

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Број захтева: 356/9-6.3.
Датум: 26.06.2013. године

ВЕЋЕ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ
БИОТЕХНИЧКИХ НАУКА

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на извештај о урађеној докторској дисертацији

Молимо да, сходно члану 46. став 5. тачка 4. Статута Универзитета у Београду (“Гласник Универзитета” број 131/06), дате сагласност на извештај о урађеној докторској дисертацији кандидата мр Петра Митровића.

Кандидат **мр Петар (Максим) Митровић**, пријавио је докторску дисертацију под називом: «Морфолошка и молекуларна карактеризација патогена проузроковача рака круне и стабла уљане репице и епидемиологија обољења»,

из научне области Заштита биља.

Универзитет је дана 16.07.2008. године, својим актом 01 број 612-31/50-08 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила: «**Морфолошка и молекуларна карактеризација и идентификација гљиве узрочника рака стабла уљане репице у Србији**».

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације мр Петра Митровића, образована је на седници одржаној 24.04.2013. године, одлуком Факултета број 356/7-5.1., у саставу:

име и презиме члана комисије, звање, научна област

1. др Мирко Ивановић, редовни професор, Фитопатологија,
2. др Алекса Обрадовић, редовни професор, Фитопатологија,
3. др Ана Марјановић-Јеромела, виши научни сарадник, Биотехничке науке,
4. др Војислав Трукуља, ванредни професор, Фитопатологија,
5. др Ивана Вицо, доцент, Фитопатологија.

Наставно-научно веће Пољопривредног факултета прихватило је извештај Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације, на седници одржаној 26.06.2013. године.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

Проф. др Милица Петровић

Универзитет у Београду
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Број: 356/9-6.3.
Датум: 26.06.2013. године
БЕОГРАД-ЗЕМУН

На основу члана 128. Закона о високом образовању и члана 73. Статута Пољопривредног факултета, Наставно-научно веће Факултета на седници одржаној 26.06.2013. године, донело је

О Д Л У К У

I ПРИХВАТА СЕ извештај о позитивној оцени урађене докторске дисертације коју је поднео **мр ПЕТАР МИТРОВИЋ** и одобрава јавна одбрана дисертације по добијању сагласности од Универзитета, под насловом: **«МОРФОЛОШКА И МОЛЕКУЛАРНА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА И ИДЕНТИФИКАЦИЈА ГЉИВЕ УЗРОЧНИКА РАКА СТАБЛА УЉАНЕ РЕПИЦЕ У СРБИЈИ».**

II Универзитет је дана 16.07.2008. године, својим актом 01 број 612-31/50-08 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације.

III Рад кандидата у часопису међународног значаја:

Mitrović P., Orčić D., Sakač Z., Marjanović-Jeromela A., Grahovac N., Milošević D., Marisavljević D. (2012): Characterization of sirodesmins isolated from the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. Journal of the Serbian Chemical Society 77 (10): 1363–1379.

**ПРЕДСЕДНИК
НАСТАВНО-НАУЧНОГ ВЕЋА
ДЕКАН**

(Проф. др Милица Петровић)

Доставити: кандидату, ментору др Мирку Ивановићу, редовном професору, Институту за фитомедицину, Студентској служби и архиви.

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ ПОЉОПРИВРЕДНОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

**Предмет: Извештај Комисије о оцени урађене докторске дисертације
мр Петра М. Митровића**

Одлуком Наставно-научног већа Пољопривредног факултета Универзитета у Београду бр.356/7-5.1. од 24.04.2013.године, именована је Комисија у саставу: др Мирко Ивановић, ред. проф. Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, др Алекса Обрадовић, ред. проф. Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, др Ана Марјановић–Јеромела, виши научни сарадник Института за за ратарство и повртарство Нови Сад, др Војислав Тркуља, ван. проф. Пољопривредног факултета Универзитета у Бања Луци и др Ивана Вицо, доцент Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, за оцену и одбрану урађене докторске дисертације мр Петра М. Митровића, стручног сарадника Института за за ратарство и повртарство Нови Сад, под насловом: „Морфолошка и молекуларна карактеризација и идентификација гљиве узрочника рака стабла уљане репице у Србији“.

Именована Комисија прегледала је и оценила ову докторску дисертацију и о томе подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација **мр Петра М. Митровића**, написана је на 103 стране куцаног текста. У оквиру ове докторске дисертације приказане су 5 табела, 2 графикана и 61 слика. Приликом израде ове докторске дисертације проучено је и цитирано 131 извор литературе. Испред основног текста дисертације налази се резиме дисертације на српском и енглеском језику, са кључним речима и садржај докторске дисертације, док се иза основног текста налазе биографија.

Докторска дисертација садржи девет основних поглавља: 1. Увод (стр. 1-3), 2. Циљ истраживања (стр. 4), 3. Радна хипотеза (стр.5), 4. Преглед литературе (стр. 6-14), 5. Материјал и методе рада (стр. 15 - 26), 6. Резултати истраживања (стр. 27-76), 7. Дискусија (стр. 77-89), 8. Закључак (стр. 90-91) и 9. Литература (стр. 92-103). Поглавља Преглед литературе, Материјал и методе, Резултати истраживања и дискусија садрже више подпоглавља.

2. Приказ и анализа докторске дисертације

2.1.Увод

У оквиру **увода** истакнут је привредни значај уљане репице (*Brassica napus* L.) и наведене патогене гљиве: *Plasmodiophora brassicae* Wor. *Peronospora parasitica* (Pers.) Fr. *Alternaria brassicae* (Berk.) Sacc, *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. de Not,

Leptosphaeria biglobosa Shoem and Brun, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, *Botrytis cinerea* Pers, *Erisiphe cruciferarum* Opix ex Junell i neke druge, које у зависности од климатских и других фактора могу проузроковати мање или веће штете на биљкама уљане репице. Од свих наведених врста, а на основу литературних података патогене гљиве *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. de Not анаморфни стадијум: *Phoma lingam* (Tode ex Fr.) Desm и *Leptosphaeria biglobosa* Shoem and Brun су економски најважнији паразити уљане репице у великом броју земаља (Западна Европа, Аустралија и Северна Америка). Обе врсте проузрокују рак стабла уљане репице, односно симптоме обољења могу изазвати од ницања па све до зрења. Опширно је приказан значај и економске штете на уљаној репици у Канади, Великој Британији, Аустралији и Немачкој, као и епидемиологија патогена у наведеним земљама. Такође, наведено је присуство патогене гљиве у Србији и описана појава симптома у зависности од временских услова, без значајних економских штета. На основу изнетих чињеница ова истраживања треба да допринесу потпунијем сагледавању рака стабла уљане репице, с обзиром да ова болест код нас није детаљније проучавана.

2.2 Циљ истраживања

Недовољна сазнања о јачини и интензитету болести проузроковане врстама рода *Leptosphaeria* на уљаној репици, као и недостатак морфолошких и молекуларних истраживања врста овог рода у нашој земљи су указали на потребу њиховог свестранијег и детаљнијег проучавања. Циљ ових истраживања је био да се утврди распрострањеност и значај обољења у свету и код нас, потом да се потврде постојећа и истакну нова сазнања о наведеним патогенима проучавањем морфолошких и молекуларних карактеристика. Део истраживања се односио на идентификацију патогена, њихову изолацију, идентификацију фитотоксина и најзад дефинисање њиховог утицаја на настанак болести. Добијени резултати истраживања дефинисали су и патогене групе унутар врсте, начине ширења паразитних гљива и степен остварења примарних инфекција. Наведена истраживања допринела су брзој и поузданој идентификацији *Leptosphaeria* врста на уљаној репици у Србији.

2.3. Преглед литературе

У поглављу **преглед литературе**, које има пет подпоглавља наведена су бројна истраживања домаћих и страних аутора који су груписани према проучаваним особинама и параметрима обухваћеним овим истраживањима. Наведени литературни извори обухватају резултате, открића, закључке и практичну примену током претходног периода. У подпоглављу распрострањеност и значај су наведена бројна истраживања о присуству паразитних гљива *Leptosphaeria maculans* и *Leptosphaeria biglobosa* на свим континентима и економски значај наведених паразита у многим земљама. Такође се наводи и присуство патогена на простору бивше Југославије на различитим биљним врстама из фамилије *Brassicaceae*. У подпоглављу симптоми су изнети опис, време и појава симптома на уљаној репици у многим земљама. У трећем подпоглављу је описана прва појава гљиве на мртвим стаблима купуса под називом *Sphaeria lingam*, циклус развоја, као и епидемиологија паразитних гљива. У четвртм подпоглављу су приказане разлике у патогености врста, продукцији фитотоксина, молекуларним карактеристикама као и постојање патогених група унутар врсте односно подгрупа у оквиру врсте *Leptosphaeria biglobosa*. Такође, у овом подпоглављу је

наведена могућност идентификације врста и подврста унутар *Leptosphaeria* комплекса заснована на ITS рестрикционом профилу коришћењем 5 ензима *AluI*, *BamHI*, *HaeIII*, *EcoRII* и *RsaI*. У последњем подпоглављу у оквиру морфолошких карактеристика дат је опис боје, облика и изгледа колоније као и грађа, облик и величина спорозоитних органа. Овим прегледом литературе обухваћен је знатан део досадашњих научних сазнања о паразитним гљивама *Leptosphaeria maculans* и *Leptosphaeria biglobosa* те је постављена полазна основа за истраживања у овој дисертацији. Наведени су радови, публикације и студије које су указале на значај предмета ових истраживања и расветљавању наведене проблематике. Уједно ова истраживања су допринела примени одговарајућих метода у идентификацији патогена уљане репице код нас.

2.4. Радна хипотеза

У поглављу **радна хипотеза** наведене су основне претпоставке које су биле полазна основа у овој докторској дисертацији. Као прво, претходна истраживања која су спроведена код нас, осим појаве и присуства анаморфног стадијума гљиве друге карактеристике нису детаљније проучаване. Друго, нема прецизних података о распрострањености и учесталости појаве болести изазване *Leptosphaeria* врстама у производним локалитетима Србије. Треће, велика је непознаница о постојању телеоморфног стадијума, начину и путевима ширења паразитних гљива, као и да ли су присутне све досад пронађене патогене групе унутар *Leptosphaeria* врста. Претпоставило се, а током израде докторске дисертације и потврдило да ће морфолошка и молекуларна истраживања допринети унапређењу метода детекције и идентификације патогених врста *Leptosphaeria* комплекса у нашој земљи.

2.5. Материјал и методе рада

Поглавље **материјал и методе рада** подељен је у дванаест подпоглавља. Овим подпоглављима су обухваћене методе испитивања које су спроведене у фитопатолошкој, хемијској и биотехнолошкој лабораторији. Културе *Leptosphaeria* врста изоловане су из оболелих биљних делова уљане репице, који су прикупљени из 9 локалитета са подручја Србије у периоду од 2008. до 2010. године. У подпоглављу изолација гљива и добијање моноспорних култура описан је поступак изолације из биљног материјала, методе које су коришћене за добијање чистих култура и моноспорних изолата, чување изолата и њихова ревитализација. Наведеним методама добијено је укупно 119 изолата. Свих 119 изолата изоловано је са уљане репице. У испитивањима као референтни су коришћена и два изолата *Leptosphaeria maculans* и *Leptosphaeria biglobosa*, добијена из центра за пољопривредна истраживања Rothamsted у Великој Британији. У подпоглављу **морфолошке карактеристике** на ПДА подлози испитиване су макроскопске и микроскопске одлике изолата гљива (Muntanjola-Cvetković, 1987). У подпоглављу **доказивање постојања телеоморфног стадијума гљиве**, испитивања су спроведена на два начина: постављањем Burkard-овог хватача спора у близини жетвених остатака (McGee 1977, Thürwächter *et al.*, 1999). Преглед трака вршен је сваких 7 дана. Поред овог начина, стабљике узете са поља су након бинокуларног прегледа стављене у пластичне кесе под контролисаним условима. Након појаве аскоспора извршено је микроскопско мерење псеудотеција, аскуса и аскоспора и проучена грађа и облик аскоспора. Поред морфолошких, испитивана су и патогена својства аскоспора. На посејане биљке у цифи саксијама нанета је суспензија аскоспора

(Koch *et al.*, 1989). Оглед је постављен у три понављања, а појава симптома је праћена у наредних двадесет дана.

Формирање псеудотеција и аскоспора у лабораториским условима урађено је по методи Petrie и Lewis (1985), и Mengistu и сарадника (1995) уз одређене модификације. Међусобна укрштања изолата приказана су табеларно, а образовање псеудотеција је праћено у наредних десет недеља. У подпоглављу **образовање пигмента у течной Czapek-овој подлози**, испитивања су урађена по McGee и Petrie (1978). образовање пигмента је праћено у наредне четири недеље. У подпоглављу **екстракција, изолација и карактеризација фитотоксина** коришћено је пет изолата који су понаособ засејани у течну Czapek-ову подлогу (McGee & Petrie, 1978), а након тридесет дана извршена је екстракција фитотоксина (Koch *et al.*, 1989, Pedras & Bisesenthal, 2001). С обзиром да су детектоване мрље на ТЛЦ-плочи (Koch *et al.*, 1989) поступак је поновљен за препаративно изоловање фитотоксина. Добијени етанолни филтрат је коришћен за идентификацију фитотоксина LC-MS-MS методом и фитотоксичним тестом. У подпоглављу **идентификација фитотоксина LC-MS-MS методом** етанолни филтрат је испитан техником течне хроматографије са тандемском масеноспектрометријском детекцијом. Коришћен је иструмент Agilent Technologies series 1200 Rapid Resolution Liquid Chromatograph, упарен са Agilent Technologies series 6410A Triple – Quad масеним детектором са електроспреј јонским извором. Сви добијени подаци одређени су у MassHunter Workstation-Qualitative Analysis (ver.B.03.01) софтверу (Agilent Technologies). У подпоглављу **испитивање фитотоксичности** извршено је наношење фитотоксина на повређени део котиледона, детектованих LC-MS-MS анализом (Koch *et al.*, 1989, Bodawy & Норре, 1989). Оцена симптома је вршена после два дана по скали (Bodawy & Норре, 1989). Подпоглавље **одређивање патогених група** (ПГ1, ПГ2, ПГ3, ПГ4) у Србији урађено је по методи Koch-а и сарадника (1991), Mengistu и сарадника (1991), Chen & Fernando (2006) на диференцијалном сету сорти (Westar, Quinta и Glacier) наношењем суспензије пикноспора на повређени део котиледона, а оглед је оцењен по скали (Koch *et al.*, 1991). У подпоглављу **преношење патогена семеном** извршено је потапање семена сорте Quinta у суспензију пикноспора и мицелије. Појава симптома на котиледонима и хипокотилу оцењивана је после седам и четрнаест дана. Оглед је постављен у шест понављања, а патогеност испитиваних изолата гњива у односу на контролну варијанту је тестирана применом Dunett-овог теста. У подпоглављу **молекуларна карактеризација** екстракција ДНК је извршена:

- по O’Gorman *et al.*, (1994), уз одређене модификације по Kuusk *et al.*, (2002);
- по Day & Shattock (1997);

За извођење PCR (ланчана реакција полимеразе) анализе коришћени су следећи прајмери: APH12 прајмери по методи Sambrook и сарадника, (1989) (*loc. cit.* Kuusk *et al.*, 2002) који амплификују (умножавају) фрагмент око 1900 bp (*L. biglobosa*), LMR1 прајмери по Taylor & Borgmann (1994), који амплификују фрагмент око 580 bp и користе се за идентификацију групе А изолата (*L. maculans*) и PN3 и PN10 прајмери по Balesdent и сарадницима (1998), који амплификују фрагмент око 580 bp (*L. biglobosa*) и 560 bp (*L. maculans*). У подпоглављу **PCR-RFLP анализа** која је урађена по методи Balesdenet и сарадника (1998) уз препоруке произвођача (Fermentas life science) дигестовано је десет микролитара PCR продукта са рестрикционим ензимима BamHI, HaeIII, RsaI, EcoRI и AluI. У овој анализи коришћени су следећи изолати *L. biglobosa*: референтни изолат *L. biglobosa* K-111, K-112, K-113, K-114, K-115, K-116, K-2, St-16, GS-25, L-5, C-3, LJ-2, S-1, као и референтни изолат *L. maculans*. PCR-RFLP анализа је спроведена ради идентификације изолата (*L. biglobosa*) из Србије односно којој подгрупи припадају и на основу чега је могуће извршити раздвајања изолата *L. maculans* од *L. biglobosa*.

2.6. Резултати истраживања

У поглављу **резултати истраживања** кандидат је на прегледан начин, кроз табеле, графиконе и слике, приказао најбитније резултате до којих је у својим истраживањима дошао. Ово поглавље је највеће и подељено је на 11 подпоглавља.

Симптоми на природно зараженим биљкама (корен, приземно стабло, горњи део стабла и грана, лист, цвет и љуска) и семену уљане репице детаљно су описани и документовани оргиналним фотографијама (прво подпоглавље). У подпоглављу **морфолошке карактеристике проучаваних изолата** дат је детаљан опис макроскопских и микроскопских особина, што је приказано оргиналним фотографијама. На крају подпоглавља табеларно су приказане одгајивачке и морфолошке карактеристике на основу којих се могу уочити све разлике код испитиваних изолата, којој врсти припадају у оквиру рода *Leptosphaeria* изолованих са уљане репице. Применом Burkard-овог хватача спора у подпоглављу **доказивање постојања телеоморфног стадијума гљиве** утврђено је присуство аскоспора и у нашој земљи. У нашим агроеколошким условима поред јесењег периода ослобађање аскоспора је регистровано и током пролећног дела. Изглед, грађа, облик и величина псеудотеција, аскус и аскоспора детаљно је описана и документована оргиналним фотографијама. У подпоглављу **инфективност аскоспора** утврђена је патогеност аскоспора на котиледонима уљане репице сорте Банаћанка код сва три начина инокулације која је документована оргиналном фотографијама. Такође, утврђена је прва појава симптома, као и појава плодоносних тела (пикниди) гљиве у оквиру пега насталих вештачком инокулациом котиледона. У подпоглављу **образовање псеудотеција и аскоспора у лабораториским условима** табеларно је приказано између којих укрштаних изолата су се формирале псеудотеције и аскоспоре, само псеудотеције односно одсуство плодоносних тела код укрштања изолата *L. maculans* са изолатима *L. biglobosa*. Начин укрштања и изглед псеудотеција образваних у лабораторијским условима документован је оргиналним фотографијама. У подпоглављу **образовање пигмента у течной Czapek-овој подлози** утврђено је да изолати *L. maculans* St-5, C-3, S-11 не стварају жуто-мрки пигмент у односу на K-113 и K-115 који пигментирају подлогу, што је документовано оргиналном фотографијом. На основу спроведених испитивања изолати St-5, C-3, S-11 могу се идентификовати као врста *Leptosphaeria maculans*, док K-113 и K-115 припадају врсти *Leptosphaeria biglobosa*. Подпоглавље **екстракција, изолација и карактеризација фитотоксина** може се поделити у два дела. У првом делу из филтрата културе су издвојене етил ацетатне фракције на ТЛЦ плочу и израчунате Rf вредности, што је документовано оргиналном фотографијом. На основу танкослојне хроматографије и Rf вредности извршено је препаративно изоловање фитотоксина за LC-MS-MS анализу. У другом делу течном хроматографиом идентификовани су фитотоксини-сиродезмини, приказане структурне формуле ових једињења, а све је документовано оргиналним фотографијама. У подпоглављу **испитивање фитотоксичности** добијена је фититоксична активност идентификованих сиродезмина LC-MS-MS анализом, која је документована оргиналном фотографијом. У подпоглављу **одређивање патогених група** описани су симптоми на инокулисаним котиледонима и табеларно је приказано да су у Србији присутне све четири патогене групе (ПГ). Од 119 испитиваних изолата 8 припада ПГ1, 5 припада ПГ2, 22 припада ПГ3 и 84 припада ПГ4. У подпоглављу **преношење патогена семеном** описани су симптоми на инокулисаним биљкама, што је документовано одговарајућим фотографијама, а патогеност изолата је тестирана применом Dunett-овог теста. У подпоглављу **молекуларна карактеризација** утврђено је да прајмери APN12 нису умножавали фрагменте код испитиваних изолата. Прајмери

LMR1 умножавају фрагменте величине 580 bp код изолат *L. maculans* и изолат *L. Biglobosa*, када је екстракција ДНК рађена по Day & Shattock (1997) исти прајмери не умножавају фрагменте код изолат *L. biglobosa* када је екстракција ДНК рађена по O’Gorman *et al.*, (1994), уз одређене модификације по Kuusk *et al.*, (2002). Прајмери PN3 и PN10 умножавају фрагменте чија је дужина трака 560 bp код изолат *L. maculans*, и 580 bp код изолат *L. biglobosa*. На основу PCR реакције извршена је идентификација *Leptosphaeria* комплекса у Србији. PCR-RFLP анализа производа указала је на рестрикционе профиле који су јасно разликовали изолате *L. biglobosa* од изолат *L. maculans*. Такође, на основу PCR-RFLP анализе сви изолати *L. biglobosa* припадају подгрупи NA1.

2.7. Дискусија

Добијени резултати дискутовани су у оквиру 7 подпоглавља уз концизна тумачења. Симптоми и економски значај болести упоређени су са симптомима који су забележени од стране других аутора. У подпоглављу **морфолошке карактеристике проучаваних изолат** проучене су макроскопске и микроскопске одлике испитиваних изолат и упоређене са резултатима (Williams & Fitt, 1999., Fitt *et al.* 2006, Pound, 1947., Humpherson-Jones, 1986., Mitrović i Marinković, 2007). Облик и величина пикноспора указује на сличност претходних истраживања (Punithalingam & Holliday, 1972., Hong *et al.*, 2009). У подпоглављу **доказивање постојања телеоморфног стадијума гљиве** дискутовани су резултати о присуству телеоморфног стадијума гљиве код нас, време образовања псеудотеција и ослобађања аскоспора, симптомима, начину и почетним инфекцијама, величини, облику и грађи аскоспора са резултатима Kuusk-а и сарадника (2002), Boker-а и сарадника (1975), Petrie-а (1978), Gladders & Musa (1980), Hall-а (1992), Mahuku и сарадника (1996), McGee-а (1974), West-а и сарадника (1999), Pérès & Poisson-а (1997), Korolewski и сарадника (2002), Thürwächter-а сарадника (1999), Jedryczka и сарадника (1999b) у другим земљама. Такође, у овом подпоглављу дискутовани су резултати о формирању или одсуству псеудотеција и аскоспора у лабораторијским условима са претходним истраживањима. У подпоглављу **образовање пигмента у течной Czapek-ovoj подлози** добијени резултати у овим истраживањима указују да изолати из групе А не стварају жуто-мрки пигмент у односу на групу Б, што је у сагласности са резултатима Bonman-а и сарадника (1981), Koch-а и сарадника (1989), Williams & Fitt-а (1999), Kuusk-а и сарадника (2002). У подпоглављу **доказивање фитотоксина** на основу танкослојне хроматографије и Rf вредности насумично одабрани изолати *L. maculans* стварају фитотоксине у течной Czapek-ovoj подлози у односу на изолат *L. biglobosa*, што је у складу са резултатима Koch-а и сарадника, (1989), и Badaway & Hoppe (1989). У овим истраживањима LC-MS-MS анализом идентификовани су сви до сада познати сиродезмини које ствара патогена врста *L. maculans*. На инокулисаним котиледонима највећу фитотоксичност су испољиле тачке 2б и 2ц у којима је анализом откривено највеће присуство сиродезмина ПЛ и Ц што је у сагласности са резултатима Badaway & Hoppe (1989), Pedras & Seguin-Swartz-а (1992), Pedras и сарадника (2007), Pedras и сарадника (2008a), Pedras и сарадника (2008b). У подпоглављу **одређивање патогених група** показало се да су код нас присутне све патогене групе као и у другим земљама (Канада, Аустралија, САД, Француска). Код нас преовлађује група ПГ4 што је слично са резултатима Kuusk-а и сарадника (2002), и Mahuku и сарадника (1997) у Шведској и Канади, док нпр.у Француској је доминантна ПГ3 (Ansan-Melayah *et al.*, 1997., Penaud *et al.*, 1999a). У подпоглављу **преношење патогена семеном** приказани су и дискутирани резултати о

ширењу паразитне гљиве семеном уљане репице што је чест симптом у Аустралији (Barbetti & Khangura loc. cit. West *et al.*, 2001., West *et al.*, 2001) као и у другим земљама (Petrie, 1979b, Hall 1992, Hall *et al.*, 1996). У подпоглављу **молекуларна карактеризација** у спроведеним молекуларним испитвањима није добијена амплификација ДНК са прајмерима APH12 код изолата *L. Biglobosa*, што је у сагласности са резултатима Kuusk-а и сарадника (2002) за изолате из Канаде, али не и за европске изолате. Умножавње фрагмената са LRM1, PN3 и PN10 прајмерима добијена је дужина трака која је у сагласности са другим ауторима (Kuusk *et al.*, 2002, Balesdent *et al.*, 1998). Полиморфизам рестрикционих фрагмената добијен коришћењем рестрикционих ензима омогућио је идентификацију испитиваних изолата пореклиом из Србије. Поред разликовања изолата на нивоу врста добијени полиморфизам рестрикционих фрагмената ензимима *HaeIII*, *EcoRII* и *AluI* показује да сви испитивани изолати припадају врсти *Leptosphaeria biglobosa* подгрупа NA1 која је доминантна на Европском континенту, што је у складу са резултатима Balesdent-а и сарадника (1998), Gall-а и сарадника (1995), Jedryczka и сарадника (1999), и Fitt-а и сарадника (2006).

2.8. Закључак

У поглављу **закључак** кандидат сумира резултате своје докторске дисертације и истиче у кратким цртама најважније чињенице до којих је дошао у својим истраживањима. Истраживања су потврдила широку распрострањеност болести на целој територији Србије. Захваљујући примереној методологији извршена је успешна карактеризација добијених изолата у испитиваним узорцима. Поређењем морфолошких, патогених и молекуларних карактеристика може се закључити да су у оквиру рода *Leptosphaeria* у Србији присутне следеће врсте: *L. maculans* и *L. biglobosa*.

У морфолошком погледу од 12 изолата 5 изолата (K-112, K-113, K-114, K-115 и K-117) има правилан и брз пораст на ПДА подлози у односу на изолате L-10, LJ-3, K-8, GS-27, St-12, S-2 и C-5. Мицелија свих изолата је прљаво беле боје. Величина, облик и боја код свих изолата је иста с тим да је величина пикнида нешто мања код K-112, K-113, K-114, K-115 и K-117. Изолати L-10, LJ-3, K-8, GS-27, St-12, S-2 и C-5 на ПДА подлози обилније спорулишу у односу на K-112, K-113, K-114, K-115 и K-117. Поред конидијског, гљива образује и савршени стадијум у облику псеудотеција са аскусима и аскоспорама.

У течној Czapek-овој подлози изолати K-113 и K-115 продукују жутомрки пигмент, док St-5, C-3 и S-11 не продукују пигмент, али стварају фитотоксине. У овим испитивањима доказано је да изолати *L. maculans* St-5, C-3 и S-11 продукују више фитотоксина. Добијени резултати на танкослојној и препаративној хроматографији са израчунатим Rf вредностима и LC-MS анализом указују да испитивани изолати *L. maculans* C-3, S-11, St-5 на Czapek-овој подлози стварају сиродезмине (фитотоксине). На основу LC-MS анализе утврђено је да је концентрација сиродезмина PL и C највећа у фракцији 2b и 2c. Ове две фракције су испољиле и најјачу фитотоксичност на испитиваним котиледонима у односу на фракцију 1 и 2a.

На основу испољених симптома на диференцијалним сортама (Wester, Quinta и Glacier) изолати K-111, K-112, K-113, K-114, K-115, K-116, K-117 и K-118 припадају патогеној групи ПГ1 односно групи В, док изолати од K-1 до K-25, St-1 до St-28, GS-1 до GS-27, C-1 до C-6, L-1 до L-10, S-1 до S-11, LJ-1 до LJ-6 припадају ПГ2, ПГ3 и ПГ4 односно групи А. Код вештачке инокулације семена изолати C-5, L-5, K-7, LJ-3, S-11, St-1 и GS-3 су проузроковали симптоме после 7 и 14 дана, док појава симптома код K-113 и K-115 није примећена.

На основу амплификације ДНК са PN3 и PN10 прајмерима дужина трака код K-111, K-112, K-113, K-114, K-115, K-116, K-117 и K-118 је 580 bp док код осталих изолата (K-1 до K-25, St-1 до St-28, GS-1 до GS-27, C-1 до C-6, L-1 до L-10, S-1 до S-11, LJ-1 до LJ-6) је 560 bp.

Код RFLP анализе K-111, K-112, K-113, K-115 и K-116 се разликују у једном, односно два рестрикциона фрагмента од K-2 St-16 GS-25 L-5 C-3 LJ-2 и S-1 изолата. На основу свих проведених истраживања може се закључити да: изолати K-111, K-112, K-113, K-114, K-115, K-116, K-117 и K-118 припадају врсти *Leptosphaeria biglobosa* подгрупа NA1 по новој класификацији *Leptosphaeria biglobosa brassicae*, док K-1 до K-25, St-1 до St-28, GS-1 до GS-27, C-1 до C-6, L-1 до L-10, S-1 до S-11, LJ-1 до LJ-3 припадају врсти *Leptosphaeria maculans* по новој класификацији *Leptosphaeria maculans brassicae*. На крају се може са сигурношћу констатовати да су у Србији присутне обе врсте (*Leptosphaeria maculans* и *Leptosphaeria biglobosa*) као проузроковачи суве трулежи корена и рака стабла уљане репице (*Brassica napus* var. *oleifera* L.).

Поглавље “Литература” садржи 131 ауторских референци које су коришћене приликом писања докторске дисертације. Све референце које су наведене у основном тексту рада су директно или индиректно повезане са проучаваном проблематиком и темом коју је кандидат одабрао за израду докторске дисертације, тумачење и дискусију добијених резултата истраживања. Референце су сложене по абecedном реду и написане правилно, у складу са прихваћеним стандардима за навођење литературе.

3. Закључак и предлог

Докторска дисертација мр Петра М. Митровића под насловом: „Морфолошка и молекуларна карактеризација и идентификација гљива узрочника рака стабла уљане репице у Србији“, представља оригиналан научни рад из агрономских наука, област фитопатологија. Кандидат је у својој докторској дисертацији идентификовао две врсте гљива, *Leptosphaeria maculans* и *Leptosphaeria biglobosa*, као главне проузроковаче суве трулежи корена и рака стабла уљане репице. Добијени резултати истраживања дефинисали су и патогене групе унутар врсте, начине ширења паразитних гљива и степен остварења примарних инфекција. Наведена истраживања допринела су брзој и поузданој идентификацији *Leptosphaeria* врста на уљаној репици у Србији. Њихова идентификација до нивоа врсте извршена је применом стандардних миколошких и молекуларних метода. Такође је утврђено присуство аскоспора у нашој земљи, чиме је доказано постојање телеоморфног стадијума ових гљива. Уједно је доказано да до ослобађања аскоспора, у нашим агроеколошким условима, поред јесењег периода, долази и током пролећног дела године. Танкослојном хроматографијом извршено је препаративно изоловање фитотоксина, а течном хроматографијом идентификовани су фитотоксини-сиродезмини чија фититоксична активност је потврђена LC-MS-MS методом. У огледу са инокулисаним котиледонима доказано је да су у Србији присутне све четири патогене групе које су раније описане у другим државама. Молекуларне методе проучавања омогућиле су идентификацију *Leptosphaeria* комплекса у Србији. Прајмери PN3 и PN10 умножавају фрагменте чија је дужина трака 560 bp код изолата *L. maculans*, и 580 bp код изолата *L. biglobosa*. Поред реакције ланчаног умножавања фрагмената нуклеинске киселине и PCR-RFLP анализа омогућила је разликовање изолата *L. biglobosa* од изолата *L. maculans*. Такође, на основу PCR-RFLP анализе сви изолати *L. biglobosa* припадају раније описаној подгрупи NA1. Истраживања у овој докторској дисертацији обављена су у потпуности према плану и програму рада предвиђеним у Пријави докторске дисертације. Добијени резултати истраживања ће

дати допринос свеобухватнијем приступу у идентификацији проузроковача болести уљане репице, њиховој епидемиологији, производњи фитотоксина и изналажењу адекватних мера сузбијања.

На основу свега изнетог Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију мр Петра М. Митровића, под насловом: „Морфолошка и молекуларна карактеризација и идентификација гљиве узрочника рака стабла уљане репице у Србији“, и предлаже Наставно–научном већу Пољопривредног факултета Универзитета у Београду да ову оцену усвоји, чиме би се пружила могућност кандидату, мр Петру М. Митровићу, да приступи јавној одбрани ове докторске дисертације.

У Београду, 2013. године

Чланови Комисије:

Др Мирко Ивановић, редовни професор
Пољопривредног факултета Универзитета у Београду

Др Алекса Обрадовић, редовни професор
Пољопривредног факултета Универзитета у Београду

Др Ана Марјановић–Јеромела, виши научни сарадник
Института за ратарство и повртарство у Новом Саду

Др Војислав Тркуља, ванредни професор
Пољопривредног факултета Универзитета у Бањалуци

Др Ивана Вицо, доцент
Пољопривредног факултета Универзитета у Београду

Прилог: Рад објављен у часопису са SCI листе:

Mitrović P., Orčić D., Sakač Z., Marjanović-Jeromela A., Grahovac N., Milošević D., Marisavljević D. (2012): Characterization of sirodesmins isolated from the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. Journal of the Serbian Chemical Society 77 (10): 1363–1379.