journal*, 2: 13-16.
- Glamočlija, J., Soković, M., Vukojević, J., Milenković, I. and Van Griensven L. J. L. D. (2006): Chemical composition and antifungal activities of essential oils of *Satureja thymbra* L. and *Salvia pomifera* ssp. *calycina* (Sm.) Hayek. *Journal of Essential Oil Reserch*, 18: 115-117.
- Gleason, M. L., Batzer, J. C. Sun, G., Zhang, R., Diaz-Ariaz, M. M. Craus, P. W. Ivanović, M., McManus, P. S., Cooley, D. R., Mayer, U., Weller, R. W. S., Yoder, K. S., Del Ponte, E. M., Biggs, A. R. and Oertel, B. (2011): A new view of sooty blotch and flyspeck. *Plant Disease*, 95: 368-383.
- Grabke, A., Hu, M. J., Luo, C. X., Bryson, P. K. and Schnabel, G. (2011): First report of brown rot of apple caused by *Monilinia fructicola* in Germany. *Plant Disease*, 95, 772.
- Grahovac, M. (2014): Biološko suzbijanje *Colletotrichum* spp. parazita uskladištenih plodova jabuke. Doktorska disertacija. Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
- Griffin S. G., Wyllie, S. G., Markham, J. L., Leach, D. N. David, N. L. (1999): The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour and Fragrance Journal*, 14:322–332.

- Grill, T., Celar, F., Munda, A., Javornik, B. and Jakse, J. (2008): AFLP analysis of intraspecific variations between *M. laxa* isolates from different hosts. *Plant Disease*, 83: 63-65.
- Hadizadeh, I., Peivastegan, B. and Hamzehzarghani, H. (2009): Antifungal activity of essential oils from some Shahid medicinal plants of Iran against *Alternaria alternate*. *American Journal of Applied Sciences*, 6 (5): 744-748.
- Harada, Y. (1998): Taxonomic studies on plant parasitic fungi on fruit trees and forest trees in Japan. *Nippon Kingakukai Kaiho* 39: 89 -96.
- Harada, Y., Nakao, S., Sasaki, M., Sasaki, Y., Ichihashi, Y. and Sano, T. (2004): *Monilia mumeicola*, a new brown rot fungus on *Prunus mume* in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 70: 297-307.
- Harisson, T. H. (1935): Brown rot offruits and associated diseases in Australia. An interesting Discomycete, *Sclerotinia aestivalis* Pollock, occurring on mummified fruits. *Mycologia* 27: 302-318
- Harteveld, D. O. C., Akinsanmi, O. A. and Drenth, A. (2013): Multiple *Alternaria* species groups are associated with leaf blotch and fruit spot diseases of apple in Australia. *Plant Pathology* 62, 289–297.
- Henson, J. M., Butler, M. J. and Day, A.W. (1999): The dark side of mycelium: melanins of phytopathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 37, 447–471.
- Hickey, K. D. (2014a): Powdery mildew. In *Compendium of Apple and Pear Diseases*, ed. by Sutton, T. B., Aldwinckle, H. S., Angelo, A. M. and Wallgenbach, J. F. APS Press, St. Paul, Minesota, pp. 12-14.
- Hickey, K. D. (2014b): Calyx-end rot. In *Compendium of Apple and Pear Diseases*, ed. by Sutton, T. B., Aldwinckle, H. S., Angelo, A. M. and Wallgenbach, J. F. APS Press, St. Paul, Minesota, pp. 39-40.
- Hilber-Bodmer, M., Bünter, M. and Patocchi, A. (2010): First report of brown rot caused by *Monilinia fructicola* on apricot in a Swiss orchard. *Plant Disease*, 94: 643.
- Hilber-Bodmer, M., Knorst, V., Smits T. H. M. and Patocchi, A. (2012): First report of Asian brown rot caused by *Monilia polystroma* on apricot in Switzerland. *Plant Disease*, 96: 146.

- Hily, J. M., Singer S. D., Villani, S. M. and Cox, K. D. (2011): Characterization of the cytochrome b (cyt b) gene from *Monilinia* species causing brown rot of stone and pome fruit and its significance in the development of QoI resistance. *Pest Management Science*, 67:385-396.
- Hirose, A., Kudo, S., Murakami, T., tanaka, K. Harada, Y. and Hashimoto, M. (2014): Lambertellin system, the mechanism for fungal replacement of *Monilinia fructigena* with *Lambertella corni-marisi* without competitive inhibition on agar media. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 22: 2489-2495.
- Hirschhäuser, S. and Fröhlich, J. (2007): Multiplex PCR for species discrimination of *Sclerotiniaceae* by novel laccase introns. *International Journal of Food Microbiology*, 118: 151-157.
- Holb, I. J. (2004a): Yeald loss and disease development of *Monilinia fructigena* (Aderh. & Ruhl.) Honey in a organic apple orchards. *Journal of Agricultural Sciences*, 15: 6-8.
- Holb, I. J. (2004b): Effect of acidity on growth rate and stroma formation of *Monilia fructigena* and *M. polystroma* isolates. *International Journal of Horticultural Science*, 10: 63–67.
- Holb, I. J. (2006): Possibilities of brown rot management in organic stone fruit production in Hungary. *International Journal of Horticultural Science*, 12: 87-91.
- Holb, I. J. (2008): Monitoring conidial density of *Monilinia fructigena* in the air in relation to brown rot development in integrated and organic apple orchards. *European Journal of Plant Pathology* 120, 397–408.
- Holb, I. J. and Scherm, H. (2007): Temporal dynamics of brown rot in different apple management systems and importance of dropped fruit for disease development. *Phytopathology* 97, 1004–1111.
- Holb, I. J. and Scherm, H. (2008): Quantitative relationships between different injury factors and development of brown rot caused by *Monilinia fructigena* in integrated and organic apple orchards. *Phytopathology*, 98: 76-86.
- Holb, I. J. Bálla, B., Vámos, A. and Gáll, J. M. (2012): Influence of preharvest calcium applications, fruit injury, and storage atmospheres on postharvest brown rot of apple. *Postharvest Biology and Technology*, 67: 29-36.

- Holb, I. J., and Chauhan, S. V. S. (2004). Effect of carbohydrate and nitrogen sources on the growth rates of *Monilia fructigena* and *M. polystroma* isolates. *Journal of Mycology and Plant Pathology*, 35, 128–131.
- Holst-Jensen, A., Kohn, L. M., Jakobsen, K. S. and Schumacher, T. (1997): Molecular phylogeny and evolution of *Monilinia* (*Sclerotiniaceae*) based on coding and noncoding rDNA sequences. *American Journal of Botany* 84: 686 -701.
- Honey, E. E. (1928): The monilioid species of *Sclerotinia*. *Mycologia*, 20: 127-157.
- Hong, C. and Michailides, M. J. (1998): Effect of temperature on the discharge and germination of ascospores by apothecia of *M. fructicola*. *Plant Disease*, 82: 195-202.
- Hrustić, J. (2014): Karakterizacija vrsta roda *Monilinia* patogena koštičavih voćaka u Srbiji i osetljivost na fungicide. Doktorska disertacija. Poljoprivredni fakultet Univerzitet u Beogradu, Beograd.
- Hrustić, J., Tanović, B., Mihailović, M. Delibašić, G. i Vukša, P. (2011): *In vitro* i *in vivo* efekat etarskog ulja timijana na *Monilinia fructigena*. Zbornik rezimea XI Savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor, str 36-37.
- Hrustić, J., Tanović, B., Mihajlović, M., Delibašić, G., Stanković, I., Krstić, B. i Bulajić, A. (2013): First report of brown rot caused by *Monilinia fructicola* on nectarine in Serbia. *Plant Disease*, 97: 147.
- Hu, M. J., Chen, Y., Chen, S. N., Liu, L., Yin, L. F. and Luo, C. X. (2011): First report of brown rot of peach caused by *Monilinia fructicola* in southeastern China. *Plant Disease*, 95: 225.
- Hu, M. J., Cox, D. C., Shnnabel, G. and Luo, C. X. (2011): *Monilinia* species causing brown rot of peach in China. *Plos One* 6: 1-14.
- Hughes, K. J. D., Fulton, C. E., McReynolds, D. and Lane, C. R. (2000): Development of new PCR primers for identification of *Monilinia* species. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 30: 507-511.
- Ioos, R. and Frey, P. (2000): Genomic variation within *Monilinia laxa*, *M. fructigena* and *M. fructicola*, and application to species identification by PCR. *European Journal of Plant Pathology*, 106: 373-378.
- Ivanović, M. i Ivanović, D. (2001): Mikoze i Pseudomikoze Biljaka. Belgrade, Serbia: De-Em-Ve.

- Ivanović, M. M., Ivanović, M. S., Batzer, J. C., Tatalović, N., Oertel, B., Latinović, J., Latinović, N. and Gleason, M. L. (2010): Fungi in the apple sooty blotch and Flyspeck complex from Serbia and Montenegro. *Journal of Plant Pathology*, 92: 65-72.
- Ivić, D., Voncina, D., Sever, Z., Simon, S. and Pejić, I. (2013): Identification of *Colletotrichum* Species Causing Bitter Rot of Apple and Pear in Croatia. *Journal of Phytopathology* 161:284–286.
- Ivić, D., Fazinić, T., Cole, J. and Novak, A. (2014): *Monilinia* species identified on peach and nectarine in Croatia, with the first record of *Monilinia fructicola*. *OEPP/EPPO Buletin*, 44: 70-72.
- Jasnić, S., Arsenijević, M., Knežević, P. i Adamović, D. (1996): Uticaj nekih biljnih ekstrakata na klijavost konidija *Monilinia fructigena*. *Zbornik rezimea XI Savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor*, str 85.
- Jeyadevi, R., Sivasudha, T., Ilavarasi, A., Thajuddin N. (2013): Chemical constituents and antimicrobial activity of Indian green leafy vegetable *Cardiospermum halicacabum*. *Indian Journal of Microbiology*, 53: 208-213.
- Jones, A. L. Ehret, G. R., Mayer, M. P. and Shane, W. W. (1996): Occurrence of bitter rot on apple in Michigan. *Plant Disease*, 80: 1294-1297.
- Jurick, W. M., Vico, I., Gaskins, V. L Janisiewicz, W. J.. and Peter K. A (2013a): First report of *Botryosphaeria dothidea* causing white rot on apple fruit in maryland. *Plant Disease*, 97: 999.
- Jurick, W.M., Vico, I., Gaskins, V., Janisiewicz, W. J. and Peter, K.A. (2013b): First report of *Neofusicoccum ribis* causing postharvest decay of apple fruit from cold torage in Pennsylvania. *Plant Disease*, 97:7.
- Kim, Y. K., Xiao, C. L. and Rogers, J. D. (2005): Influence of culture media and enviromental factors on mycelial growth and pycnidial production of *Sphaeropsis pyriputrescens*. *Mycologia*, 97: 25-32.
- Kirkegaard, J. A., Wong, P. T. W. and Desmarchelier, J. M. (1996): *In vitro* suppression of fungal root pathogens of cereals by *Brassica* tissues. *Plant Pathology*, 45: 593-603.

- Kishore, G. K., Pande, S. and Harish, S. (2007): Evaluation of essential oils and their Components for broad Spectrum antifungal activity and control of late leaf spot and crown rot diseases in Peanut. *Plant Diseases*, 91: 375-379.
- Koersten, L., DE Jager, E. S., DE Villiers, E. E., Lourens, A., Kotze, J. M., and Wehner, F. C. (1995): Evaluation of bacterial epiphytes isolated from avocado leaf and fruit surfaces for biological control of avocado postharvest diseases. *Plant Disease*, 79: 1149-1156.
- Kohn, L. M. and Grenville, D. J. (1989): Anatomy and histochemistry of stomatal anamorphs in the *Sclerotiniaceae*. *Canadian Journal of Botany*, 67: 371–393.
- Konstantinou, S., Karaoglanidis, G. S., Bardas, G. A., Minas, I. S., Doukas, E. and 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: 666-672.
- Kurita, N., Miyaji, M., Kurane, R. and Takahara, Y. (1981): Antifungal activity of components of essential Oils. *Agricultural and Biological Chemistry* 45: 945-952.
- Kurt, S., Gunes, U., Soyulu, E. M. (2011): *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of synthetic pure isothiocyanates against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Pest Management Science* 67: 869-875.
- Laird, K. and Philips, C. (2011): Vapour phase: a potential future for use essential oils as antimicrobials? *Letters in Applied Microbiology* 54: 169-174.
- Lane, C. R. (2002): A synoptic key for differentiation of *Monilinia fructicola*, *M. fructigena* and *M. laxa*, based on examination of cultural characters. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 32: 489-493.
- Larena, I. and Melgarejo, P. (1996): Biological control of *Monilinia laxa* and *Fusarium oxysporium f. sp. lycopersici* by a lytic enzyme-producing *Penicillium purpurogenum*. *Biological Control*, 6: 361-367.
- Larena, I., Torres, R. R., De Cal, A., Liñán, M., Melgarejo, P., Domenichini, P., Bellini, A., Mandrin, J. F., Ochoa De Eribe, X. and Usall, J. (2005): Biological control of postharvest brown rot (*Monilinia* spp.) of peaches by field applications of *Epicoccum nigrum*. *Biological Control*, 32: 305-310.

- Lazar-Baker, E. E., Hetherington, S. D., Ku, V. V., Newman, and S. M. (2011): Evaluation of commercial essential oil samples on the growth of postharvest pathogen *Monilinia fructicola* (G. Winter) Honey. Letters in Applied Microbiology, 52: 227-232.
- Lee, S. O., Choi, G. J., Jang, K. S., Lim, H. K., Cho, K. Y. and Kim, J. C. (2007): Antifungal activity of five plant essential oils as fumigant against postharvest and soilborne plant pathogenic fungi. Plant Pathology Journal, 23: 97-102.
- Lesik, K. (2013): *Monilinia* species causing fruit brown rot, blossom and twig blight in apple orchards in Belarus. Proceedings of the Latvian Academy of Sciences, section B, vol 67: (2013), No. 2 (683), pp. 192-194.
- Liu, S., Ruan, W., Li, J., Xu, H., Wang, J., Gao, Y., Wang, J. (2008): Biological Control of Phytopathogenic Fungi by Fatty Acids. Mycopathologia, 166:93-102.
- Liu, X., Han, R., Wang, Y., Li, X., Zhang, M., Yan, Y. (2014): Fungicidal Activity of a Medium-chain Fatty Acids Mixture Comprising Caprylic, Pelargonic and Capric Acids. Plant Pathology Journal 13: 65-70.
- Lopez-Reyes, J. G., Spadaro, D., Gullino, M. L. and Garibaldi. (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: 171-177.
- Lopez-Reyes, J. G., Spadaro, D., Gullino, M. L. and Garibaldi. (2013): Efficacy of plant essential oil on post-harvest control rots caused by fungi on different stone fruits *in vivo*. Journal of Food Protection, 76: 631-639.
- Luo, Y., Ma, Z., Reyes, H. C. Morgan, D. and Michailidis, T. J. (2007): Quantification of airborne spores of *Monilinia fructicola* in stone fruit orchards of California using real-time PCR. European Journal of Plant pathology, 118: 145-154.
- Ma, Z., Luo Y. and Michailides, T. J. (2003): Nested PCR assays for detection of *Monilinia fructicola* in stone fruit orchards and *Botryosphaeria dothidea* from pistachios in California. Journal of Phytopathology, 151: 312–322.
- Madrigal, C. and Melgarejo, P. (1994): Mechanisms of action of the antibiotic flavipin on *Monilinia laxa* and *Saccharomyces cerevisiae*. Mycological Research, 98: 874-878.
- Mamoci, E., Cavoski, I., Simeone, V., Mondelli, D., Al-Bitar, L. and Caboni, P. (2014): Chemical Composition and *In Vitro* Activity of Plant Extracts from *Ferula*

- communis* and *Dittrichia viscosa* against postharvest fungi. *Molecules*, 16: 2609-2625.
- Manici, L.M., Lazzeri, L. and Palmieri, S. (1997): *In vitro* fungitoxic activity of some glucosinolates and their enzyme-derived products toward plant pathogenic fungi. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45: 2768-2773.
- Marei, G. I. K., Abdel Rasaul, M. A. Abdelgaleil, S. A. M. (2012): Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 103: 56-61.
- Mari, M and Guizardi, M. (1998): *Phytoparasitica* 26: 59.
- Mari, M., Iori, R., Leoni, O. and Marchi, A. (1996): Bioassays of glucosinolate-derived isothiocyanates against postharvest pear pathogens. *Plant Pathology*, 45: 753–760.
- Mari, M., Leoni, O., Bernardi, R., Neri, F. and Palmieri, S. (2008): Control of brown rot on stonefruit by synthetic and glucosinolate-derived. *Postharvest Biology and Technology* ,47: 61-67.
- Mari, M., Leoni, O., Iori, R. and Cembali, T. (2002): Antifungal vapour-phase of allyl-isothiocyanate against *Penicillium expansum* on pears. *Plant Pathology* 51, 231–236.
- Mari, M., Martini, C., Guidarelli, M. and Neri, F. (2012): Postharvest biocontrol of *Monilinia laxa*, *Monilinia fructicola* and *Monilinia fructigena* on stone fruit by two *Aerobasidium pullulans* strains. *Biological Control*, 60: 132-140.
- Mari, M., Torres, R., Casalini, N., Lamarca, N., Mandrin, J. F., Lichou, I., Larena, I., De Cal, A., Melgarejo, P. and Usall, J. (2007): Control of post-harvest brown rot on nectarine by *Epilicium nigrum* and physico-chemical treatments. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 87: 1271-1277.
- Marino, M, Bersani, C and Comi G. (2001): Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*. *International Journal of Food Microbiology*, 67: 187-195.
- Marković, T. (2011): *Etarska Ulja i Njihova Bezbedna Primena*, Institut za proučavanje lekovitog bilja "dr Josif Pančić", Beograd.
- Marongiu, B., Piras, A., Porcedda, S., Falconieri, D., Maxia, A., Frau, M.A., Gonçalves, M.J., Cavaleiro, C. and Salgueiro, L. (2013): Isolation of the volatile fraction

- from *Apium graveolens* L. (*Apiaceae*) by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation: Chemical composition and antifungal activity. *Natural Product Research*, 27: 1521-1527.
- Marques, J. P. R., Soares, M. K. M. and Appezzato-da-Gloria, B. (2013): New staining technique for fungal-infected plant tissues. *Turkish Journal of Botany* 37: 784-87.
- Martinez-Romero, D., Castilo, S., Valverde, J. M. Guillen, F. Valero and Serrano, M. (2005): *Acta Horticultura*, 682:1723.
- Martini, C., Lantos, A., Di Francesco, A., Guidareli, M., D'Aquino, S. and Baraldi, E. (2013): First report of asiatic brown rot caused by *Monilinia polystroma* on peach in Italy. *Plant Disease*, 98: 1585.
- Martini, M., Lantos, A., Di Francesco, A., Guidareli, M., D'Aquino, C., Baraldi, E. (2014): First report of asiatic brown rot caused by *Monilinia polystroma* on peach in Italy. *Plant Disease* 98: 1585.
- Martini, M., Di Francesco, A., Lantos A., Mari, M. (2015): First report of asiatic brown rot (*Monilinia polystroma*) and brown rot (*Monilinia fructicola*) on pears in Italy. *Plant Disease* 99: 556.
- Maxim, P., Weber, R. W. S., Pederson, H. L. and Williamson, M. (2012): Control of a wide range of storage rots in naturally infected apples by hot-water dipping and rinsing. *Postharvest Biology and Technology*, 70: 25-31.
- Meepagola, K. M., Sturtz, G. and Wedge, D. E. (2002): Antifungal constituents of the essential oil fraction of *Artemisia dracunculus* L. var. *dracunculus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 6989-6992.
- Melgarejo, P., Carillo, R. and M-Sagasta, E. (1985): Mycoflora of peach twigs and flowers and its possible significance in biological control of *Monilinia laxa*. *Transaction for the British Mycological Society*, 85: 313-317.
- Michailides, T., Luo, Y., Ma, Z. and Morgan, D.P. (2007): Brown rot of dried plum in California: new insights on an old disease. APSnet Feature Story, March 2007. <http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/BrownRot.aspx>.
- Michailides, T.J., Ogawa, J.M. and Opgenorth, D.C. (1987): Shift of *Monilinia* spp. and distribution of isolates sensitive and resistant to benomyl in California prune and apricot orchards. *Plant Disease*, 71: 893-896.

- Mišić, P. (1994): Jabuka. Nolit, Beograd.
- Mordue, J. E. M. (1979a): *Sclerotinia fructicola*, CMI Description of Pathogenic Fungi and Bacteria. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, No 616.
- Mordue, J. E. M. (1979b): *Sclerotinia fructigena*, CMI Description of Pathogenic Fungi and Bacteria. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, No 617.
- Mordue, J. E. M. (1979c): *Sclerotinia laxa*, CMI Description of Pathogenic Fungi and Bacteria. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, No 616.
- Muller-Riebau, F., Berger, B., Oktay, Y. (1995): Chemical composition and Fungitoxic properties to phytopathogenic fungi of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43: 2262-2266.
- Munda, A. (2014): First report of *Colletotrichum fiorinae* and *C. godetiae* causing apple bitter rot in Slovenia. Plant Disease, 98: 1282.
- Munda, A., Viršek Marn, M. (2010): First report of brown rot caused by *Monilinia fructicola* affecting peach orchards in Slovenia. Plant Disease, 94: 166.
- Munoz, Z., Moret, A. and Bech, J. (2008): Morphological and molecular characterization of *Monilinia* sp. isolates and pathogenicity on apple. Agrociencia, 42: 119-128.
- Muntanola-Cvetković, M. (1987): Opšta Mikologija. Književne novine, Beograd.
- Murakami, T. Takahashi, Y. Fukushi, E. Kawabata, J. Hashimoto, M. Okuno, T. and Harada, Y. J. (2004): Biosynthesis of Lambertellols based on the high specific incorporation of ¹³C-labeled acetates and their biological properties. Journal of American Chemistry Society, 126: 9214-9220.
- Murakami, T.; Hashimoto, M. and Okuno, T. (2005a): Isolation, structure elucidation, preparation and biological properties of neolambertellin. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 15: 4185-4188.
- Murakami, T.; Sasaki, A.; Fukushi, E. Kawabata, J. Hashimoto, M. and Okuno, T. (2005b): Lambertellols C, a labile and novel biosynthetic congener of lambertellols A and B. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 15, 2587-2590.

- Murakami, T.; Takada, N.; Harada, Y.; Okuno, T.; Hashimoto, M. (2007): Stimulation of the biosynthesis of the antibiotics lambertellols by the Mycoparasitic fungus *Lambertella corni-marisi* under the acidic conditions produced by its host fungus *in vitro*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71, 1230-1235.
- Nakamura, Y., Iwahashi, T., Tanaka, A., Koutani, J., Matsuo, T., Okamoto, S., Sato, K., Ohtsuki, K. (2001): 4-(Methylthio)-3-butenyl Isothiocyanate, a Principal Antimutagen in Daikon (*Raphanus sativus*; Japanese White Radish). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 5755–5760.
- Neri, F., Mari, M., Brigati, S., Bertolini, P. (2007): Fungicidal activity of plant volatile compound for controlling *M. laxa*. *Plant Disease*, 91:30-35.
- Neri, F., Mari, M. and Brigati, S. (2006): Control of *Penicillium expansum* by plant volatile compounds. *Plant Pathology* 55: 100-105.
- Obradović, A., Radivojević, D., Vajgand, D. i Rekanović, E. (2015): Priručnik za integralnu proizvodnju i zaštitu jabuke, Beograd.
- OEPP / EPPO (2009): *Monilinia fructicola*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 39: 337–43.
- OEPP / EPPO (2011): First reports of *Monilia polystroma* in Hungary and the Czech Republic. EPPO Reporting Service.
[<http://archives.eppo.int/EPPOReporting/2011/Rse-1106.pdf>].
- Oh, K., Matsuoka, H., Sumita, O., Takatori, K. and Kurita, H. (1993): Aromatic evaluation of antifungal volatile compounds on the basis of the dynamic growth process of a single hyphae. *Applied Microbiology and Biotechnology* 38: 790-794.
- Ondejkova, N., Hudecova, M. and Bacigalova, K. (2010): First report of brown rot on *Monilinia fructicola* in the Slovak Republic. *Plant Protection Science*, 46: 181-184.
- Onofre, B. S., Antonizzi, D. (2014): Behaviour of the fungus *Colletotrichum gloeosporoides* (Renz and Sacc), which causes bitter rot in apples after harvesting. *Advances in Microbiology*, 4: 202-206.
- Oro, L., Feliziani, E., Cioni, M., Romanozi, G. and Comittini, F. (2014): Biocontrol of postharvest brown rot of sweet cherries by *Saccharomyces cerevisiae* Disva 599, *Metschnikowia pulcherrima* Disva 267 and *Wickerhamomyces anomalus* Disva 2 strains. *Postharvest Biology and Technology*, 96: 64-68.

- Oxenham, S. K., Svoboda, K. P. and Walters, D. R. (2005): Antifungal activity of the essential oil of basil (*Ocimum basilicum*). *Journal of Phytopathology*, 153: 174-180.
- Pal, K. K. and Gardener, B. M. (2006): Biological control of plant pathogens. *The Plant Health Instructor*. Doi: 10. 1094/PHI-A-2006-1117-02. [<https://www.apsnet.org/edcenter/advanced/topics/Documents/PHI-BiologicalControl.pdf>]
- Papavasileiou, A., Testempasis, S., Michailides, T. J. and Karaoglanidis, G. S. (2015): Frequency of brown rot fungi on blossoms and fruit in stone fruit orchards in Greece. *Plant Pathology*: 64: 416-428.
- Pašalić, D (2009): Tehnologija skaldštenja jabučastog voća. *Zbornik radova savetovanja inovacije u voćarstvu Beograd.str*, 79-92.
- Pejin, B., Savić, A., Soković, M., Glamočlija, J., Ćirić, A., Nikolić, M., Radotić, K. and Mojović, M. (2014): Further *in vitro* evaluation of antiradical and antimicrobial activities of phytol. *Natural Product Research*, 28: 372-376.
- Pellegrino, C., Gullino, M. L., Garibaldi, A. and Spadaro, D. (2009): First report of brown rot of stone fruit caused by *Monilinia fructicola* in Italy. *Plant Disease*, 93: 668.
- Peres, F. J. C., de Carvalho, L.R., Gonçalves, E., Berian, L. O. S. D. and Felicio, J. (2012): Evaluation of antifungal activity of seaweed extract. *Ciencia e Agrotecnologia* 36: 296-299.
- Peter, K., Gaskin, V., Lehman, B. and Jurick, W. (2015): First report of brown rot caused by *Monilinia fructicola* in Pennsylvania. *Plant Disease*, 99: 1179.
- Peter, K., Vico, I., Gaskin, V., Janisewicz, J., Safner, R. A. and Jurick, W. M. (2012): First report of *Penicillium carneum* causing blue mold on stored apple in Pennsylvania. *Plant Disease*, 96: 1823.
- Petroczy, M. and Palkovics, L. (2006): First report of brown rot caused by *Monilinia fructicola* on imported peach in Hungary. *Plant Disease*, 90: 375.
- Petroczy, M. and Palkovics, L. (2009): First report of *Monilia polystroma* on apple in Hungary. *European Journal of Plant Pathology*, 125: 343 - 347.
- Petroczy, M., Szigethy, A. and Palkovics, L. (2012): *Monilinia* species in Hungary: Morphology, culture characteristics, and molecular analysis. *Trees*, 26: 153-164.

- Philips, C. A. Laird, K. and Allen, S. C. (2012): The use of Citri-V and antimicrobial citrus essential oil vapour for the control of *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus niger* and *Alternaria alternata*. Food Research International, 47: 310-314.
- Piannzola, M. J. Moscatelli, M. and Vero, S. (2004): Characterization of *Penicillium* isolates associated with blue mold on apple in Uruguay. Plant Disease 88: 23-28.
- Pizzolitto, R. P., Barberis, C. L., Dambolena, J. S., Herrera, J. M. Zunino, M. P., Magnoli, C. E., Rubinstein, H. R. Zygadlo, J. A. and Dalcero, A. M. (2015): Inhibitory effect of natural phenolic compounds on *Aspergillus parasiticus* growth. Journal of Chemistry, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/547925>.
- Pina-Vaz, C., Gpncalves, R., Pinto, E., Costa-de-Oliveira, Tavares, C., Salgueiro, L., Cavaleiro, C., Goncalves, M. J. and Martinez-de-Oliveira, J. (2004): Antifungal activity of *Thymus* oils and their major components. JEADV 18: 73-78.
- Pitt, J. and Hocking, A. (2009): Fungi and Food Spoilage. Springer Science+Business Media, New York, USA.
- Pitt, J.I., Sotts, R. A., Holmes, R. and Cruickshank, R.H. (1991): *Penicilium solitum* revived, and its role as a pathogen of pomaceous fruit. Phytopathology 81: 1108-1112.
- Plotto, A., Roberts, D. D. and Roberts, R. G. (2003): Evaluation of plant essential oils as natural postharvest disease control of tomato (*Lycopersicon esculentum*). Acta Horticulturae, 628: 737-745.
- Poniatowska, A, Michalecka, M. and Bielenin, A. (2013): Characteristic of *Monilinia* spp. fungi causing brown rot of pome and stone fruits in Poland. European Journal of Plant Pathology, 135: 855-865.
- Pusey, P. L. and Wilson, C. L. (1983): Control of brown rot with a *Bacillus* bacterium. Phytopathology 73: 823.
- Pusey, P. L. and Wilson, C. L. (1984): Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. Plant Disease, 68: 753-756.
- Radulović, N., Dekić, M., Stojanović-Radić, Z. and Palić, R. (2011): Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Geranium columbinum* L. and *G. lucidum* L. (Geraniaceae). Turkish Journal of Chemistry 35: 499-512.

- Rehnmstrom, A. L., and Free, S. J. (1996). The isolation and characterization of melanin-deficient mutants of *Monilinia fructicola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 49, 321–330.
- Republički zavod za statistiku (2014): <http://webrzs.stat.gov.rs/website/public/pageview.aspx>
- Ristić, D. (2009): Proučavanje kompleksa čađave pegavosti i crnotačkaste pegavosti. Magistarska teza. Poljoprivredni fakultet Univerzitet u Beogradu, Beograd.
- Rosa, E., Heaney, R. K., Portas, C. A. M. and Fenwick, G. R. (1996): Changes in glucosinolate concentrations in *Brassica* crops (*B. oleracea* and *B. napus*) throughout growing seasons. *J. Sci. Food Agr.* 71:237–244.
- Rosenberger, D. A. (2014a): Blue Mold. In *Compendium of Apple and Pear Diseases*, ed. by Jones, A. L. and Aldwinckle, H. S., APS Press, St. Paul, Minnesota, pp. 76–77.
- Rosenberger D. A. (2014b): Postharvest Diseases. In *Compendium of Apple and Pear Diseases*, ed. by Jones, A. L. and Aldwinckle, H. S., APS Press, St. Paul, Minnesota, pp. 75.
- Rosenberger, D. A. and Xiao, C. L. (2014): Minor diseases. In *Compendium of Apple and Pear Diseases*, ed. by Sutton, T. B., Aldwinckle, H. S., Angelo, A. M. and Wallgenbach, J. F. APS Press, St. Paul, Minnesota, pp. 86.
- Ruzin, S. E. (1999): *Plant Microtechnique and Microscopy*. Oxford, USA: Oxford University Press.
- Sanderson, P.G. and Spotts, R. A. (1995): Postharvest decay of winter pear and apple fruit caused by species of *Penicillium*. *Phytopathology* 85: 103–110.
- Sarwar, M., Kirkegaard, J. A., Wong, P. T. W. and Desmarchelier, J. M. (1998): Biofumigation potential of brassicas. *Plant and Soil*, 201: 103–112.
- Sellam, A., Lacomis-Vasilescu, B., Hudhomme, P. and Simoneau, P. (2007): *In vitro* antifungal activity of brassinin, camalexin and two isothiocyanates against the crucifer pathogens *Alternaria brassicicola* and *Alternaria brassicae*. *Plant Pathology*, 56: 296–301.
- Sellamuthu, P. S., Sivakumur, D. and Soundy, P. (2013): Antifungal activity and chemical composition of thyme, peppermint and citronellaoils in vapor phase

- against avocado and peach postharvest pathogens. *Journal of Food Safety* 33: 86-93.
- Serdani, M., Kang, C. J., Anderson, B. and Craus, P. (2002): Characterization of *Alternaria* species groups associated with core rot of apples in South Africa. *Mycological Research*, 106. 561-569.
- Sivakumur, D. and Bautista-Banos, S. (2014): A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. *Crop Protection* 64: 27-37.
- Smith, B. J. and Kirkegaard, J. A. (2002): *In vitro* inhibition of soil microorganisms by 2-phenylethyl isothiocyanate. *Plant Pathology*, 51: 585-593.
- Smolinska, U. and Horbowicz, M. (1999): Fungicidal activity of volatiles from selected cruciferous plants against resting propagules of soil-borne fungal pathogens. *Journal of Phytopathology* 147: 119–124.
- Smolinska, U., Morra, M. J., Knudsen, G. R., James, R. L. (2003): Isothiocyanates produced by Brassicaceae species as inhibitors of *Fusarium oxysporum*. *Plant Disease* 87: 407-412.
- Snowdon, A. L. (1990): *Color Atlas of Post-Harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables*. Vol 1: General Introduction and Fruits. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Snyder, C. L. and Jones, A. L. (1999): Genetic variation between isolates of *Monilinia fructicola* and *Monilinia laxa* isolated from cherries in Michigan. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 21: 70 -77.
- Soatthiamroong, T., Jatisatienr, C. and Supyen, D. (2003): Antifungal activity of extract of *Eugenia aromatica* (L.) Baill (Myrtaceae) against some pathogenic molds. *Acta Horticulturae*, 597: 209-214.
- Soylu, E.M, Soylu, S. and Kurt, S. (2006): Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. *Mycopathologia*, 161: 119–128.
- Soylu, E. M. Kurt, S. Soylu, S. (2010): *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. *International Journal of Food Microbiology* 143: 183-189.

- Spotts, R. A. (2014a): Mucor rot. In Compendium of Apple and Pear Diseases, ed. by Sutton, T. B., Aldwinckle, H. S., Angelo, A. M. and Wallgenbach, J. F. APS Press, St. Paul, Minesota, pp. 80-81.
- Spotts, R. A. (2014b): Coprinus rot. In Compendium of Apple and Pear Diseases, ed. by Sutton, T. B., Aldwinckle, H. S., Angelo, A. M. and Wallgenbach, J. F. APS Press, St. Paul, Minesota, pp. 84-85.
- Spotts, R. A., Seifert, K., Wallis, K. M., Sugar, D., Xiao, C. L., Serdani, M., and Henriques, J. L. (2009): Description of *Cryptosporiopsis kienholzii* and species profiles of *Neofabraea* in major pome fruit growing districts in the Pacific Northwest USA. Mycological Research 113: 1301-1311.
- Staden, R, Beal, K. F. and Bonfield, J. K. (2000): The Staden package, 1998. Methods in Molecular Biology, 132: 115–30.
- Stojanović, D. i Petronijević, M. (1968): *Fusarium lateritium* Ness kao parazit jabuke i šljive. Zaštita bilja, 98: 25-28.
- Stojanović, S., Živković, S., Gavrilović, V. Starović, M., Aleksić, G. i Pavlović, S. (1996): *Botryosphaeria obtusa* prouzrokovac truleži ploda u Srbiji. Zaštita Bilja 54 (1-4): 19-31.
- Stojanović-Radić, Z., Čomić, Lj., Radulović, N., Dekić, M., Randelović, V., Stefanovic, O. (2010): Chemical composition of *Erodium* species: *E. ciconium* L., *E. cicutarium*, *E. absinthoides* Wild. (*Geraniaceae*). Chemical Papers, 64: 368-377.
- Sugar, D. (2014): Cladosporium rot. In Compendium of Apple and Pear Diseases, ed. by Sutton, T. B., Aldwinckle, H. S., Angelo, A. M. and Wallgenbach, J. F. APS Press, St. Paul, Minesota, pp. 84.
- Sutton, T. B. (2014a): White Rot. In Compendium of Apple and Pear Diseases, ed. by Sutton, T. B., Aldwinckle, H. S., Angelo, A. M. and Wallgenbach, J. F. APS Press, St. Paul, Minesota, pp. 21-23.
- Sutton, T. B. (2014b): Black rot. In Compendium of Apple and Pear Diseases, ed. by Sutton, T. B., Aldwinckle, H. S., Angelo, A. M. and Wallgenbach, J. F. APS Press, St. Paul, Minesota, pp. 23-24.
- Sutton, T. B. (2014c): Bitter Rot. In Compendium of Apple and Pear Diseases, ed. by Sutton, T. B., Aldwinckle, H. S., Angelo, A. M. and Wallgenbach, J. F. APS Press, St. Paul, Minesota, pp. 20-21.

- Sutton, T. B., Aldwinckle, H. S., Angelo, A. M. and Wallgenbach (2014): Compendium of Apple and Pear Diseases. APS Press, St. Paul, Minesota.
- Šućur, A. (2010): Nivoi otpornosti raznih genotipova jabuke prema ekonomski značajnim mikoza. Magistarska teza. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
- Tabanca, N., Demirci, B., Baser, K. H. S., Aytac, Z., Ekici, M. Khan, S. I., Jacob, M. R. and Wedge, D. E. (2006): Chemical composition and antifungal activity of *Salvia macrochlamys* and *Salvia recognita* essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54: 6593-6597
- Tabanca, N., Demirci, B., Baser, K. H. C., Mincsovcis, E., Khan, S. I., Jacob, M. R. and Wedge, D. E. (2007): Characterization of volatile constituents of *Scaligeria tripartita* and studies on the antifungal activity against phytopathogenic fungi. Journal of Chromatography B, 850: 221–229.
- 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: 2731-739.
- Tanović, B. Potočnik, I., Delibašić, G., Ristić, M. Kostić, M. and Marković, M. (2009): *In vitro* effect of essential oils from aromatic and medical plants on mushroom pathogens: *Verticillium fungicola*, *Mycogone perniciosa*, and *Cladobotryum* sp. Archives of Biological Sciences, 61: 231-237.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D. G. (1997): The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research, 24: 4876-882.
- Tošić, B., Babović, M. i Bulajić, A. (1994): *Monilinia fructigena* uzročnik truleži plodova jabuke u uslovima skladišta. U Zaštita Bilja Danas i Sutra, ed. Šestović, M., Nešković, N. I Perić, I., Društvo za zaštitu bilja Srbije, Beograd, pp. 105-113.
- Tripathi, P., Dubey, N. K. and Shukla A. K. (2008): Use of some essential oils as post-harvest botanical fungicides in the management of grey mould of grapes caused by *Botrytis cinerea*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 24: 39-46.

- Trkulja, V. (2003): Patogene, morfološke i odgajivačke odlike *Colletotrichum* prouzrokovaca gorke truleži ploda jabuke. Doktorska disertacija. Poljoprivredni fakultet Univerzitet u Beogradu, Beograd.
- Troncoso-Rojas, R., Corral-Acosta, Y., Sánchez-Estrada, A., García-Estrada, R., Aguilar-Valenzuela, A., Ojeda-Contreras, J. and Tiznado-Hernández, M. E. (2009): Postharvest treatment of isothiocyanates to control *Alternaria* rot in netted melon. *Phytoparasitica*, 37: 445–451.
- Troncoso-Rojas, R., Sánchez-Estrada, A., Ruelas, C., García, H.S., Tiznado-Hernández, M.E. (2005): Effect of benzyl isothiocyanate on tomato fruit infection development by *Alternaria alternata*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85: 1427- 1434.
- Tsao, R. and Zhou, T. (2000): Antifungal activity of monoterpenoids against postharvest pathogens *Botrytis cinerea* and *Monilinia fructicola*. *Journal of Essential Oil Research*, 12: 113-121.
- Tuininga, A. R. (2005): Interspecific Interaction Terminology: From Mycology to General Ecology. In the *Fungal Community: its Organization and Role in the Ecosystems*, Third Edition. Edited by Dighton, J. White, J. and Oudemans, P. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, London, New York.
- van Brouwershaven, I. R., Bruil, M. L., van Leeuwen G. C. M. and Kox, L. F. F. (2010): A real-time (TaqMan) PCR assay to differentiate *Monilinia fructicola* from other brown rot fungi of fruit crops. *Plant Pathology*, 59: 548–555.
- van der Walt, L., Spotts, R. A., Visagie, C. M., Jacobs, K., Smith, F. J. and McLeod, A. (2010): *Penicillium* species associated with preharvest wet core rot in South Africa and their pathogenicity on apple. *Plant Disease*, 94: 666-675.
- van Leeuwen, G. C. M. and van Kesteren, H. A. (1998): Delineation of the three brown rot fungi of fruit crops (*Monilinia* spp.) on the basis of quantitative characteristics. *Canadian Journal of Botany*, 76: 2042-2050.
- van Leeuwen, G. C. M., Stein, A., Holb, I. and Jeger, M. J. (2000): Yield loss in apple caused by *Monilinia fructigena* (Aderh. & Ruhl.) Honey, and spatio-temporal dynamics of disease development. *European Journal of Plant Pathology*, 106: 519–28.

- van Leeuwen, G. C. M., Baayen, B. P., Holb, I. J. and Jeger, M. J. (2002): Distinction of the Asiatic brown rot fungus *Monilia polystroma* sp. nov. from *M. fructigena*. Mycological Research, 106: 441-51.
- Vasić, M., Duduk, N., Ivanović, M. (2012a): *Monilinia fructicola*-novi patogen plodova jabuke u Srbiji. Zbornik rezimea XIV simpozijuma o zaštiti bilja i IX kongresa o zaštiti bilja, str. 86-87.
- Vasić, M., Duduk, N., Ivanović, M. M., Obradović, A. and Ivanović, M. S. (2012b): First report of brown rot caused by *Monilinia fructicola* on stored apple in Serbia. Plant Disease, 96: 456.
- Vasić, M., Duduk, N., and Ivanović, M. (2012c): Antifungal activity of the peppermint essential oil on *Monilinia fructigena* *in vitro*. Book of abstracts 7th CMAPSEEC, Subotica, Serbia, pp 112.
- Vasić, M., Duduk, N. and Ivanović M. (2013a): First report of brown rot caused by *Monilia polystroma* on apple in Serbia. Plant Disease, 97: 145.
- Vasić, M., Duduk, N., Vico, I., Ivanović, M. S. (2013b): First report of *Botryosphaeria dothidea* causing white rot of apple fruit in Serbia. Plant Disease, 97: 1659.
- Vasić, M., Duduk, N. i Vico, I. (2013c): Antifungalno dejstvo etarskog ulja geranijuma na porast micelije *Monilinia fructigena*. Knjiga apstrakata IX Kongresa mikrobiologa Srbije, Beograd, 1 stranica bez paginacije.
- Velho, A. C., Alaniz, S., Cassanova, L., Mondino, P. and Stadnik, M. J. (2015): New insight into the characterization of *Colletotrichum* species associated with apple diseases in southern Brazil and Uruguay. Fungal Biology, 119: 229-244.
- Vico, I. i Jurick, W. M. (2012): Postžetvena Patologija Biljaka i Biljnih proizvoda. Poljoprivredni fakultet Univerzitet u Beogradu. Beograd.
- Vico, I., Duduk, N., Duduk., B. i Vasić, M. (2013): *Penicillium expansum*-prouzrokoval propadanja plodova jabuke u skladištu. Knjiga apstrakata IX kongresa mikrobiologa Srbije, Beograd, 1 stranica bez paginacije.
- Vico, I., Duduk, N., Vasić, M., Žebeljan, A., Radivojević, D. (2015): Bull's eye rot of apple fruit caused by *Neofabraea alba*. Book of Abstracts Third Balkan Symposium on Fruit Growing, Belgrade, Serbia, p. 171.

- Vico, I., Gaskin, V., Duduk, N., Vasić, M., Yu, J., Peter, K. and Jurick, W. M. (2014): First report of *Penicillium crustosum* causing blue mold on stored apple fruit in Serbia. *Plant Disease*, 98: 1430.
- Vig, A. P., Rampal, G., Thind, T. S. and Arora, S. (2009): Bio-protective effects of glucosinolates – a review. *LWT – Food Science and Technology*, 42: 1561-1572.
- Villarino et al. Melgarejo, P., Usall, J., Segarra, J. and De Cal, A. (2010): Primary inoculum sources of *Monilinia* spp. in Spanish peach orchards and their relative importance in brown rot. *Plant Disease*, 94: 1048-1054.
- Villarino, M., Melgarejo, P., Usall, J., Segarra, J., Lamarca, N. and De Cal, A. (2012): Secondary inoculum dynamics of *Monilinia* spp. and their relationship to the incidence of postharvest brown rot in peaches and the weather conditions during the growing season. *European Journal of Plant Pathology*, 133: 585-598.
- Vinas, I., Bonet, J. and Sanchis, V. (1992): Incidence and mycotoxin production by *Alternaria tenuissima* in decayed apples. *Letters in Applied Microbiology*, 14: 284-287.
- Vučković, V. i Babović, M. (1997): *Monilinia laxa*-parazit plodova jabuke. Zbornik rezimea trećeg jugoslovenskog savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor, str. 99.
- Weber, R. W. S. (2011): *Phacidiopcnis washingtonensis*-cause of a new storage rot of apples in Northern Europe. *Journal of Phytopathology*, 10: 682-686.
- Wedge, D. E., Klun, J. A., Tabanca, N., Demirci, B., Ozek, T., Baser, K. H. C., Liu, Z., Zhang, S., Cantrell, C. L. and Zhan, J. (2009): Bioactivity-guided fractionation and GC/MS fingerprinting of *Angelica sinensis* and *Angelica archangelica* root components for antifungal and mosquito deterrent activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 464-470.
- Whetzel, H. J. (1945): A synopsis genera and species of the *Sclerotiniaceae*, a family of stromatic inoperculate Discomycetes. *Mycologia*, 37: 648 -714.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. New York, USA: Academic Press, 315–22.

- Willetts, H. J. (1968): The development of stromata of *Sclerotinia fructicola* and related species. Transaction of British Mycological Society, 51: 633-642.
- Willetts, H. J. (1969): Cultural characteristics of brown rot fungi (*Sclerotinia* spp.). Mycologia, 61: 332-39.
- Willetts, H. J. and Bulock, S. (1992): Development biology of sclerotia. Mycological research, 96: 801-816.
- Willetts, H. J. and Colonge, F. D. (1969): Spore development in the brown rot fungi (*Sclerotinia* spp.). New Phytologist 68: 123-131.
- Willetts, H. J., (1997): Morphology, development and evolution of stromata/sclerotia and macroconidia of the *Sclerotiniaceae*. Mycological Research, 101: 939-952.
- Wiseman, M. S., Dugan, F. M., Kim, Y. K. and Xiao, C. L. (2015): A postharvest fruit rot of apple caused by *Lambertella corni-marisi* in Washington State. Plant Disease, 99: 201-206.
- Wormald, H. (1919): The brown rot diseases of fruit trees, with special reference to two biological forms of *Monilia cinerea*. A contribution to our knowledge of the distribution of the species of *Sclerotinia* causing brown rot. Annals of Botany, 33: 361-397.
- Wormald, H. (1921): On the occurrence in Britain of the ascigerous stage of a brown rot fungus. Annals of Botany, 35: 125-135.
- Wormald, H. (1954): The Brown Rot Diseases of Fruit Trees. London: Her Majesty's Stationery Office, UK.
- Wu, H., Zhang, W., Zhang, G. A., Zeng, S. Y. and Lin, K. C. (2011): Antifungal vapour-phase activity of a combination of allyl isothiocyanate and ethyl isothiocyanate against *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* infection on apples. Journal of Phytopathology, 159: 450-455.
- Xiao, C. L. (2014): Grey mold. In Compendium of Apple and Pear Diseases, ed. by Sutton, T. B., Aldwinckle, H. S., Angelo, A. M. and Wallengenbach, J. F. APS Press, St. Paul, Minnesota, pp. 77-78.
- Xiao, C. L., Rogers J. D. and Boal, R. J. (2004): First report of a new postharvest fruit rot on apple caused by *Sphaeropsis pyriputrescens*. Plant Disease, 88:223.

- Xiao, C. L., Rogers, J. D., Kim, Y. K. and Liu, Q. (2005): *Phacidiopycnis washingtonensis*: a new species associated with pome fruits from Washington. *Mycologia*, 97: 464-473.
- Xu, X. M. and Robinson, J. D. (2000): Epidemiology of brown rot (*Monilinia fructigena*) on apple: infection of fruits by conidia. *Plant Pathology*, 49: 201–206.
- Xu, X. M., Robinson, J. D., Berrie, A. M. and Harris, D. C. (2001): Spatio-temporal dynamics of brown rot (*Monilinia fructigena*) on apple and pear. *Plant Pathology* 50: 569 - 578.
- Yanez-Mendizabel, V. Zeriuoh, H., Vinas, I., Torres, R., Usall, J de Vicente, A., Perez-Garcia, A. and Teixido, N. (2012): Biological control of peach brown rot (*Monilinia* spp.) by *Bacillus subtilis* CPA-8 is based on production of fengycin-like lipopeptides. *European Journal of Plant Pathology*, 132: 609-619.
- Yoder, K. S. (2014a): Blotch. In *Compendium of Apple and Pear Diseases*, ed. by Sutton, T. B., Aldwinckle, H. S., Angelo, A. M. and Wallgenbach, J. F. APS Press, St. Paul, Minnesota, pp. 36.
- Yoder, K. S. (2014b): X-spot. In *Compendium of Apple and Pear Diseases*, ed. by Sutton, T. B., Aldwinckle, H. S., Angelo, A. M. and Wallgenbach, J. F. APS Press, St. Paul, Minnesota, pp. 38.
- Yoder, K. S. and Sutton, T. B. (2014): Black Pox of Apple and Blister canker of Apple. In *Compendium of Apple and Pear Diseases*, ed. by Sutton, T. B., Aldwinckle, H. S., Angelo, A. M. and Wallgenbach, J. F. APS Press, St. Paul, Minnesota, pp. 38.
- Zambonelli, A., Zechini D'Aulerio, A., Bianchi, A. and Albasini, A. (1996): Effects of essential oils on phytopathogenic fungi *in vitro*. *Journal of Phytopathology*, 144: 491-494.
- Zhang, D. P., Lu, C. G., Zhang, T. T., Spadaro, D., Liu, D. W. and Liu, W. C. (2014): *Candida pruni* sp. nov is a new yeast species with antagonistic potential against brown rot of peaches. *Archives of Microbiology*, 196: 525-530.
- Zhang, D., Lopez-Reyes, J. G., Spadaro, D., Garibaldi, A. and Gullino, M. L. (2010): Efficacy of yeast antagonist used individually or in combination with hot water

dipping for control of postharvest brown rot of peaches. Journal of Plant Diseases and Protection, 117: 226-232.

Zhu X. Q. and Guo L. Y. (2010): First report of brown rot on plum caused by *Monilia polystroma* in China. Plant Disease 94: 478.

Zhu, X. Q., Chen, X. Y., Luo, Y., and Guo, L. Y. (2005): First report of *Monilinia fructicola* on peach and nectarine in China. Plant Pathology, 54:575.

Zhu, X. Q., Chen, X.Y., and Guo, L.Y. (2011): Population structure of brown rot fungi on stone fruits in China. Plant Disease, 95: 1284 - 1291.

9. PRILOZI

Prilog 1. Sekvence ITS rDNK regiona izolata *Monilinia* spp. iz GenBank-NCBI baze podataka korišćene za RFLP i filogenetsku analizu.

Vrsta	Izolat	Biljka domaćin	Lokalitet	Gen Bank pristupni broj	Literaturni navod
<i>M. fructigena</i>	BSPBA	Šljiva	Srbija	KC544804	Hrustić et al., neobjavljeno
	SPBA	Šljiva	Srbija	KC544805	Hrustić et al., neobjavljeno
	SPPR	Šljiva	Srbija	KC544806	Hrustić et al., neobjavljeno
	TPGO	Trešnja	Srbija	KC544807	Hrustić et al., neobjavljeno
	1305	Nepoznat	Nepoznat	HF678389	Camile, neobjavljeno
	YCT3	Nepoznat	Kina	HQ846965	Zhu et al., 2011
	ST4	Nepoznat	Kina	HQ846964	Zhu et al., 2011
	GDT1	Nepoznat	Kina	HQ846963	Zhu et al., 2011
	BX5	Nepoznat	Kina	HQ846962	Zhu et al., 2011
	GND3	Nepoznat	Kina	HQ846961	Zhu et al., 2011
	STL1	Nepoznat	Kina	HQ846960	Zhu et al., 2011
	YHT3	Nepoznat	Kina	HQ846959	Zhu et al., 2011
	GP13	Nepoznat	Kina	HQ846958	Zhu et al., 2011
	GP3	Nepoznat	Kina	HQ846957	Zhu et al., 2011
	GS3	Nepoznat	Kina	HQ846956	Zhu et al., 2012
	P1	Nepoznat	Kina	HQ846946	Zhu et al., 2011
	GENA4	Nepoznat	Kina	HQ846945	Zhu et al., 2011
	SL10	Breskva	Kina	HQ908791	Hu et al., 2011
	UASWS0643	Jabuka	Švajcarska	HQ166417	Lefort et al., neobjavljeno
	UASWS0601	Jabuka	Švajcarska	HQ166375	Lefort et al., neobjavljeno
	UASWS0573	Jabuka	Švajcarska	HQ166347	Lefort et al., neobjavljeno
	UASWS0333	Jabuka	Švajcarska	EU098121	Cravadore et al., neobjavljeno
	ES41	Nepoznat	Španija	EF207429	Gell et al., 2007
	W13	Nepoznat	Španija	EF207428	Gell et al., 2007
	ES45	Nepoznat	Španija	EF207427	Gell et al., 2007
	ES51	Nepoznat	Španija	EF207426	Gell et al., 2007
	ES49	Nepoznat	Španija	EF207425	Gell et al., 2007
	W17	Nepoznat	Španija	EF207424	Gell et al., 2007
	COY2M	Šljiva	Francuska	AF150680	Ioos and Frey, 2000
	VIC3B	Šljiva	Francuska	AF150679	Ioos and Frey, 2000
	COY2N	Breskva	Francuska	AF150678	Ioos and Frey, 2000
	LAI1B	Jabuka	Francuska	AF150677	Ioos and Frey, 2000
	40FG	Dunja	Mađarska	AM 937113	Petróczy and Palkovics, neobj.
	39FG	Dunja	Mađarska	AM 937112	Petróczy and Palkovics, neobj.
	17FG	Breskva	Mađarska	AM 937111	Petróczy and Palkovics, neobj.

Prilog 1. Sekvence ITS rDNK regiona izolata *Monilinia* spp. iz GenBank-NCBI baze podataka korišćene za RFLP i filogenetsku analizu.

Vrsta	Izolat	Biljka domaćin	Lokalitet	Gen Bank pristupni broj	Literaturni navod
<i>M. fruticola</i>	16FG	Jabuka	Mađarska	AM 937110	Petróczy and Palkovics, neobj.
	3FG	Dunja	Mađarska	AM 937109	Petróczy and Palkovics, neobj.
	MAFF 960	Jabuka	Nepoznat	Y17876	Fulton et al., neobjavljeno
	1079	Šljiva	Nepoznat	Z73781	Holst-Jensen et al., 1998
	770.S	Jabuka	Nepoznat	Z73780	Holst-Jensen et al., 1998
	759.K	Jabuka	Nepoznat	Z73779	Holst-Jensen et al., 1998
	2319	kruška	Kina	AB470882	Tian, neobjavljeno
	LHF-1	kruška	Kina	FJ515891	Xia and Yu., neobjavljeno
	IHEM3753	kruška	Nepoznat	FJ515296	Faushe and Jacon, 2008
	Mof 1002	Trešnja	Kina	HQ849461	Wang and Hu, neobjavljeno
	Mof 1001	Japanska šljiva	Kina	HQ849460	Wang and Hu, neobjavljeno
	Mof 0901	Breskva	Kina	HQ849459	Wang and Hu, neobjavljeno
	P164	Nepoznat	Italija	FJ411110	Pellegrino et al., 2009
	P169	Breskva	Italija	FJ411109	Pellegrino et al., 2009
	M 10020029	Breskva	Slovenija	GU967379	Munda and Virscak, 2010
	Daom 231119	Vinova loza	Kanada	AY289185	Sholberg et al., 2003
	P-2	Nepoznat	Nepoznat	KJ131184	Liu et al., neobjavljeno
	NPDU1	Nektarina	Srbija	KC544808	Hrustić et al., neobjavljeno
	NPDU2	Nektarina	Srbija	KC544809	Hrustić et al., neobjavljeno
	LHF1	kruška	Kina	KF516935	Xu, neobjavljeno
	PGHF	jabuka	Kina	KF516934	Xu, neobjavljeno
	TG2-2	Nepoznat	Nepoznat	KC848460	Hao, neobjavljeno
	M1PL	Nepoznat	Poljska	JX312665	Poniatowska et al., 2013
	1325	Nepoznat	Nepoznat	HF678388	Camele, neobjavljeno
	b5103	Nepoznat	Nepoznat	GQ979716	Chen et al., neobjavljeno
	b506	Nepoznat	Nepoznat	GQ979715	Chen et al., neobjavljeno
	b511	Nepoznat	Nepoznat	GQ979714	Chen et al., neobjavljeno
	msb11	Nepoznat	Nepoznat	GQ979713	Chen et al., neobjavljeno
	Nepoznat	<i>Cornus mas</i>	SAD	KJ541032	Backerman and Creswell, neobj.
	Mo-lagarces-01	Japanska šljiva	Čile	KF148610	Latorre et al., 2014
	Mo-lagarces-02	Japanska šljiva	Čile	KF148611	Latorre et al., 2014
	USFQBU-T04	Breskva	Ekvador	JX878906	Solgado et al., neobjavljeno
	USFQBU-C01	Breskva	Ekvador	JX878907	Solgado et al., neobjavljeno
	USFQBU-C03	Breskva	Ekvador	JX878908	Solgado et al., neobjavljeno
	USFQBU-I01	Breskva	Ekvador	JX878909	Solgado et al., neobjavljeno
	USFQBU-I02	Breskva	Ekvador	JX878910	Solgado et al., neobjavljeno
	USFQBU-I03	Breskva	Ekvador	JX878911	Solgado et al., neobjavljeno
	USFQBU-I06	Breskva	Ekvador	JX878912	Solgado et al., neobjavljeno

Prilog 1. Sekvence ITS rDNK regiona izolata *Monilinia* spp. iz GenBank-NCBI baze podataka korišćene za RFLP i filogenetsku analizu.

Vrsta	Izolat	Biljka domaćin	Lokalitet	Gen Bank pristupni broj	Literaturni navod
	USFQBU-P01	Breskva	Ekvador	JX878913	Solgado et al., neobjavljeno
	USFQBU-P02	Breskva	Ekvador	JX878914	Solgado et al., neobjavljeno
	USFQBU-P04	Breskva	Ekvador	JX878915	Solgado et al., neobjavljeno
	USFQBU-P05	Breskva	Ekvador	JX878916	Solgado et al., neobjavljeno
	Nepoznat	Jabuka	Srbija	JN176564	Vasić et al., 2012
	MO-3D	Breskva	Čile	JN001480	Valencia and Latorre, neobjavl.
	Mof-1101	Breskva	Čile	JF930285	Wang and Hu, neobjavljeno
	G1	Kineska višnja	Kina	HQ893748	Xu and Zhu, neobjavljeno
	H1	Kineska višnja	Kina	HQ893747	Xu et al, neobjavljeno
	AFTOL-ID279	Nepoznat	Nepoznat	DQ491506	James et al., neobjavljeno
	BGA.27.04	Nepoznat	Nepoznat	DQ314727	Shnnabel and Chai, neobjavljeno
	DL172.04	Nepoznat	Nepoznat	DQ314728	Shnnabel and Chai, neobjavljeno
	99.2.G5.04	Nepoznat	Nepoznat	DQ314730	Shnnabel and Chai, neobjavljeno
	Hirodai#3266	<i>Prunus mume</i>	Japan	AB125611	Harada et al.,2004
	LMK12	Breskva	Nepoznat	Z73777	Holst-Jensen et al., 1998
	LMK125	Breskva	Nepoznat	Z73778	Holst-Jensen et al., 1998
	NE18	Nepoznat	Novi Zeland	HQ846919	Zhu et al., 2011
	SPT16	Nepoznat	Kina	HQ846920	Zhu et al., 2011
	SFT1	Nepoznat	Kina	HQ846921	Zhu et al., 2011
	BLG3	Nepoznat	Kina	HQ846922	Zhu et al., 2011
	ZJMF1	Nepoznat	Kina	HQ846923	Zhu et al., 2011
	5-10HUANG	Nepoznat	Kina	HQ846924	Zhu et al., 2011
	320020	Nepoznat	Kina	HQ846925	Zhu et al., 2011
	332331	Nepoznat	Kina	HQ846926	Zhu et al., 2011
	BHY1	Nepoznat	Kina	HQ846927	Zhu et al., 2011
	CH2	Nepoznat	Kina	HQ846928	Zhu et al., 2011
	CX3	Nepoznat	Kina	HQ846929	Zhu et al., 2011
	CX25	Nepoznat	Kina	HQ846930	Zhu et al., 2011
	DH41	Nepoznat	Kina	HQ846931	Zhu et al., 2011
	FH1	Nepoznat	Kina	HQ846932	Zhu et al., 2011
	HAG7	Nepoznat	Kina	HQ846933	Zhu et al., 2011
	HEBSM11	Nepoznat	Kina	HQ846934	Zhu et al., 2011
	DA18	Nepoznat	Kina	HQ846935	Zhu et al., 2011
	PBF5	Nepoznat	Kina	HQ846936	Zhu et al., 2011
	PJH2	Nepoznat	Kina	HQ846937	Zhu et al., 2011
	PLY14	Nepoznat	Kina	HQ846938	Zhu et al., 2011
	SLT2	Nepoznat	Kina	HQ846939	Zhu et al., 2011
	T18	Nepoznat	Kina	HQ846940	Zhu et al., 2011
	MFLS1	Nepoznat	Kina	HQ846941	Zhu et al., 2011

Prilog 1. Sekvence ITS rDNK regiona izolata *Monilinia* spp. iz GenBank-NCBI baze podataka korišćene za RFLP i filogenetsku analizu.

Vrsta	Izolat	Biljka domaćin	Lokalitet	Gen Bank pristupni broj	Literaturni navod
<i>M. laxa</i>	LVN8	Nepoznat	SAD	HQ846966	Zhu et al., 2011
	FT	Nepoznat	Francuska	HQ846967	Zhu et al., 2011
	LUC1A	Šljiva	Francuska	AF150673	Ioos and Frey, 2000
	COY1B5	Šljiva	Francuska	AF150674	Ioos and Frey, 2000
	LUC02B1	Šljiva	Francuska	AF150675	Ioos and Frey, 2000
	BUL1A1	Šljiva	Francuska	AF150676	Ioos and Frey, 2000
	sh675	Japanska šljiva	Čile	EU042149	Tian et al., neobjavljeno
	EF8	<i>Centella asiatica</i>	Nepoznat	KJ542644	Vijaya, neobjavljeno
	BPZK	Breskva	Srbija	KC544793	Hrustić et al., neobjavljeno
	KPGG	Kajsija	Srbija	KC544794	Hrustić et al., neobjavljeno
	KPGO	Kajsija	Srbija	KC544795	Hrustić et al., neobjavljeno
	NPSP	Nektarina	Srbija	KC544796	Hrustić et al., neobjavljeno
	NPVI	Nektarina	Srbija	KC544797	Hrustić et al., neobjavljeno
	SPIV	Šljiva	Srbija	KC544798	Hrustić et al., neobjavljeno
	SPSD	Šljiva	Srbija	KC544799	Hrustić et al., neobjavljeno
	TPLC	Trešnja	Srbija	KC544800	Hrustić et al., neobjavljeno
	TPRS	Trešnja	Srbija	KC544801	Hrustić et al., neobjavljeno
	VPJR	Višnja	Srbija	KC544802	Hrustić et al., neobjavljeno
	VPSV	Višnja	Srbija	KC544803	Hrustić et al., neobjavljeno
	BPCO	Breskva	Srbija	KC515383	Hrustić et al., neobjavljeno
	P3	Nepoznat	Kina	HQ846947	Zhu et al., 2011
	MDA12	Nepoznat	Kina	HQ846948	Zhu et al., 2011
	CBS298.31	Nepoznat	Kina	HQ846949	Zhu et al., 2011
	STT2	Nepoznat	Kina	HQ846950	Zhu et al., 2011
	MY11	Nepoznat	Kina	HQ846951	Zhu et al., 2011
	JX9	Nepoznat	Kina	HQ846952	Zhu et al., 2011
	ME1	Nepoznat	Kina	HQ846953	Zhu et al., 201
	JX3	Nepoznat	Kina	HQ846954	Zhu et al., 2011
	ML4	Nepoznat	Kina	HQ846955	Zhu et al., 2011
	BF-SZ-1	Breskva	Kina	HQ908790	Hu et al., 2011
	L2	Nepoznat	Španija	EF153013	Gell et al., 2007
	T3	Nepoznat	Španija	EF153014	Gell et al., 2007
	T5	Nepoznat	Španija	EF153015	Gell et al., 2007
	ES14	Nepoznat	Španija	EF153016	Gell et al., 2007
	ES23	Nepoznat	Španija	EF153017	Gell et al., 2007
	220399/I18-2	Nepoznat	Nepoznat	AY677678	Millar et al., neobjavljeno
	080399/15	Nepoznat	Nepoznat	AY669337	Millar et al., neobjavljeno
	3231	Kruška	Kina	AB470891	Tian et al., neobjavljeno
	Hirodai#2446	<i>Prunus mume</i>	Japan	AB125618	Harada et al., 2004

Prilog 1. Sekvence ITS rDNK regiona izolata *Monilinia* spp. iz GenBank-NCBI baze podataka korišćene za RFLP i filogenetsku analizu.

Vrsta	Izolat	Biljka domaćin	Lokalitet	Gen Bank pristupni broj	Literaturni navod
	1067. K	Jabuka	Nepoznat	Z73784	Holst-Jensen et al., 1998
	1078. K	Nektarina	Nepoznat	Z73785	Holst-Jensen et al., 1998
	1083. K	Trešnja	Nepoznat	Z73786	Holst-Jensen et al., 1998
	1080. K	Trešnja	Nepoznat	Z73787	Holst-Jensen et al., 1998
<i>M. polystroma</i>	2019	Nepoznat	Japan	HQ856916	Zhu et al., 2011
	CBS102686	Nepoznat	Japan	HQ846944	Zhu et al., 2011
	HML-3	Šljiva	Kina	GU067539	Zhu and Guo, 2010
	09-G4	Kajsija	Švajcarska	JN128835	Hilber-Bodmer et al., 2012
	AP1	Jabuka	Poljska	JF820317	Jakubowska et al., neobjavljeno
	M10001264	Nepoznat	Slovenija	KJ814976	Munda, neobjavljeno
	UFT	Jabuka	Mađarska	AM937114	Petróczy and Palkovics, 2009
	MP13	Jabuka	Srbija	JX315717	Vasić et al., 2013

Prilog 2. Hemijski sastav etarskih ulja pitome nane, geranijuma i timijana

Sastojak	RI	% Zastupljenost sastojaka		
		Pitoma nana	Geranijum	Timijan
α -Tujen	922	-	-	0,8
α -Pinen	928	*	0,6	1,6
Kamfen	941	-	-	2,3
β -Pinen	971	0,6	-	*
Mircen	989	-	-	1,6
α -Terpinen	1013	-	-	1,2
para-Cimen	1022	0,3	-	31,7
Limonen	1025	4,1	-	0,7
1,8-Cineol	1027	1,6	-	0,6
γ -Terpinen	1055	-	-	3,4
cis-Sabinen hidrat	1066	1,1	-	*
Linalol	1100	-	5,9	5,9
cis-Roze oksid	1108	-	1,1	-
trans-Roze oksid	1124	-	0,5	-
Kamfor	1140	-	-	2,8
Menton	1150	25,6	2,4	-
izo-Menton	1157	0,5	5,2	-
Mentofuran	1161	5,7	-	-
Borneol	1165	-	-	3,7
Terpinen-4-ol	1175	-	-	0,9
Mentol	1177	48,2	-	-
Citronelol	1234	-	34,4	-
Pulegon	1237	0,5	-	-
Piperiton	1254	1,3	-	-
Geraniol	1259	-	16,8	-
Geranial	1271	-	0,8	-
neo-Mentul acetat	1272	0,5	-	-
Citronelil formijat	1275	-	6,7	-
Geranil formijat	1301	-	3,0	-
iso-Mentil acetat	1305	5,4	-	-
Timol	1306	-	-	32,3
Karvakrol	1322	-	-	4,0
α -Kubeben	1345	-	0,5	-
Cintronelil acetat	1353	-	0,5	-
α -Kopaen	1371	*	0,6	-
Burbonen	1380	*	1,2	-
trans- β -Kariofilen	1414	0,8	1,3	2,1

Prilog 2. Hemijski sastav etarskih ulja pitome nane, geranijuma i timijana (nastavak).

Sastojak	RI	% Zastupljenosti komponenti		
		Pitoma nana	Geranijum	Timijan
β -Kopaen	1424	*	0,5	-
Citronelil propanoat	1442	-	0,5	-
α -Humulen	1448	0,5	*	*
Geranil propanoat	1474	-	0,9	-
Germakren D	1476	-	0,6	-
δ -Kadinen	1519	*	1,4	*
Citronelil butirat	1526	-	0,5	-
Geranil butirat	1559	-	1,2	-
Spatulenol	1575	-	0,5	*
Kariofilen oksid	1579	0,7	1,2	0,6
10-epi- γ - Eudezmol	1616	*	4,4	-
β -Eudezmol	1648	-	1,1	-
Geranil tiglat	1700	-	1,0	-
Monoterpenski ugljovodonici		5,0	0,6	43,3
Oksigenovani monoterpeni		90,3	80,5	50,2
Seksviterpenski ugljovodonici		1,3	6,1	2,1
Oksigenovani seskviterpeni		07	8,2	0,6
Identifikovane komponente		97,3	95,4	96,2
Broj identifikovanih komponenti		16	28	17

Legenda: -nije detektovano

Prilog 3. Isparljivi sastojci autolizata odabranih vrsta familije *Brassicaceae*.

RI ^a	Sastojak	Procenat ^b												Metoda identifikacije ^c
		Kupus	Kupus (Liofilizovan)	Brokoli	Brokoli (Liofilizovan)	Bela rotkva	Bela rotkva (Liofilizovan)	Crna rotkva	Crna rotkva (Liofilizovan)	Slaića	Slaića (Liofilizovan)	Karfiol	Karfiol (Liofilizovan)	
832	2-Metilbuterna kiselina	t	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS
867	Pentanska kiselina	-	t	t	t	-	t	t	t	-	t	-	t	RI, MS, Co-GC
869	Alil-izotiocijanat	t	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS
968	Heksanska kiselina	0,8	0,1	0,9	t	-	t	-	t	-	-	0,9	t	RI, MS, Co-GC
978	Fenol	1,3	t	0,6	t	-	-	-	-	-	-	1,1	t	RI, MS, Co-GC
1004	3,4-Epitiotbutannitril	2,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	MS
1012	(E)-2-Heksenska kiselina	-	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS
1016	α-Terpinen	-	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS, Co-GC
1027	Limonen	5,9	-	7,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS, Co-GC
1035	Benzil alkohol	t	0,3	0,8	t	-	-	-	-	1,8	-	-	-	RI, MS, Co-GC
1043	Fenilacetaldehid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS, Co-GC
1056	β-Terpinen	t	-	1,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS
1067	1-Oktanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS, Co-GC
1068	Heptanska kiselina	-	-	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS, Co-GC
1074	p-Kresol	t	-	t	-	-	t	-	t	10,6	5,4	-	-	RI, MS, Co-GC
1088	α-Terpinolen	1,2	-	1,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS
1103	Nonanal	1,4	t	1,6	t	0,1	-	0,2	0,4	1,6	0,7	-	-	RI, MS, Co-GC
1108	2,2,6-Trimeil-3-keto-6-viniltetrahidropiran	-	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS
1137	trans-Sabinol	-	-	-	-	-	0,5	-	-	-	-	-	-	RI, MS, Co-GC

Prilog 3. Isparljivi sastojci autolizata odabranih vrsta familije *Brassicaceae* (nastavak).

RI ^a	Sastojak	Procenat ^b												Metoda identifikacije ^c
		Kupus	Kupus (Liofilizovan)	Brokoli	Brokoli (Liofilizovan)	Bela rotkva	Bela rotkva (Liofilizovan)	Crna rotkva	Crna rotkva (Liofilizovan)	Slačica	Slačica (Liofilizovan)	Karfiol	Karfiol (Liofilizovan)	
1147	Kamfor	t	55,1	-	-	-	-	-	-	-	0,4	-	-	RI, MS, Co-GC
1169	Borneol	-	t	-	2	-	0,3	-	1,4	-	-	-	-	RI, MS, Co-GC
1171	Oktanska kiselina	4,9	1,7	2,8	2,7	0,1	-	0,4	-	4,8	0,7	8,2	t	RI, MS, Co-GC
1175	Mentol	t	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS, Co-GC
1179	Terpinen-4-ol	t	0,2	-	-	-	-	-	0,4	-	-	-	-	RI, MS, Co-GC
1188	Tuj-3-en-10-al	-	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS
1189	<i>p</i> -Metilacetofenon	t	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS
1190	1-Dodecen	3,1	-	2,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS
1194	á-Terpineol	t	t	t	t	0,2	0,2	-	-	-	-	-	-	RI, MS
1200	Dodecen	t	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS, Co-GC
1201	Metil salicilat	t	-	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS
1205	Dekanal	2,8	0,1	1,8	0,6	0,1	0,4	0,1	0,4	1,6	0,7	0,9	0,6	RI, MS, Co-GC
1222	<i>trans</i> -Karveol	-	-	-	0,6	-	-	-	0,1	-	-	-	-	RI, MS, Co-GC
1234	2-Etil-3-metilmaleimid	-	0,2	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS
1243	3-Fenilpropanenitril	1,2	0,1	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS
1247	Karvon	1,5	0,4	0,5	t	0,1	0,3	0,1	0,3	-	0,5	0,9	0,3	RI, MS
1256	Linalil-acetat	-	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS
1268	Pelargonska kiselina	0,8	0,2	1	0,9	-	0,7	t	0,5	t	0,6	2,5	t	RI, MS, Co-GC
1273	1-Dekanol	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS, Co-GC
1280	3-Metildodekan	-	t	-	0,4	-	0,1	-	-	-	-	-	-	RI, MS

Prilog 3. Isparljivi sastojci autolizata odabranih vrsta familije *Brassicaceae* (nastavak).

RI ^a	Sastojak	Procenat ^b												Metoda identifikacije ^c
		Kupus	Kupus (Liofilizovan)	Brokoli	Brokoli (Liofilizovan)	Bela rotkva	Bela rotkva (Liofilizovan)	Crna rotkva	Crna rotkva (Liofilizovan)	Slačica	Slačica (Liofilizovan)	Karfiol	Karfiol (Liofilizovan)	
1282	<i>trans</i> -Anetol	-	-	-	-	-	-	-	-	1,9	-	1,3	t	RI, MS, Co-GC
1294	Timol	3,7	0,2	2	t	-	-	-	-	0,2	-	-	-	RI, MS, Co-GC
1299	Indol	t	0,3	0,3	0,6	0,1	-	-	-	-	-	1,8	t	RI, MS
1300	Tridekan	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS, Co-GC
1304	Karvakrol	t	t	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS, Co-GC
1308	Undekanal	t	t	t	t	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS
1346	Metil-antranilat	-	1	-	1,8	-	3,9	t	1,1	-	-	0,5	4,0	RI, MS
1362	Eugenol	-	0,5	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS, Co-GC
1366	Dekanska kiselina	-	t	-	0,6	-	0,4	0,1	0,2	-	-	0,8	t	RI, MS, Co-GC
1370	Benzil-izotiocijanat	-	t	t	-	-	-	-	-	9,7	1,3	-	-	RI, MS, Co-GC
1374	1-Undekanol	-	t	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS, Co-GC
1391	3-Metilindol	-	0,3	t	0,8	0,1	-	-	-	-	-	1,1	t	RI, MS
1392	1-Tetradeken	4,8	-	3,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS
1400	Tetradekan	t	t	t	t	-	-	-	-	0,2	-	0,3	t	RI, MS, Co-GC
1406	Vanilin	-	t	t	t	-	0,7	-	0,2	2,1	0,6	0,7	-	RI, MS, Co-GC
1409	Metil-eugenol	0,6	0,7	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS
1409	Dodekanal	0,2	t	0,2	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	RI, MS
1410	Metil- <i>N</i> -metil- antranilat	-	-	-	-	-	0,1	-	-	0,7	-	0,4	-	RI, MS, Co-GC
1432	Metil-undekanoat	-	-	-	t	-	0,3	-	1,1	-	-	-	-	RI, MS
1445	(<i>E</i>)-4-Metiltio-3-butenil- izotiocijanat	-	-	-	-	43,7	17,2	17,1	1,7	-	-	-	-	RI, MS

Prilog 3. Isparljivi sastojci autolizata odabranih vrsta familije *Brassicaceae* (nastavak).

RI ^a	Sastojak	Procenat ^b												Metoda identifikacije ^c
		Kupus	Kupus (Liofilizovan)	Brokoli	Brokoli (Liofilizovan)	Bela rotkva	Bela rotkva (Liofilizovan)	Crna rotkva	Crna rotkva (Liofilizovan)	Slačica	Slačica (Liofilizovan)	Karfiol	Karfiol (Liofilizovan)	
1452	(<i>E</i>)-Geranilaceton	0,5	t	0,3	t	-	-	-	0,1	-	-	-	-	RI, MS
1473	1-Dodekanol	3,1	0,4	2,3	-	t	t	-	0,5	3,5	1,0	-	t	RI, MS, Co-GC
1485	(<i>E</i>)- α -Ionone	t	0,2	0,8	0,5	-	0,2	-	-	-	-	-	-	RI, MS, Co-GC
1495	2-Tridekanon	t	-	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS
1500	Pentadekan	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS, Co-GC
1510	Tridekanal	-	-	t	t	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS
1529	Lilial	t	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS
1535	Dihidroaktinidiolid	t	1,2	0,4	4,1	-	2,2	-	2,2	-	4,1	-	3,2	RI, MS
1561	Dodekanska kiselina	-	0,4	-	1,3	-	0,8	-	-	2,7	0,4	1,5	t	RI, MS, Co-GC
1575	α -Undekalakton	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS
1575	1-Tridekanol	t	-	-	t	-	-	-	-	0,7	-	0,4	-	RI, MS, Co-GC
1590	Kariofilen-oksid	-	2,1	-	-	-	-	-	0,5	-	-	-	-	RI, MS, Co-GC
1591	1-Heksadeken	1,8	-	0,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS
1600	Heksadekan	-	0,3	-	1	0,2	-	-	-	2,4	-	1,6	t	RI, MS, Co-GC
1613	Tetradekanal	1	0,3	0,7	0,9	-	-	-	-	-	-	1,7	1,4	RI, MS
1618	3-Metilsulfinilpropil- izotiocijanat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,3	-	RI, MS
1628	Izopropil-dodekanoat	3,9	0,6	1,7	1,4	0,5	-	0,5	0,9	5,0	1,9	4,0	2,0	RI, MS
1645	Kariofila-4(12),8(13)-dien-5 α -ol	-	-	-	1,6	-	-	-	0,2	-	-	-	-	RI, MS
1658	<i>cis</i> -Metil-dihidrojasmonat	1,7	0,2	0,8	1,1	-	0,7	0,2	0,4	2,5	0,5	-	0,8	RI, MS
1680	1-Tetradekanol	1,4	0,2	1	1,2	-	0,8	0,2	0,5	-	1,0	1,7	1,4	RI, MS, Co-GC

Prilog 3. Isparljivi sastojci autolizata odabranih vrsta familije *Brassicaceae* (nastavak)nnnnnn.

RI ^a	Sastojak	Procenat ^b												Metoda identifikacije ^c
		Kupus	Kupus (Liofilizovan)	Brokoli	Brokoli (Liofilizovan)	Bela rotkva	Bela rotkva (Liofilizovan)	Crna rotkva	Crna rotkva (Liofilizovan)	Slačica	Slačica (Liofilizovan)	Karfiol	Karfiol (Liofilizovan)	
1684	Heksil-salicilat	t	-	0,2	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS
1687	<i>trans</i> -Metil-dihidrojasmonat	t	-	t	t	0,4	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS
1700	Heptadekan	1,2	-	0,8	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	RI, MS, Co-GC
1701	2-Pentadekanon	-	0,3	-	0,8	-	-	-	-	-	0,0	-	-	RI, MS
1705	Pristan	0,5	t	0,4	t	-	0,3	-	0,1	-	0,2	-	-	RI, MS
1715	Pentadekanal	1,7	0,6	2,1	1,4	-	-	-	-	-	-	-	t	RI, MS
1725	Metil-tetradekanoat					0,1	-	0,2	-	-	-	-	-	RI, MS, Co-GC
1748	(<i>E</i>)-2-Heksilcinamaldehyd	0,7	t	0,6	t	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS
1764	Tetradekanska kiselina	-	0,2	-	t	-	0,8	-	-	2,1	-	2,0	-	RI, MS, Co-GC
1765	Sulforafan	-	-	2,2	t	-	-	-	-	-	-	-	-	MS
1772	Loliolid	t	2,9	1,6	7,4	t	7,8	-	5,4	-	7,3	-	7,6	MS
1795	Etil-tetradekanoat	-	-	-	-	-	-	-	-	6,3	-	2,4	t	RI, MS, Co-GC
1800	Oktadekan	1,3	0,2	0,9	0,7	0,1	-	-	-	1,1	0,3	0,6	0,6	RI, MS, Co-GC
1809	Fitan	0,6	t	0,6	t	-	-	-	0,2	1,6	-	-	-	RI, MS
1812	Indol-3-acetonitril	t	0,5	0,5	1,5	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS
1817	Heksadekanal	0,9	-	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS, Co-GC
1818	Indol-3-karboksaldehid	-	t	t	t	-	-	-	-	-	-	-	-	MS
1827	Izopropil- tetradekanoat	3,3	0,3	2	2,3	0,8	2,2	0,5	1,5	7,5	2,4	3,4	3,1	RI, MS
1842	Neofitadien (izomer I)	18,3	10,6	17,1	23,6	4,0	17,7	2,6	10,8	-	37,7	27,6	37,1	RI, MS
1846	Heksahidrofarnezil-aceton	t	-	t	4,5	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS, Co-GC

Prilog 3. Isparljivi sastojci autolizata odabranih vrsta familije *Brassicaceae* (nastavak).

RI ^a	Sastojak	Procentat ^b												Metoda identifikacije ^c
		Kupus	Kupus (Liofilizovan)	Brokoli	Brokoli (Liofilizovan)	Bela rotkva	Bela rotkva (Liofilizovan)	Crna rotkva	Crna rotkva (Liofilizovan)	Slačica	Slačica (Liofilizovan)	Karfiol	Karfiol (Liofilizovan)	
1858	Dihidrohalkon	2,2	-	1,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	MS
1866	Neofitadien (izomer II)	2,7	1,6	2,6	5	0,6	16,0	0,4	1,3	3,0	6,1	3,4	5,8	RI, MS
1880	1-Heksadekanol	-	-	-	-	-	-	-	-	1,5	-	-	-	RI, MS, Co-GC
1884	Neofitadien (izomer III)	5,3	3	5,4	8	1,2	4,5	0,9	2,8	5,2	11,0	7,6	11,2	RI, MS
1900	Nonadekan	1	0,2	1,1	0,8	0,1	-	0,1	0,1	-	-	-	-	RI, MS, Co-GC
1922	(<i>E,E</i>)-Farnezil-aceton	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS
1928	Metil-heksadekanoat	t	t	0,7	1,1	6,2	1,1	11,1	7,1	t	1,2	t	1,3	RI, MS, Co-GC
1969	Miristinska kiselina	-	1,1	-	1	-	-	-	-	-	-	1,3	-	RI, MS, Co-GC
1996	Etil-heksadekanoat	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS, Co-GC
2000	Eikozan	0,4	0,4	0,4	0,8	0,1	0,3	0,1	0,3	1,5	0,5	0,8	0,7	RI, MS, Co-GC
2026	Izopropil-heksadekanoat	t	t	0,4	0,7	-	0,6	0,1	-	-	0,9	-	1,0	RI, MS, Co-GC
2088	1-Oktadekanol	t	t	t	t	-	-	-	0,1	-	0,4	0,4	0,5	RI, MS
2096	Metil-linoleat	-	t	1	-	22,2	0,4	31,1	13,7	-	0,4	-	-	RI, MS
2100	Heneikozan	t	0,3	t	1,1	-	-	-	0,0	0,0	0,8	0,8	0,9	RI, MS, Co-GC
2102	Metil-oleat	-	t	1,2	-	12,0	t	22,5	15,6	t	t	t	-	RI, MS
2118	(<i>E</i>)-Fitol	3,4	1,2	6,6	3,1	0,5	8,9	0,9	-	2,1	1,0	-	2,1	RI, MS, Co-GC
2128	Metil-stearat	-	-	0,5	t	1,4	0,2	3,6	2,5	-	-	-	-	RI, MS
2149	Linoleinska kiselina	-	2,9	-	t	-	-	-	-	0,3	-	-	-	RI, MS, Co-GC
2200	Dokozan	t	0,2	0,3	0,5	0,1	0,4	0,2	0,4	1,9	0,7	-	1,3	RI, MS, Co-GC
2221	(<i>E</i>)-Fitol-acetat	-	-	t	t	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS

Prilog 3. Isparljivi sastojci autolizata odabranih vrsta familije *Brassicaceae* (nastavak).

RI ^a	Sastojak	Procenat ^b												Metoda identifikacije ^c
		Kupus	Kupus (Liofilizovan)	Brokoli	Brokoli (Liofilizovan)	Bela rotkva	Bela rotkva (Liofilizovan)	Crna rotkva	Crna rotkva (Liofilizovan)	Slačica	Slačica (Liofilizovan)	Karfiol	Karfiol (Liofilizovan)	
2231	Sklaerol	-	-	-	1,7	-	-	-	-	-	-	-	-	RI, MS
2300	Trikozan	t	0,2	0,3	0,6	0,1	0,4	0,2	0,4	1,7	0,6	1,0	0,9	RI, MS, Co-GC
2823	3,3'-Diindolilmetan	1,2	0,3	3,1	0,5	-	0,1	0,1	-	-	-	-	-	MS
Total		93,7	95,4	95,4	92,1	95,0	95,0	93,5	92,8	87,8	92,7	87,3	87,8	

Legenda: ^a Eksperimentalno određeni retencioni indeksi na DB-5MS koloni; ^b srednja vrednost tri analize; RI-upoređivanjem eksperimentalnodobijenih vrednosti retencionih indeksa sa literaturnim podacima (**Adams, 2007**); MS-upoređivanjem masenih spektara sa spektrima iz biblioteke; Co-GC-GC koinjektiranjem standardnih supstanci; t-u tragovima ($p < 0,05$); -nije detektovano.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani Miljan Vasić

Broj indeksa 33/09

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

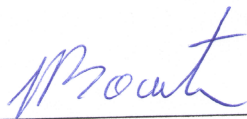
KARAKTERIZACIJA *Monilinia* spp. PATOGENA PLODOVA JABUKE U SRBIJI

I RAZLIČITI ASPEKTI NJIHOVE KONTROLE

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

Potpis doktoranta

U Beogradu, 14.03.2016



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Miljan M. Vasić

Broj indeksa 33/09

Studijski program Poljoprivredne nauke Modul: Fitomedicina

Naslov doktorske disertacije KARAKTERIZACIJA *Monilinia*
spp. PATOGENA PLODOVA JABUKE U SRBIJI I RAZLIČITI
ASPEKTI NJIHOVE KONTROLE

Potpisan Miljan M. Vasić

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

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

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

Potpis doktoranta

U Beogradu, 14.03.2016.



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković” da u digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorku disertaciju pod naslovim:

KARAKTERIZACIJA *Monilinia* spp. PATOGENA PLODOVA JABUKE U SRBIJI

I RAZLIČITI ASPEKTI NJIHOVE KONTROLE

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju disertaciju pohranjenu u digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlucio.

1. Autorstvo

2. Autorstvo – nekomercijalno

③. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima

5. Autorstvo – bez prerade

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

Potpis doktoranta

U Beogradu, 14.03.2016.

