

Факултет Пољопривредни

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

32/10-6.5.
(Број захтева)

Веће научних области
биотехничких наука

(Назив већа научне области коме се захтев
упућује)

25.09.2019.
(Датум)

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на одлуку о прихватању теме докторске дисертације и о одређивању ментора

Молимо да, сходно члану 47. ст. 5. тач. 3. Статута Универзитета у Београду ("Гласник Универзитета", број 186/15-пречишћени текст и 189/16), дате сагласност на одлуку о прихватању теме докторске дисертације:

Етиологија плаве трулежи јабучастог
воћа у Србији и физиолошке промене у зараженим плодовима јабуке “
(пун назив предложене теме докторске дисертације)

НАУЧНА ОБЛАСТ Фитомедицина

ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:

Име, име једног од родитеља и презиме кандидата:

1. Александра, Александар, Жебељан

2. Претходно образовање (назив и седиште факултета,
студијски програм):
Пољопривредни факултет, Студијски програм
Фитомедицина

Универзитет у Београду

3. Година завршетка
претходног нивоа студија: 2014

4. Година уписа на докторске студије: 2014/2015.

5. Назив студијског програма
докторских студија: Пољопривредне науке, модул Фитомедицина

ПОДАЦИ О МЕНТОРУ:

Име и презиме ментора: Ивана Вицо

Звање: редовни професор

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Jurick, W. M. II, **Vico, I.**, McEvoy, J. L., Whitaker, B. D., Janisiewicz, W., Conway, W. S. (2009): Isolation, purification, and characterization of a polygalacturonase produced in *Penicillium solitum* - decayed 'Golden Delicious' apple fruit. *Phytopathology* 99: 636-641.
2. Jurick, W. M. II, **Vico I.**, Gaskins, V. L., Garrett, W. L., Whitaker, B. D., Janisiewicz, W. J., Conway, W. S. (2010): Purification and biochemical characterization of polygalacturonase produced by *Penicillium expansum* during postharvest decay of 'Anjou' Pear. *Phytopathology* 100: 42-48.
3. Jurick, W. M II, **Vico, I.**, Gaskins, V. L., Whitaker, B. D., Garret, W. M., Janisiewicz, W. J, Conway, W. S. (2012): *Penicillium solitum* produces a polygalacturonase isozyme in decayed 'Anjou' pear fruit capable of macerating host tissue *in vitro*. *Mycologia* 104: 604 - 612.
4. Duduk, N., Lazarević, M., Žebeljan, A., Vasić, M., **Vico, I.** (2017): Blue mold decay of stored onion bulbs caused by *Penicillium polonicum*, *P. glabrum* and *P. expansum*. *Journal of Phytopathology* 165: 662-669.
5. Žebeljan, A., **Vico, I.**, Duduk, N., Žibera, B., Urbanek Krajnc, A. (2019): Dynamic changes in common metabolites and antioxidants during *Penicillium expansum*-apple fruit interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 106: 166-174.

Обавештавамо вас да је Наставно-научно веће Пољопривредног факултета

на седници одржаној 25.09.2019. размотрило предложену тему и закључило да је тема подобна за израду докторске дисертације јер садржи оригиналну идеју и да је од значаја за развој науке, примену њених резултата, односно развој научне мисли уопште.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

Проф. др Душан Живковић

- Прилог
1. Одлука Наставно-научног већа о прихватању теме и одређивању ментора
 2. Извештај Комисије

Универзитет у Београду
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Број: 32/10-6.5.
Датум: 25.09.2019. године
БЕОГРАД-ЗЕМУН

На основу члана 44. Статута Пољопривредног факултета (2018. година), Наставно-научно веће факултета на седници одржаној 25.09.2019. године, донело је

О Д Л У К У

I ПРИХВАТА СЕ извештај о позитивној оцени пријаве теме докторске дисертације коју је поднела **АЛЕКСАНДРА ЖЕБЕЉАН, мастер** и одобрава израда дисертације под насловом: **«ЕТИОЛОГИЈА ПЛАВЕ ТРУЛЕЖИ ЈАБУЧАСТОГ ВОЋА У СРБИЈИ И ФИЗИОЛОШКЕ ПРОМЕНЕ У ЗАРАЖЕНИМ ПЛОДОВИМА ЈАБУКЕ».**

II За ментора се именује др Ивана Вицо, редовни професор.

III На одлуку о прихватању теме докторске дисертације и одређивању ментора сагласност даје одговарајуће Веће научних области Универзитета у Београду.

**ПРЕДСЕДНИК
НАСТАВНО-НАУЧНОГ ВЕЋА
ДЕКАН**

(Проф. др Душан Живковић)

Доставити: кандидату, ментору, Институту за фитомедицину, Студентској служби и архиви.

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ
ПОЉОПРИВРЕДНОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ
Датум: 26.07.2019.

Предмет: Извештај Комисије за оцену пријаве докторске дисертације кандидата
Александре Жебељан, мастер инжењера пољопривреде

Одлуком Наставно-научног већа Факултета број 32/9-3.5. од 26.06.2019. године именована је Комисија за оцену пријаве докторске дисертације под насловом: „**Плава трулеж јабучастог воћа у Србији - проузроковачи и физиолошке промене у зараженим плодовима јабуке**“ кандидата Александре Жебељан, мастер инжењера пољопривреде. Комисија у саставу: др Ивана Вицо, редовни професор, др Наташа Дудук, ванредни професор и др Горан Алексић, виши научни сарадник Института за заштиту биља и животну средину у Београду, на основу увида у пријаву докторске дисертације и њене анализе, подноси следећи:

ИЗВЕШТАЈ

1. Наслов докторске дисертације

Комисија предлаже промену наслова докторске дисертације у наслов: „**Етиологија плаве трулежи јабучастог воћа у Србији и физиолошке промене у зараженим плодовима јабуке**“

2. Предмет и програм истраживања

У јабучасте воћне врсте се убрајају јабука (*Malus x domestica* Borkh.), крушка (*Pyrus communis* L.), дуња (*Cydonia oblonga* Mill.), мушмула (*Mespilus germanica* L.), глог (*Crataegus* sp.) и оскоруша (*Sorbus domestica* L.). У Србији је економски најзначајнија и најзаступљенија јабука, која се гаји на 25.134 ha са годишњом производњом од 378.644 t, што представља 0,46% од укупне светске производње. Крушка се гаји на 5703 ha са годишњом производњом од 52.291 t, а дуња на 1901 ha са годишњом производњом од 10.378 t. Иако су површине под засадима дуње мале, Србија је један од водећих произвођача у Европи (FAOstat, 2017).

Плава трулеж је једна од најзначајнијих постжетвених болести јабучастог воћа у свету. Осим изражене деструкције плодова, губици који су последица плаве трулежи огледају се и у контаминацији плодова микотоксинима (Barkai-Golan and Paster, 2008). Болест се испољава појавом светлосмеђих, воденастих пега у оквиру којих патоген обилно спорулише формирајући карактеристичне плавичасто-зелене конидије. Проузроковачи плаве трулежи су врсте из рода *Penicillium* (Amiri and Bompeix, 2005; Louw and Korsten, 2014; van der Walt et al., 2010). То су типични постжетвени патогени, одлично прилагођени за остваривање инфекције плодова у току и после бербе. Ове врсте су некротрофне,

опортунистички су патогени и спадају у групу гљива које могу да расту на ниским температурама (Barkai-Golan, 2001). Главни извор инокулума су конидије на зараженим плодовима, гајбицама, у води и складишном простору. Основни начин продирања је кроз повреде, али конидије могу продирати и кроз природне отворе. Патоген пектолитичким ензимима разлаже ћелијске зидове и размекшава ткиво домаћина и на тај начин проузрокује трулеж (Amiri and Bompeix, 2005; Rosenberger, 2014).

Најзначајнији проузроковач плаве трулежи плодова јабуке и крушке у свету је врста *Penicillium expansum*, а одмах затим су и врсте *P. crustosum* и *P. solitum*. Поред њих као проузроковачи плаве трулежи описане су и друге врсте рода *Penicillium*: *P. aurantiogriseum*, *P. brevicompactum*, *P. carneum*, *P. chrysogenum*, *P. commune*, *P. dendriticum*, *P. digitatum*, *P. glabrum*, *P. griseofulvum*, *P. ramulosum*, *P. rugulosum* и *P. verrucosum* (Louw and Korsten, 2014; van der Walt et al., 2010; Amiri and Bompeix, 2005). Као проузроковач трулежи плодова дуње у свету је описана врста *P. expansum* (Sharma and Sumbali, 1997). У Србији су као патогени плодова јабуке описане *P. expansum* (Vico et al., 2014a) и *P. crustosum* (Vico et al., 2014b), док података о проузроковачима плаве трулежи осталог јабучастог воћа нема.

Врсте рода *Penicillium* се одликују изразитом варијабилношћу и због тога се идентификација врста заснива на полифазном приступу који подразумева испитивање морфолошких (макроскопских – изглед и карактеристике колоније, ексудација, пигментација подлоге; микроскопских – изглед и гранање конидиофора и облик и величина конидија), биохемијских (способност стварања секундарних метаболита) и молекуларних карактеристика (део гена за β тубулин (*BenA*), као најпоузданији за идентификацију, а затим и ITS регион рибозомалне ДНК, калмодулин (*CaM*) и РНК полимеразу 2 (*RPB2*)) (Visagie et al., 2014). У свету је развијена и молекуларна метода заснована на гену за полигалактуроназу за идентификацију најзаступљеније врсте проузроковача плаве трулежи *P. expansum* (Marek et al., 2003).

После бербе, у току дозревања и старења, физиолошки процеси у убраним плодовима се мењају и долази до серије неповратних процеса које воде разградњи и угинућу ћелија. Као последица тих промена, осетљивост према постжетвеним патогенима расте. Након продирања патогена, током остваривања инфекције и колонизације ткива, убрани плодови реагују тако што укључују механизме одбране који подразумевају и промене у концентрацији примарних и секундарних метаболита и антиоксиданата. Динамика и квалитет ових промена зависе од односа биљка-патоген. Једна од првих реакција заражених биљака на присуство патогена је акумулација реактивних кисеоникових радикала, као и активирање система антиоксидативне заштите ензимима и једињењима као што су аскорбат и глутатион, који међусобно интереагују у форми аскорбатно глутатионског циклуса (AA–GSH) (Mittler, 2002). У зараженим плодовима долази и до промене у количини и саставу фенолних једињења, повећења дисања, промене у саставу шећера и органских киселина (Barkai-Golan, 2001; Grace, 2005). У патосистему јабука–*P. expansum* утврђена је промена састава протеина и фенолних једињења као реакција на остварену инфекцију (Buron–Moles et al., 2015; Schovankova and Opatova, 2011). Међутим, нема података о променама AA–GSH циклуса у овом патосистему који би могли да објасне одговоре метаболизма домаћина на присуство овог значајног постжетвеног патогена. Познавање промена у физиологији плодова јабуке заражених гљивом *P. expansum* које резултују развојем трулежи доприносе познавању механизма инфекције самог патогена, али и динамике одбрамбених одговора домаћина до слома

отпорности. Упознавање динамике физиолошких промена у току интеракције врста рода *Penicillium* и плодова јабуке, допринеће разумевању патосистема некротроф-домаћин и дати значајне резултате који могу послужити као основ у развоју специфичних стратегија заштите.

Истраживања у оквиру ове докторске дисертације обухватиће идентификацију и карактеризацију гљива проузроковача плаве трулежи плодова јабучастог воћа у Србији. Гљиве ће бити изоловане из плодова јабуке, крушке, дуње и мушмуле сакупљених из складишта након различитих периода чувања и у различитим условима чувања, а њихова патогеност биће проверена вештачким инокулацијама здравих плодова јабуке. Идентификација и карактеризација изолата обавиће се на основу молекуларних и морфолошких одлика, а вирулентност одабраних изолата биће проучена вештачким инокулацијама најзаступљенијих сорти јабуке. Испитивања у оквиру ове дисертације обухватиће и проучавање физиолошких промена које настају у току интеракције проузроковача плаве трулежи и плодова јабуке. На плодовима јабуке инокулисаним одабраним изолатима најзаступљенијих врста рода *Penicillium* испитаће се динамика промена концентрације примарних метаболита (сахарозе, глукозе, фруктозе, јабучне и шикиминске киселине) и антиоксиданата (укупног глутатиона, аскорбата и фенола) од момента продирања и остваривања инфекције до развоја симптома.

3. Научни циљ истраживања

Због великог економског значаја и заступљености *Penicillium* врста на плодовима ускладиштеног јабучастог воћа и њихове недовољне проучености у нашој земљи, циљ ове дисертације је да се идентификују и окарактеришу врсте рода *Penicillium*, проузроковачи плаве трулежи на основу морфолошких, патогених и молекуларних карактеристика, као и да се испитају разлике у вирулентности *Penicillium* врста изолованих из различитих домаћина према плодовима јабуке различитих сорти. Циљ ове дисертације је и да се испитају физиолошке промене у плодовима јабуке које су последица инфекције одабраним изолатима *Penicillium* врста. Кроз познавање динамике промена примарних метаболита и антиоксиданата циљ је да се проуче одбрамбене реакције плода јабуке у току интеракције са патогеном, односно од тренутка продирања и остваривања инфекције плода јабуке до колонизације, слома отпорности и развоја трулежи.

Допринос ове докторске дисертације огледаће се у идентификацији *Penicillium* врста, проузроковача плаве трулежи на јабучастом воћу и њиховом значају. Такође, даће се допринос њиховом детаљном карактеризацијом на основу морфолошких, молекуларних и патогених особина. Утврђивање заступљености агресивнијих изолата, као и утврђивање осетљивости појединих сорти јабуке на изоловане *Penicillium* врсте, даће увид у потенцијалну опасност од инфекције плодова јабучастог воћа овим врстама. Такође, даће се допринос у проучавању интеракције биљка-патоген у специфичном патосистему некротрофне гљиве и плода јабуке који је у фази зревања и старења. Испитивање физиолошких промена у плодовима јабуке које су последица инфекције одабраним *Penicillium* врстама, као и динамика тих промена, односно промена у концентрацији примарних метаболита и антиоксиданата у зараженим плодовима, даће допринос у разумевању процеса инфекције некротрофном гљивом и одбрамбених реакција плодова јабуке у току чувања, што може послужити као основ у развоју специфичних стратегија заштите.

4. Основне хипотезе од којих се полази

Основне хипотезе од којих се полази у оквиру ове докторске дисертације су следеће:

- Плаву трулеж јабучастог воћа у Србији изазива више врста рода *Penicillium*.
- Међу проузроковачима плаве трулежи на свим врстама јабучастог воћа најзаступљенија је врста *P. expansum*.
- Изолати *Penicillium* sp. испољавају морфолошку варијабилност.
- Изолати *Penicillium* spp., проузроковачи плаве трулежи плодова јабучастог воћа, испољавају разлике у вирулентности на плодовима јабуке.
- Плодови јабуке инокулисани изолатима *Penicillium* spp. реагују променама у концентрацији примарних метаболита и антиоксиданата.
- Динамика физиолошких промена (промене у концентрацији примарних метаболита и антиоксиданата) у инокулисаним плодовима јабуке зависи од тока инфекције и врсте гљиве.
- Сprovedена испитивања допринеће утврђивању потенцијалне опасности и значаја гљива из рода *Penicillium* за производњу и чување јабучастог воћа у Србији.

5. Материјал и методе које ће се користити у истраживању

1) Прикупљање узорака плодова јабучастог воћа са симптомима плаве трулежи

Истраживања у оквиру ове докторске дисертације обухватиће сакупљање плодова јабучастог воћа, јабуке, крушке, дуње и мушмуле, различитих сорти са симптомима плаве трулежи из различитих локалитета у Србији (Баваниште, Брестовик, Челарево, Гроцка, Мала Ремета, Параћин, Радмиловац, Ритопек, Смедерево, Шабац, Шид, Ваљево и других) након различите дужине и начина чувања. Прикупљање узорака јабуке и крушке ће се обавити у периоду од месец дана до неколико месеци после бербе из хладњача, УЛО хладњача и подрума, а дуње и мушмуле неколико до месец дана после бербе из хладњача и подрума. Из симптоматичних плодова изолација ће се обавити у Лабораторију за постжетвену фитопатологију Пољопривредног факултета у Земуну.

2) Изолација гљива из оболелих плодова и добијање чистих култура

Плодови јабучастог воћа са симптомима плаве трулежи ће се претходно површински стерилисати 70% раствором етанола, а фрагменти са прелаза између здравог и зараженог ткива плода ће се пребацити на подлогу од кромпир декстрозног агара (КДА). Пресејавањем ће се добити чисте културе из којих ће се добити моноспоријале културе изолата методом размаза.

3) Провера патогености добијених изолата и реизолација гљива

Провера патогености добијених изолата вршиће се вештачким инокулацијама плодова јабуке. Инокулација претходно опраних и стерилисаних плодова јабуке обавиће се наношењем суспензије спора у повреди. Суспензија спора ће бити припремљена у стерилној води са додатком Tween 20 из култура одгајених на КДА 10 дана. Контролни плодови биће инокулисани стерилном дестилованом водом са додатком Tween 20. Појава

симптома ће се пратити након 7 и 9 дана. Из плодова са симптомима извршиће се реизолација патогена исецањем фрагмента са прелаза између здравог и зараженог ткива и наношењем на стерилну КДА подлогу.

4) Морфолошка идентификација и карактеризација изолата

Испитивање морфолошких особина обухватиће посматрање макроскопских и микроскопских одлика изолованих гљива. Макроскопске одлике (изглед, боја, обод, наличје колоније, присуство плодноносних тела, ексудација) биће посматране након 7 дана инкубације на 25°C на диференцијалним подлогама: КДА, сладни агар (Malt Extract Agar, MEA), Чапеков агар са квашчевим екстрактом (Czapek Yeast Autolysate agar, CYA) и квашчев агар са сахарозом (Yeast Extract Sucrose agar, YES). Микроскопске одлике (изглед и гранање конидиофора, орнаментација стипа и величина рама, метула, фијалида и конидија) биће праћене у културама старим 7 -10 дана одгајеним на MEA на микроскопу Carl Zeiss Axio Lab.A1, структуре ће бити фотографисане камером AxioCam ErC.5s, а за мерења ће бити коришћен програм ZEN 2.1/ZEN 2 Carl Zeiss microscopy GmbH. Брзина пораста изолата биће одређена мерењем два унакрсна пречника колоније после 7 дана инкубације на диференцијалним подлогама.

5) Молекуларна идентификација и карактеризација

Екстракција нуклеинских киселина. Дезоксирибонуклеинске киселине (ДНК) биће екстраховане по СТАВ методи коју су описали Day and Shattock (1997) из мицелије чистих култура одгајених седам дана на КДА подлози.

Ланчана реакција полимеразе (PCR). Молекуларна идентификација и карактеризација изолата биће заснована на делу гена за β -тубулин, чија амплификација ће се обавити применом прајмера Bt2a и Bt2b (Glass and Donaldson, 1995) PCR методи. Специфична детекција *P. expansum* обавиће се применом прајмера PEF и PER заснованих на делу гена за полигалактуроназу (Marek et al., 2003).

Визуелизација PCR продуката. Визуелизација PCR продуката обавиће се електрофорезом у агарозном гелу који ће бити обојен етидијумбромидом, посматран на UV трансилуминатору и фотографисан.

Секвенцирање и филогенетске анализе. Одабрани PCR продукти биће пречишћени и секвенцирани у оба смера, са истим прајмерима који су коришћени у PCR реакцијама. Добијене секвенце биће обрађене у програму Pregap 4 у оквиру Staden пакета, а потом упоређене са секвенцама доступним у NCBI (National Center for Biotechnology and Information) бази података коришћењем BLAST анализе (Basic Local Alignment Search Tool). За међусобно поређење добијених секвенци изолата, проучавање еволутивних односа и реконструкцију филогенетског стабла користиће се различите методе у оквиру програмског пакета MEGA 6 (Tamura et al., 2013).

6) Испитивање вирулентности добијених изолата

Испитивање вирулентности добијених изолата обавиће се инокулацијом плодова јабуке различитих сорти. Користиће се седам дана старе културе гљива одгајене на КДА подлози. Плодови ће бити опрани детерџентом, испрскани 70% раствором етанола и инокулисани у повреду суспензијом спора у стерилној дестилованој води са додатком Tween 20 одређене концентрације ($\sim 10^6$ спора/ml). Концентрација спора биће одређена помоћу хемоцитометра Bürker-Türk. Контролни плодови биће инокулисани стерилном

дестилованом водом са додатком Tween 20. Вирулентност изолата биће одређивана мерењем величине пречника пега на инокулисаним плодовима 7 и 9 дана након инкубације у влажним условима (стерилне пластичне кутије са навлаженим филтер папиром) при собној температури. Код инокулисаних плодова пратиће се и развој обољења у унутрашњости плода.

7) Испитивање физиолошких промена у плодовима јабуке инокулисаним најзначајнијим *Penicillium* spp.

Припрема узорака из инокулисаних и контролних (повређених и неповређених) плодова јабуке. Вештачка инокулација плодова јабуке сорте Ајдаред обавиће се одабраним *Penicillium* изолатима по методи описаној код испитивања вирулентности изолата. Физиолошке промене у инокулисаним, повређеним и неповређеним плодовима пратиће се после 6 h, 24 h, као и 3, 5, 7 и 11 дана инкубације. За сваки термин ће се користити по две инокулисане, две повређене и две неповређене јабуке, док ће у тренутку постављања експеримента бити узорковане по две неповређене јабуке, што ће представљати почетну контролу (0 h). Са сваке јабуке биће узето укупно 8 фрагмента (дужине 65 mm и пречника 11 mm) са удаљености од 5 mm од зараженог дела плода, односно повреде или средине неповређеног плода јабуке. Фрагменти јабуке биће одмах потопљени у течни азот, да би се избегла оксидација метаболита, након чега ће уследити лиофилизација у трајању од 7 дана при температури од -52°C.

Биохемијске анализе. Одређивање концентрације шећера, органских киселина, укупног аскорбата и глутатиона у узорцима обавиће се помоћу течне хроматографије високе перформансе (HPLC) са различитим детекторима [рефрактометар (RI), фотодиодни детектор (PDA) и флуоресцентни детектор (FLD)], док ће се концентрација укупних фенола обавити помоћу спектрофотометра.

Екстракција и одређивање концентрације шећера (глукозе, фруктозе и сахарозе) ће се обавити по методи Mikulič-Petkovšek et al. (2012): 60 mg самлевеног узорка додаће се у епрувету са 4 ml воде, пренети на тресилицу 30 минута, па центрифугирати 15 минута; 1,5 ml добијеног супернатанта ће се центрифугирати 45 минута; новодобијени супернатант ће се анализирати помоћу HPLC-RI коришћењем колоне Rezex RCM–Monosaccharide Ca+2 (300x7,8 mm) (Phenomenex, USA) на температури од 65°C, док ће температура аутосемплера бити 8°C. Као мобилна фаза користиће се вода.

Екстракција и одређивање органских киселина ће се обавити по методи Mikulič-Petkovšek et al. (2012). Припрема узорака за биохемијску анализу обавиће се на исти начин као код утврђивања шећера. Узорци ће бити анализирани помоћу HPLC-PDA. Користиће се Aminex HPX–87H ion (300x7.8 mm) (Bio–Rad, USA) колона на температури 45°C. Као мобилна фаза користиће се 0,004 M раствора сумпорне киселине у води.

Екстракција и одређивање концентрације укупног глутатиона ће се обавити по методи Tausz et al. (2003): 150 mg самлевеног узорка додаће се у епрувету са 0,1 M раствором хлороводоничне киселине и 60 mg поливинилпиролидона, хомогенизовати и центрифугирати 15 минута; 280 µl супернатанта ће се помешати са 420 µl CHES пуфера (300 mM циклохексиламино етансулфонска киселина, pH 9,0) и 70 µl дитиотреитола. Након инкубације 1 h на собној температури, додаће се 50 µl 8 mM монобромобимане и инкубирати у мраку 15 минута, како би се обележиле сулфхидрилне групе. Дериватизација ће се зауставити додавањем 600 µl 0,25% метансулфонске киселине. Припремљени узорци биће анализирани помоћу HPLC-FLD коришћењем колоне: Grace

Waters Spherisorb ODS–2,5 μ m (250x4,6 mm). Као мобилна фаза користиће се 5% метанола и 0,25% сирћетне киселине у води (pH 3,9) и раствор 90% метанола и 0,20% сирћетне киселине (pH 3,9) уз градијент елуирања.

Екстракција и одређивање концентрације укупног аскорбата обавиће се по методи Tausz et al. (2003): 80 mg самлевог узорка додаће се у епрувету са 3 ml раствора 3% метафосфорне киселине и 60 mg поливинилпиролидона; Након хомогенизације и центрифугирања 15 минута, 600 μ l супернатанта ће се пребацити у микротубе, додати 280 μ l 0,4 M Tris пуфера [трис (хидроксиметил) аминотетан] и 50 μ l 0,26 M дитиотреитола. Након инкубације од 10 минута на собној температури у мраку, реакција ће се зауставити додавањем 100 μ l 8,5% фосфорне киселине. Припремљени узорци биће анализирани HPLC-PDA методом. Користиће се Synergy 4 μ m Hydro–RP 80 A (150x4,60 mm) (Phenomenex, USA) колона, док ће температура аутосамплера бити 4°C. Као мобилна фаза биће коришћен 32,5 mM натријумхидрогенфосфат у води.

Екстракција и одређивање концентрације укупних фенола обавиће се по методи Ainsworth and Gillespie (2007). У епрувету са 1,5 ml 95% метанола додаће се 60 mg самлевог узорка, хомогенизовати, инкубирати 10 минута на собној температури у мраку, центрифугирати па издвојити 100 μ l супернатанта и помешати са 200 μ l 10% Folin-Ciocalteu (F–C) реагенса. Након 3 минута додаће се 800 μ l 700 mM натријумкарбоната како би се зауставила реакција, промешаће се и инкубирати 2h на собној температури у мраку, након чега ће бити анализирани на спектрофотометру на таласној дужини 765 nm.

Одређивање концентрације испитиваних метаболита биће извршена методом спољашњег стандарда. За сваки појединачни стандард биће припремљен основни раствор стандарда, а од њега ће се даље припремити радни и калибрациони раствори. На основу вредности масене концентрације стандарда и површине пикова формираће се калибрациона крива. Из добијене једначине линеарне зависности биће израчуната масена концентрација испитиване компоненте у узорку.

8) Статистичка обрада података

Добијени резултати обрадиће се статистичким софтверским пакетом SPSS 12 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Разлике у величини пречника колонија на различитим подлогама, величини конидиофора и конидија и величине пречника пега на зараженим јабукама приликом испитивања вирулентности изолата биће тестирано применом анализе варијансе и коришћењем Данкановог теста. Утврђивање значајности физиолошких промена у зараженим и повређеним јабукама биће утврђено поређењем концентрација метаболита заражених и повређених јабука са контролним јабукама у оквиру сваког термина, као и поређење са почетном контролом помоћу Ман-Витнеј U теста. Такође, применом Спирманове корелације утврдиће се узајамна повезаност величине пеге са променама у метаболитима, што ће допринети бољем разумевању одговора плода јабуке на инфекцију. Статистичка анализа података биће урађена на нивоу значајности $p < 0,05$ и $p < 0,01$.

6. Списак литературе цитиране у тексту пријаве

Списак литературе цитиране у тексту пријаве дат је у прилогу 1.

7. Списак објављених и саопштених научних радова

Списак објављених и саопштених научних радова дат је у прилогу 2.

8. Биографија кандидата

Мастер инжењер пољопривреде Александра Жебељан, рођена 30.6.1989. године у Београду, Република Србија. Пољопривредни факултет, Универзитета у Београду, Одсек Фитомедицина уписала је школске 2009/2010, а дана 16.10.2013. године одбранила је дипломски рад под називом: „*Fusarium proliferatum* - патоген парадајза“ са оценом 10, чиме је завршила основне академске студије у предвиђеном року, са просечном оценом 8,88 и тиме стекла звање дипломираног инжењера пољопривреде. Мастер студије на Пољопривредном факултету Универзитета у Београду, Одсек Фитомедицина уписала је школске 2013/14 године, а дана 15. 10. 2014. године одбранила је мастер рад под називом: „Молекуларна карактеризација *Alternaria* sp. пореклом са мркве“ са оценом 10, чиме је завршила мастер академске студије, са просечном оценом 10 и тиме стекла звање мастер инжењера пољопривреде. Због велике заинтересованости за научно-истраживачки рад из области Фитопатологије-фитопатогене гљиве, уписала је школске 2014/2015 године докторске студије на Одсеку за Фитомедицину, Катедри за Фитопатологију. Након уписа на докторске студије, свој истраживачки рад обавља на Пољопривредном факултету, у лабораторији за постжетвену фитопатологију, а маја 2015. године постала је стипендиста Министарства просвете, науке и технолошког развоја у оквиру пројекта ИИИ46008 „Развој интегрисаних система управљања штетним организмима у биљној производњи са циљем превазилажења резистентности и унапређења квалитета и безбедности хране“. Део истраживања у оквиру докторске дисертације обавила је на Факултету за пољопривреду и биолошке науке, Универзитета у Марибору (Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede, Univerza v Mariboru) током више краћих боравака у периоду од октобра 2016. до априла 2017. године. У звање истраживач приправник изабрана је 10.11.2016. године на Институту за пестициде и заштиту животне средине. У току досадашњег бављења истраживачким радом, Александра Жебељан је објавила или саопштила 11 радова. Говори енглески и словеначки језик.

9. Закључак и предлог

На основу анализе поднете пријаве, предложеног програма и научног циља докторске дисертације кандидата Александре Жебељан, мастер инжењера пољопривреде, под измењеним насловом: „**Етиологија плаве трулежи јабучастог воћа у Србији и физиолошке промене у зараженим плодовима јабуке**“, Комисија сматра да је изабрана тема од изузетног значаја за науку и праксу. На основу истраживања одабраних изолата гљива пореклом из различитог јабучастог воћа са симптомима плаве трулежи и њихове идентификације и карактеризације на основу морфолошких, молекуларних и патогених особина, ова дисертација пружиће детаљну слику о томе које су врсте рода *Penicillium* укључене у појаву болести и какав је значај раније идентификованих врста, али и нових врста или нових домаћина описаних врста рода *Penicillium* у Србији. Утврђивање заступљености агресивнијих изолата, као и утврђивање осетљивости појединих сорти јабуке на изоловане *Penicillium* врсте, даће увид у потенцијалну опасност од инфекције плодова јабучастог воћа овим врстама. Осим тога, значај истраживања у оквиру ове дисертације огледа се и у проучавању интеракције биљка-патоген у специфичном патосистему некротрофне гљиве и плода јабуке који је у фази зревања и старења. Испитивање физиолошких промена у плодовима јабуке које су последица инфекције

одабраним *Penicillium* врстама, као и динамика тих промена, односно промена у концентрацији примарних метаболита и антиоксиданата у зараженим плодовима, даће допринос у разумевању процеса инфекције некротрофном гљивом и одбрамбених реакција плодова јабуке у току чувања, што може послужити као основ у развоју специфичних стратегија заштите.

На основу свега изнетог, Комисија позитивно оцењује поднету пријаву и предлаже Наставно-научном већу Пољопривредног факултета Универзитета у Београду да прихвати поднету пријаву и Александри Жебељан, мастер инжењеру пољопривреде одобри израду докторске дисертације под измењеним насловом: „**Етиологија плаве трулежи јабучастог воћа у Србији и физиолошке промене у зараженим плодовима јабуке**“.

Комисија за ментора ове докторске дисертације предлаже др Ивану Вицо, редовног професора.

Београд, 26.07.2019. год.

Чланови Комисије:

др Ивана Вицо, редовни професор
(ужа научна област Фитопатологија)
Универзитет у Београду-Пољопривредни
факултет

др Наташа Дудук, ванредни професор
(ужа научна област Фитопатологија)
Универзитет у Београду-Пољопривредни
факултет

др Горан Алексић, виши научни сарадник
(ужа научна област Фитопатологија)
Институт за заштиту биља и животну
средину, Београд

Прилог 1. Списак литературе цитиране у тексту пријаве

- Ainsworth, E.A. and Gillespie, K.M. (2007): Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature Protocols* 2:875–877.
- Amiri, A. and Bompeix, G. (2005): Diversity and population dynamics of *Penicillium* spp. on apples in pre- and postharvest environments: consequences for decay development. *Plant Pathology* 54: 74–81.
- Barkai-Golan, R. (2001): Postharvest diseases of Fruits and Vegetables. Development and Control. Elsevier Science. Amsterdam, The Netherlands.
- Barkai-Golan, R. and Paster, N. (2008): Mycotoxins in Fruits and Vegetables. Elsevier Science. San Diego. USA.
- Buron-Moles, G., Wisniewski, M., Vinas, I., Teixido, N., Usall, J., Droby, S. and Torres, R. (2015): Characterizing the proteome and oxi-proteome of apple in response to a host (*Penicillium expansum*) and a non-host (*Penicillium digitatum*) pathogen. *Journal of Proteomics* 114: 136-151.
- 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.
- FAOstat (2017): [<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>] преузето са сајта април 2019.
- Glass, N.L. and Donaldson, G.C. (1995): Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1323–1330.
- Grace, S.C. (2005): Phenolics as antioxidants, In *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants* (Smirnoff ed.). Blackwell, Oxford.
- Louw, J.P. and Korsten, L. (2014): Pathogenic *Penicillium* spp. on Apple and Pear. *Plant Disease* 98: 590-598.
- Marek, P., Annamalai, T. and Venkitanarayanan, K. (2003): Detection of *Penicillium expansum* by polymerase chain reaction. *International Journal of Food Microbiology* 89: 139- 144.
- Mikulič-Petkovšek, M., Schmitzer, V., Slatnar, A., Štampar, F., and Veberič, R. (2012). Composition of Sugars, Organic Acids, and Total Phenolics in 25 Wild or Cultivated Berry Species. *Journal of Food Science* 77: c1064-c1070.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7: 405-410.
- Rosenberger, D.A. (2014): Blue mold. In A. L. Jones and H. S. Aldwinkle (Eds) *Compendium of apple and pear diseases*. APS Press. St. Paul, MN
- Schovankova, J. and Opatova, H. (2011): Changes in phenols composition and activity of phenylalanine-amonia lyase in apples after fungal infection. *Horticultural Science (Prague)* 38: 1-10.
- Sharma, J.P. and Sumbali, G. (1997): Association of Patulin With Market Samples of Dry Fruit Slices of Quinces (*Cydonia Oblonga* Mill.) from Jammu and Kashmir, India. In: Singh J., Aneja K.R. (eds) *From Ethnomycology to Fungal Biotechnology*. Springer, Boston, USA.
- Tausz, M., Wonisch, A., Grill, D., Morales, D., and Jime'nez, M.S. (2003): Measuring antioxidants in tree species in the natural environment: from sampling to data evaluation. *Journal of Experimental Botany* 54:1505–1510.

- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. (2013): MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725–2729.
- van der Walt, L., Spotts, R. A., Visagie, C. M., Jacobs, K., Smit, 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.
- Vico, I., Duduk, N., Vasić, M., Nikolić, M. (2014a): Identification of *Penicillium expansum* causing postharvest blue mold decay of apple fruit. *Pesticide and Phytomedicine* 29: 257-266.
- Vico, I., Gaskins, V., Duduk, N., Vasić, M., Yu, J.J., Peter, K.A., Jurick II, W.M. (2014b): First report of *Penicillium crustosum* causing blue mold on stored apple fruit in Serbia. *Plant Disease* 98: 1430-1430.
- Visagie, C.M., Houbraken, J., Frisvad, J.C., Hong, S.-B., Klaassen, C.H.W., Perrone, G., Seifert, K.A., Varga, J., Yaguchi, T., and Samson, R.A. (2014): Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Micology* 78: 343–371.

Прилог 2. Списак објављених и саопштених научних радова

Рад у истакнутом међународном часопису

Žebeljan, A., Vico, I., Duduk, N., Žiberna, B., Urbanek Krajnc, A. (2019): Dynamic changes in common metabolites and antioxidants during *Penicillium expansum*-apple fruit interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 106: 166-174.

Рад у међународном часопису

Duduk, N., Lazarević, M., **Žebeljan, A.,** Vasić, M., Vico, I. (2017): Blue mold decay of stored onion bulbs caused by *Penicillium polonicum*, *P. glabrum* and *P. expansum*. *Journal of Phytopathology* 165: 662-669.

Рад у врхунском међународном часопису - *news item*

Vico, I., **Žebeljan, A.,** Vučković, N., Duduk, N. (2017): First report of *Diplodia seriata* causing postharvest rot of quince fruit in Serbia. *Plant Disease* 101: 1823.

Рад у врхунском часопису националног значаја

Дудук, Н., Васић, М., Вучковић, Н., **Жебељан, А.** и Вицо, И. (2017): Погодност различитих прајмера за специфичну молекуларну детекцију *Monilinia* spp. *Journal of Agricultural Sciences* 62: 167-177.

Саопштење са међународног скупа штампано у целини

Vico, I., Duduk, N., Vasić, M., **Žebeljan, A.,** Radivojević, D. (2015): Bull's eye rot of apple fruit caused by *Neofabrea alba*. *Acta Horticulturae* 1139: 733-738.

Саопштење са међународног скупа штампано у изводу

Žebeljan, A., Duduk, N., Vučković, N., Vico, I. (2019): Blue mold of apple fruit caused by mixed infection with *Penicillium expansum* and *Penicillium crustosum*. *Book of Abstracts 14th Slovenian Conference on Plant Protection, Maribor*, 96.

Duduk, N., Vasić, M., **Žebeljan, A.,** Radojević, R., Vico, I. (2016): Postharvest pathogens of apple fruit in Serbia. *Book of Abstracts International symposium on sustainable fruit production, Donja Stubica, Croatia*, 47.

Vasić, M., **Žebeljan, A.,** Vico, I., Duduk, N. (2016): Microconidial state of four *Monilia* species isolated from apple fruit. *Book of abstracts International Conference, State of the art technologies: challenge for the research in Agricultural and Food Sciences, Belgrade*, 127.

Саопштење са скупа националног значаја штампано у изводу

Вучковић, Н., Вицо, И., **Жебељан, А.,** Васић, М., Дудук, Н. (2018): *Diplodia seriata* проузроковач трулежи плодова дуње у Србији. *Зборник резимеа радова XV саветовања о заштити биља, Златибор*, 60.

Жебељан, А., Павић, С., Васић, М., Дудук, Н., Вицо, И. (2015): Морфолошке особине изолата *Penicillium expansum* Link, проузроковача плаве трулежи плодова јабуке и крушке. *Зборник резимеа радова XIII саветовања о заштити биља, Златибор*, 47-48.

Васић, М., Пајић, В., **Жебељан, А.,** Вицо, И., Дудук, Н. (2015): Вирулентност изолата *Monilia polystroma* и *Monilia fructigena* на инокулисаним плодовима јабуке. *Зборник резимеа радова XIII саветовања о заштити биља, Златибор*, 48-49.

ПОДАЦИ О МЕНТОРУ

Име и презиме ментора: Ивана Вицо

Звање: Редовни професор

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Jurick, W. M. II, **Vico, I.**, McEvoy, J. L., Whitaker, B. D., Janisiewicz, W., Conway, W. S. (2009): Isolation, purification, and characterization of a polygalacturonase produced in *Penicillium solitum* - decayed 'Golden Delicious' apple fruit. *Phytopathology* 99: 636-641.
2. Jurick, W. M. II, **Vico I.**, Gaskins, V. L., Garrett, W. L., Whitaker, B. D., Janisiewicz, W. J., Conway, W. S. (2010): Purification and biochemical characterization of polygalacturonase produced by *Penicillium expansum* during postharvest decay of 'Anjou' Pear. *Phytopathology* 100: 42-48.
3. Jurick, W. M II, **Vico, I.**, Gaskins, V. L., Whitaker, B. D., Garret, W. M., Janisiewicz, W. J, Conway, W. S. (2012): *Penicillium solitum* produces a polygalacturonase isozyme in decayed 'Anjou' pear fruit capable of macerating host tissue *in vitro*. *Mycologia* 104: 604 - 612.
4. Duduk, N., Lazarević, M., Žebeljan, A., Vasić, M., **Vico, I.** (2017): Blue mold decay of stored onion bulbs caused by *Penicillium polonicum*, *P. glabrum* and *P. expansum*. *Journal of Phytopathology* 165: 662-669.
5. Žebeljan, A., **Vico, I.**, Duduk, N., Žibera, B., Urbanek Krajnc, A. (2019): Dynamic changes in common metabolites and antioxidants during *Penicillium expansum*-apple fruit interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 106: 166-174.

У случају менторства дисертације на докторским студијама у групацији техничко-технолошких, природно-математичких и медицинских наука ментор треба да има **најмање пет радова** са SCI, SSCI, AHCI или SCIE листе, као и Math-Net.Ru листе.

У случају менторства дисертације на докторским студијама у групацији друштвено-хуманистичких наука ментор треба да има **најмање три рада** са релевантне листе научних часописа (Релевантна листа научних часописа обухвата SCI, SSCI, AHCI и SCIE листе, као и ERIH листу, листу часописа које је Министарство за науку класификовало као M24 и додатну листу часописа коју ће, на предлог универзитета, донети Национални савет за високо образовање. Посебно се вреднују и монографије које Министарство науке класификује као M11, M12, M13, M14, M41 и M51.)

