

Факултет Пољопривредни

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

32/12-6.2.  
(Број захтева)

Веће научних области  
биотехничких наука

(Назив већа научне области коме се захтев  
упућује)

27.11.2019.  
(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:

„Осетљивост популација *Erysiphe necator* на фунгициде различитих механизма деловања у  
Србији“

(пун назив предложене теме докторске дисертације)

НАУЧНА ОБЛАСТ Фитомедицина

#### ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:

Име, име једног од родитеља и презиме кандидата:

1. Урош, Драгован, Војиновић

2. Претходно образовање (назив и седиште факултета,  
студијски програм):

Универзитет у Београду

Пољопривредни факултет, студијски програм  
Пољопривреда, модул Фитомедицина

3. Година завршетка

претходног нивоа студија: 2017.

4. Година уписа на докторске студије: 2017/2018.

5. Назив студијског програма  
докторских студија:

Пољопривредне науке, модул Фитомедицина

ПОДАЦИ О МЕНТОРУ:

Име и презиме ментора: Милан Стевић

Звање: ванредни професор

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације

1. **Milan Stević**, Petar Vukša and Ibrahim Elezović (2010): Resistance of *Venturia inaequalis* to demethylation inhibiting (DMI) fungicides. *Zemdirbyste-Agriculture*, 97 (4), 65-72.
2. Biljana Mirković, Brankica Tanović, Jovana Hrustić, Milica Mihajlović, **Milan Stević**, Goran Delibašić and Petar Vukša (2015): Toxicity of copper hydroxide, dithianon, fluazinam, tebuconazole and pyraclostrobin to *Didymella applanata* isolates from Serbia. *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 50: 3, 175-183.
3. **Milan Stević**, Nenad Tamaš, Novica Miletić and Petar Vukša (2015): Different toxicity of the strobilurin fungicides kresoxim-methyl and trifloxistrobin to *Venturia inaequalis* isolates from Serbia. *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 50: 9, 633-637.
4. Biljana Mirković, Brankica Tanović, **Milan Stević**, Jovana Hrustić, Milica Mihajlović, Goran Delibašić and Petar Vukša (2015): Toxicity of mancozeb, chlorothalonil, captan, fluopyram, boscalid, and difenoconazole to *Didymella applanata* isolates from Serbia. *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 50: 12, 845-850.
5. Uroš Vojinović, Biljana Pavlović, Brankica Tanović, **Milan Stević** (2019): Sensitivity and efficacy of the succinate dehydrogenase inhibitor fluxapyroxad, against raspberry spur blight fungus *Didymella applanata*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 126: (2), 145–152.

Обавештавамо вас да је Наставно-научно веће Пољопривредног факултета

на седници одржаној 27.11.2019. 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: 32/12-6.2.  
Датум: 27.11.2019. године  
БЕОГРАД-ЗЕМУН

На основу члана 51. и 52. Правилника о правилима докторских академских студија и члана 44. Статута Пољопривредног факултета, Наставно-научно веће факултета на седници одржаној 27.11.2019. године, донело је

## О Д Л У К У

**I ПРИХВАТА СЕ** тема докторске дисертације коју је поднео **УРОШ ВОЈИНОВИЋ, мастер** и одобрава израда дисертације под насловом: **«ОСЕТЉИВОСТ ПОПУЛАЦИЈА *Erysiphe necator* НА ФУНГИЦИДЕ РАЗЛИЧИТИХ МЕХАНИЗАМА ДЕЛОВАЊА У СРБИЈИ»**.

**II** За ментора се именује др Милан Стевић, ванредни професор.

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

### *Образложење*

Наставно-научно веће факултета разматрало је и усвојило Извештај о позитивној оцени научне заснованости теме докторске дисертације коју је поднео Урош Војиновић, мастер.

Наставно-научно веће факултета је приликом доношења одлуке оцењивало да ли је реч о оригиналној идеји и да ли је тема од значаја за развој науке, примену њених резултата, односно развој научне мисли уопште.

Сходно изнетом одлучено је као у диспозитиву.

**ПРЕДСЕДНИК  
НАСТАВНО-НАУЧНОГ ВЕЋА  
ДЕКАН**

---

*(Проф. др Душан Живковић)*

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

Универзитет у Београду  
**ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ**

Број:

Дана 23.10.2019. године

Београд - Земун

## **НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ ФАКУЛТЕТА**

**Предмет: Извештај Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата Уроша Војиновића, мастер инж.**

На основу члана 44. Став 1. Правилника о правилима докторских студија Пољопривредног факултета, а на предлог одговарајућег већа катедре и мишљење одговарајућег наставно-научног већа института, Наставно-научно веће факултета на седници одржаној 25.09.2019. године донело је одлуку бр. 32/10-5.2. да се образује Комисија за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата Уроша Војиновића, мастер инж. под насловом:

**„Осетљивост популација *Erysiphe necator* на фунгициде различитих механизма деловања у Србији“.**

Кандидат је дана 09.10.2019. године одбранио пријављену тему докторске дисертације, а потписан записник предат је у Студентску службу истог дана. Председник Комисије др Милан Стевић, ванредни професор, (Одлука број: 21/28-2 од 9.10.2019. године) подноси

### **ИЗВЕШТАЈ**

#### **1. Основни подаци о кандидату и дисертацији**

##### **1.1 Биографија кандидата**

Мастер инж. Урош Војиновић, рођен је 03.12.1993. године у Аранђеловцу. Основну школу и гимназију завршио је у родном граду. Основне академске студије на Пољопривредном факултету Универзитета у Београду, одсек Биљна производња, модул Фитомедицина, уписао је школске 2012/2013. године, а дипломирао 28.09.2016. године са просечном оценом 9,59 и оценом 10 на дипломског испиту. Школске 2016/2017. године уписао је мастер академске студије на Пољопривредном факултету Универзитета у Београду на одсеку за Фитомедицину. Мастер рад под називом „Модел заштите боровнице од проузроковача сиве трулежи (*Botrytis cinerea*)“, одбранио је 26.09.2017. године са оценом 10 и оствареном просечном оценом током студија 9,86. Докторске академске студије на Пољопривредном факултету Универзитета у Београду, одсек Пољопривредне науке, модул Фитомедицина, уписао је школске 2017/2018. године и до сада је на студијама остварио укупно 114 ЕСПБ бодова.

У току 2016. године обавио је тромесечну праксу у компанији Sagea SR Centro di Saggio s.r.l. у Алби (Италија), где је активно учествовао у различитим испитивањима у области заштите биља, пре свега бавећи се развојним студијама и регистрационим огледима са пестицидима, у складу са GEP i GLP методологијом. Кандидат је био стипендиста Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије школске 2013/14, 2014/15 и 2016/17. године и Фонда за младе таленте Министарства

омладине и спорта Републике Србије (Доситеј), школске 2015/2016. године. Школске 2015/2016. године, награђен је за изузетан успех током студија на Пољопривредном факултету Универзитета у Београду. Од школске 2017/2018. године учествује у извођењу вежби из два обавезна предмета Општа фитофармација и Фитофармација-фунгициди и једног изборног предмета Основни резистентности на пестициде, за студенте друге и четврте године основних академских студија на одсеку Биљна производња, модул Фитомедицина. Урош Војиновић је од маја 2018. године као стипендиста Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије ангажован на пројекту „Развој интегрисаних система управљања штетним организмима у биљној производњи са циљем превазилажења резистентности и унапређења квалитета и безбедности хране“ (ев. бр. ИИИ46008). У звање истраживач-приправник изабран је 2018. године на Пољопривредном факултету Универзитета у Београду. Члан је Друштва за заштиту биља Србије. Кандидат говори, чита и пише енглески језик, а поседује основно знање француског и италијанског језика.

У сарадњи са другим ауторима, објавио је или саопштио укупно 6 научних радова, од тога један рад из категорије M22, један рад из категорије M23, један рад из категорије M52 и 3 рада из категорије M64.

## 1.2 Предлог теме докторске дисертације

Предложен наслов теме докторске дисертације „**Осетљивост популација *Erysiphe necator* на фунгициде различитих механизма деловања у Србији**“, је прецизно формулисан и концизан. Наслов теме је у потпуности ускалђен са предвиђеним циљевима, програмом и предметом истраживања и пружа јасну слику шта ће бити спроведено и шта треба очекивати од истраживања која ће бити обављена.

## 2. Предмет и циљ дисертације

### 2.1 Предмет и програм истраживања

Гајење винове лозе представља веома значајну културну и историјску тековину. Подаци из 2017. године показују да се винова лоза у свету гаји на око 7,5 милиона хектара, као и да је у 5 земаља (Шпанија, Кина, Француска, Италија и Турска) је сконцентрисано готово 50 % укупне светске производње. Укупан принос грожђа на глобалном нивоу износи 73,3 милиона тона, док је целокупна производња вина процењена на око 279 милиона хектолитара. Виноградарска производња у Србији се одвија на приближно 21000 хектара, са годишњом производњом од око 160000 тона, што указује на економску важност винове лозе, поготово ако се узме у обзир и чињеница да се више од 70 % од укупне количине користи за производњу вина (FAOSTAT, 2019).

Један од економски најзначајнијих патогена у производњи грожђа је *Erysiphe necator* Schw., проузроковач пепелнице винове лозе. Патоген је распрострањен претежно у свим подручјима гајења винове лозе. Уколико изостане одговарајућа хемијска заштита, може доћи до губитака у производњи. Осим што може доћи до озбиљних губитака у приносу, знатно је умањен квалитет грожђа, превасходно због редукције садржаја шећера, фенола и антоцијана, а повећаног садржаја киселина, чиме се губи на органолептичким својствима, посебно на ароми и квалитету вина (Calonnec et al., 2004). Патоген у већини екосистема широм света презимљава у облику казмотеција на зараженим листовима, чокотима или земљишту, а други вид одржавања патогена (у условима топлије климе) је у облику мицелије у спавајућим (мирујућим) пупољцима из којих се на пролеће развијају тзв. „бели ластари“. У казмотецијама се

образују аспори са аспорама које врше примарне инфекције, и то најчешће у периоду између пуцања пупољака и цветања винове лозе. Овакве примарне инфекције представљају окидач за ширење болести - секундарне инфекције, које се касније одвијају помоћу конидија. Конидије се шире ветром и колонизују површинска ткива винове лозе, а највеће штете настају инфекцијом бобица, које су најосетљивије током формирања (Gadoury et al., 2012).

Савремена заштита винове лозе од проузроковача пепелнице заснива се на принципима интегралне заштите, али је употреба фунгицида остала најважнији и најефикаснији вид заштите од овог патогена. Сузбијање *E. necator* почива на употреби системичних и протективних фунгицида. Обично се годишње практикује примена 6-9 третирања, а редуковање примарног инокулума и спречавање примарних инфекција су круцијални сегменти успешне заштите винове лозе од проузроковача пепелнице, јер је касније знатно теже зауставити секундарне инфекције (Caffi et al., 2012). Од протективних фунгицида, неизоставан део свих програма заштите је сумпор, који се више од 100 година успешно користи у сузбијању *E. necator*. Примена системичних фунгицида чини основу заштите винове лозе од проузроковача пепелнице. Најчешће се користе фунгициди из следећих група: DMI фунгициди (миклобутанил, тебуконазол, дифеноконазол, пенконазол и др.), амини-морфолини (спироксамин), QoI (кресоксим-метил, трифлуксистробин и пираклостробин), SDHI (флуксапироксад, флуопирам, боскалид и др.), азанафталени (квикосифен и проквиназид) и арил-фенил кетони (метрафенон, пириофенон).

Услед специфичног механизма деловања системичних фунгицида (тзв. „single-site“ фунгициди), али и њихове континуиране примене, дошло је до развоја резистентности, најчешће индуковањем појединачних мутација на циљаним позицијама везивања фунгицида у организму патогена (Dèlye et al., 1997; Baudoin et al., 2008; Colcol 2008; Rallos 2012; Cherad et al., 2018). Као последица јавља се знатно смањена ефикасност тих једињења, а последњих година се у свету интензивирају бројна истраживања везана за ову појаву. Први знаци који указују да је дошло до промена у осетљивости популације овог патогена, јесу узастопни слаби ефекти одређених фунгицида у практичним условима примене. У окружењу, у Мађарској, у огледима, током 2005. и 2006. године уочена је смањена ефикасност фунгицида из групе стробилурина (пираклостробин, азоксистробин, трифлуксистробин и кресоксим-метил) у сузбијању проузроковача пепелнице винове лозе, како на листовима тако и на бобицама (Hoffmann et al., 2012). Резултати истраживања која су спроведена у Италији у периоду од 2011. до 2013. године (Kupova et al., 2015), сугеришу да је дошло до смањења ефикасности метрафенона у сузбијању проузроковача пепелнице винове лозе и наглог развоја резистентности популације *E. necator* на овај фунгицид, као и до настанка укрштене резистентности са пириофеноном.

Прецизнијих података о ефикасности фунгицида у сузбијању *E. necator* у претходних 10 година у нашој земљи и суседним земљама готово да нема, а последњи резултати датирају још с почетка 21. века. Последњих година, запажања из праксе указују на евидентан изостанак ефикасности након примене одређених фунгицида, пре свих стробилурина, што се може довести у везу са променом осетљивости овог патогена на ту групу фунгицида, а што указује на нужност спровођења детаљних испитивања везаних за ову појаву на подручју наше земље.

За утврђивање осетљивости популација *E. necator* неопходно је спровођење лабораторијских испитивања. Класичне методе за детекцију резистентности заснивају се на примени биотестова *in vivo* (најчешће тест са лисним дисковима), јер је реч о облигатном паразиту, док се савремена детекција базира на употреби молекуларних метода (конвенционални PCR и real-time PCR). Новија истраживања у свету

подразумевају комбиновање класичних и молекуларних метода са циљем испитивања осетљивости и детекције резистентности популација *E. necator* на фунгициде који су дужи низ година у употреби. Резистентност патогена на QoI фунгициде (стробилурине) развија се циљаним мутацијама на цитохром *b* гену, где долази до супституције глицина са аланином на позицији 143 (мутација означена као G143A). За детекцију резистентности поред биотеста, интегрисане су и молекуларне методе, где се уз употребу специфичних прајмера може брзо доћи до поузданих резултата. Најчешће је у употреби real-time PCR анализа, помоћу које је могуће квантификовати резистентност одређене популације патогена, односно утврдити колики је проценат G143A мутација заступљен у популацији (Baudoin et al., 2008; Dufour et al., 2010; Miles et al., 2012; Colcol and Baudoin; 2016). DMI фунгициди (триазоли) представљају највећу, али и најстарију групу системичних фунгицида који се и данас интензивно примењују у сузбијању *E. necator*, па је услед дуготрајне експлоатације ових једињења, широм света доказано присуство резистентних популација овог патогена. Три различита механизма резистентности су детектована, а сама детекција резистентности на фунгициде из групе триазола, поред класичних, заснива се и на употреби молекуларних метода (real-time PCR), коришћењем специфичних прајмера (Colcol et al., 2012; Frenkel et al., 2015; Rallos and Baudoin 2016; Ghule et al., 2018). Мимо ове две групе, молекуларна детекција резистентности развијена је и за SDHI фунгициде (Cherrad et al., 2018). Промене у осетљивости популација *E. necator* на фунгициде из групе азанафталена (квиноксефен и проквиназид) и из групе арил-фенил кетона (метрафенон и пириофенон), за сада је могуће детектовати искључиво путем биотеста, односно поређењем EC<sub>50</sub> вредности осетљивих и резистентних изолата и утврђивањем фактора резистентности (RF) (Genet and Jaworska, 2009; Kunova et al., 2015; Feng et al., 2018).

Програмом истраживања ове дисертације биће обухваћено:

- Утврђивање ефикасности фунгицида различитих механизма деловања који се данас користе у стандардним програмима заштите винове лозе у Србији: инхибитори биосинтезе стерола - триазоли (миклобутанил и дифеноконазол) и спирокетал-амини (спироксамин), инхибитори транспорта електрона у цитохром бц<sub>1</sub> комплексу – QoI (стробилурини) (трифлостробин и кресоксим-метил), инхибитори деобе ћелија - арил-фенил кетони (метрафенон и пириофенон), инхибитори сукцинат дехидрогеназе - SDHI (боскалид и флуксапироксад), инхибитори преноса сигнала - азанафталени (квиноксифен и проквиназид), неспецифични („multi-site) (сумпор), фунгициди непознатог механизма деловања (цифлуфенамид). Огледи ефикасности биће извођени у условима практичне примене током три експерименталне сезоне на три локалитета;
- Прикупљање узорка из најзначајнијих виноградарских рејона у Србији и њихово умножавање као полазни материјал за спровођење тестова осетљивости;
- Испитивање осетљивости популација *E. necator* на фунгициде различитих механизма деловања, применом *in vivo* метода (тест са лисним дисковима);
- Поређење осетљивости изолата на основу средње ефективне концентрације (EC<sub>50</sub>) и одређивање нивоа резистентности на основу фактора резистентности (RF)
- Детекција резистентних популација *E. necator* на QoI фунгициде (стробилурине) коришћењем молекуларних метода (real-time PCR);

## 2.2 Научни циљ истраживања

Основни циљеви ове дисертације оријентисани су ка испитивању осетљивости популација *Erysiphe necator* у Србији на фунгициде из различитих хемијских група *in vivo*, као и идентификацију и карактеризацију резистентности популација овог патогена на фунгициде из групе стробилурина, применом стандардних и молекуларних метода. Поред потенцијалне детекције резистентности на QoI фунгициде, један од циљева дисертације јесте и евентуална детекција резистентности *E. necator* и на друге фунгициде различитих механизма деловања. Имајући и виду да постоје индиције да је патоген постао мање осетљив и на друге групе фунгицида, у истраживање ће бити укључене све групе фунгицида које се данас користе у стандардним програмима заштите винове лозе од проузроковача пепелнице. Испитивања ефикасности фунгицида различитих механизма деловања, током три вегетационе сезоне на три локалитета, треба да дају одговоре и допринесу проналаску адекватних решења за сузбијање проузроковача пепелнице винове лозе, у смислу одговарајућег одабира и позиционирања фунгицида у програмима заштите.

## 3. Основне хипотезе од којих се полази у истраживању

Кандидат истиче следеће хипотезе на којима се темеље тема и програм ове дисертације:

- *Erysiphe necator*, проузроковач пепелнице винове лозе, економски је веома значајан патоген, који у годинама повољним за његов развој, у великој мери отежава заштиту, те уколико се не примене високо ефикасни фунгициди, губици у производњи могу бити огромни.
- *E. necator* је према FRAC-у сврстан у групу патогена са средњим до високим ризиком од развоја резистентности. Обзиром да се за његово сузбијање дужи низ година претежно користе системични фунгициди са специфичним механизмима деловања, који су такође у групи високо ризичних по питању резистентности, претпоставља се да је могло доћи до промене у осетљивости популација овог патогена у Србији. Ова хипотеза се поткрепљује чињеницом да у нашој земљи као ни у земљама ближег окружења, дужи временски период нема одговарајућих података о ефектима фунгицида у сузбијању овог патогена.
- Будући да је у пракси уочен изостанак ефикасности након примене одређених фунгицида, који су се до скоро успешно користили у заштити винове лозе од проузроковача пепелнице, постоји оправдана сумња да је дошло до развоја резистентности појединих популација *E. necator* у нашој земљи.
- У пољским огледима, ефикасност фунгицида новије генерације се значајно разликује од фунгицида који су знатно дуже у употреби.
- Применом тестова ефикасности, класичних *in vivo* (биотест са лисним дисковима) и молекуларних метода (real-time PCR) потенцијално ће се утврдити разлике у осетљивости популација патогена на различите фунгициде уз претпоставку да ће се детектовати резистентност на QoI фунгициде.



#### **4. Методе које ће се применити у истраживањима**

##### **4.1 Испитивање ефикасности фунгицида**

Испитивање ефикасност фунгицида спроводиће се током три вегетационе сезоне у комерцијалним виноградима на три локалитета у три виноградарска рејона. У огледу ће бити испитивани следећи фунгициди: кресоксим-метил, трифлуксистеробин, метрафенон, пириофенон, флуксапироксад, боскалид, квиноксифен, проквиназид, миклобутанил дифеноконазол, спироксамин, цифлуфенамид и сумпор. Експерименти ће бити постављени у складу са ЕРРО/ОЕРР методологијом, по типу потпуно случајног блок система у четири понављања. Оцена интензитета обољења биће израчуната по Townsend-Heuberger-овој формули на 100 случајно одабраних листова и 50 случајно одабраних гроздова. За оцену ће се користити следећа скала: 0= нема симптома; 1= 1-2% захваћене површине листа (грозда); 2= 2-5% захваћене површине листа (грозда); 3= 5-10% захваћене површине листа (грозда); 4= 10-25% захваћене површине листа (грозда); 5= 25-50% захваћене површине листа (грозда); 6= 50-75% захваћене површине листа (грозда); 7= >75% захваћене површине листа (грозда). Током једне вегетационе сезоне предвиђено је спровођење укупно две оцене на гроздовима и једне оцене на листовима. Ефикасност фунгицида биће израчуната према формули Abbott-a.

##### **4.2 Прикупљање узорака**

Прикупљање листова и бобица са карактеристичним симптомима болести, биће изведено у виноградима из неколико најзначајнијих виноградарских рејона у којима се спроводи интензивна заштита и где постоји дужа историја третирања фунгицидима, нарочито из групе стробилурина. Такође, заражено лишће и бобице биће узорковани и из пољских огледа, и то из контролне варијанте и појединих третмана где се установи смањена ефикасност фунгицида. Узорци ће бити прикупљени и са једног локалитета где се винова лоза не третира фунгицидима (осетљива популација).

##### **4.3 Одржавање патогена и умножавање инокулума за спровођење биотестова**

Од прикупљених узорака, у лабораторији ће бити вршена инокулација лишћа осетљивих биљака винове лозе (сорте Chardonnay), гајених у стакленику. Ове биљке ће служити за одржавање патогена и спровођење биотестова. У сврху одржавања патогена, користиће се млади, добро развијени листови, претходно стерилисани у раствору натријум- хипохлорита. Листови ће бити постављени у Петри кутије пречника 90 мм, испуњених воденим агаром, са лисним дршкама уроњеним у агар и лицем окренутим на горе. Лице листова ће бити инокулисано у ламинарној комори трансфером конидија са зараженог лишћа, употребом fine стерилне четкице, која ће између сваког трансфера бити стерилисана, потапањем у 95 % етанол. Петри кутије са инокулисаним листовима биће инкубирани у фитотрону у условима 12 часова светло, 12 часова тама, на температури 25 °C у трајању од 14 дана, како би се обезбедила масовна продукција конидија (Colcol, 2008; Rallos, 2012; Ghule et al., 2018).

##### **4.4 Утврђивање осетљивости изолата *Erysiphe necator* на различите фунгициде *in vivo***

У овом делу истраживања користиће се фунгициди различитих механизма деловања и то они код којих се у пољским огледима, установи смањења ефикасност у сузбијању проузроковача пепелнице винове лозе.

Млади листови биљака гајених у стакленику, користиће се за испитивање осетљивости изолата патогена. Листови ће бити стерилисани и исечени на дискове. Лисни дискови биће потапани у фунгицидни раствор у три понављања у трајању од 60 минута, док ће се контролни дискови потапати у дестиловану воду, а затим ће бити остављени да се осуше и након тога биће положени на водени агар лицем окренутим на горе. Након 24 часа, биће извршена инокулација лисних дискова, претходно умноженим инокулумом, уз помоћ fine четкице како би се обезбедила униформна дистрибуција спора по лисном ткиву. Након инокулације, следи инкубација и фитотрону под истим условима као и приликом умножавања инокулума, само у овом случају у трајању од око 10 дана, а након периода инкубације спровешће се оцена (Colcol, 2008; Ghule et al., 2018;).

Оцена ће се вршити посматрањем лисних дискова под бинокуларом, и то тако што ће се поредити просечан проценат захваћене површине листа у третманима са контролом, како би се добио одговарајући проценат инхибиције. Осетљивост изолата биће изражена преко вредности средње ефективне концентрације ( $EC_{50}$ ), а фактор резистентности биће израчунат као однос  $EC_{50}$  посматраног и најосетљивијег изолата у популацији (Colcol et al., 2012; Rallos and Baudoin; 2015).

#### 4.5 Молекуларна карактеризација резистентности

##### 4.5.1 Екстракција ДНК

За екстракцију ДНК паразита, користиће се заражено лишће и бобице са израженим симптомима пепелнице, прикуљени у виноградима из најзначајнијих виноградарских рејона и пољских огледа. Листови са симптомима обољења биће уситњени до финог праха, помоћу течног азота у стерилним лабораторијским аванима и стерилних лабораторијских тучкова. Укупна ДНК биће екстрахована употребом Qiagen DNeasy mericon Food Kit-a, у складу са протоколом и препорукама произвођача. Екстракти ДНК биће чувани у тубицама запремине 1,5 ml на температури  $-20^{\circ}C$  до даље употребе.

##### 4.5.2 Real-time PCR

SYBR Green quantitative PCR (Real-time PCR) метода ће бити коришћена за детекцију присуства и квантификацију процента G143A мутације у цитохром *b* гену. Амплификација ће се реализовати у Mic qPCR Cycleg машини (BMS, Аустралија). За утврђивање резистентности користиће се специфични прајмери конструисани од стране Baudoin et al. (2008), креирани са циљем да детектују мутацију код изолата *Erysiphe necator*. Прајмери који ће бити коришћени су следећи:

- прајмер за резистентан алел: 5'- TACGGGCAGATGAGCCTATGCGC -3'
- прајмер за „wild-type“ алел: 5'- TACGGGCAGATGAGCCTATGCGG -3'
- реверзни прајмер: 5'- ACCTACTTAAAGCTTTAGAAGTTTCC -3'

Две реакције ће бити припремљене за једно пуштање real-time PCR-а за сваки узорак ДНК уз употребу специфичних прајмера. Прва реакција амплификује резистентан алел, и у њој ће се користити прајмер за резистентан алел, док друга реакција амплификује „wild-type“ алел и у њој ће се користити прајмер за нормално осетљив алел („wild-type“). Реверзни прајмер је заједнички за обе реакције.

Компоненте сваке PCR реакције биће следеће: екстрахована ДНК, пар прајмера, 2xSYBR Green Mix и Nuclease-Free вода. Уместо ДНК у PCR реакцији, као негативна

контрола користиће се вода. PCR амплификација биће реализована коришћењем следећих параметара: претходно загревање на 95 °C у трајању од 15 минута, праћено са 40 циклуса на 94 °C 15 секунди, 60 °C 30 секунди и 72 °C 30 секунди. Прикупљање података ће се вршити на температури 72 °C (Baudoin et al., 2008). Одсуство нежељених продуката биће потврђено аутоматском „melting curve“ анализом (Rallo et al., 2014). Процентуална заступљеност G143A мутација у сваком узроку ДНК рачунаће се помоћу следеће формуле:  $\%G143A = 100 \times [1 \div (1 + 2^{CT(mutant) - CT(wildtype)})]$  коју су предложили Sirven and Beffa (2003).

#### 4.6 Статистичка обрада података

Резултати истраживања биће обрађени одговарајућим статистичким методама: интензитет обољења изражен у процентима биће обрађени једнофакторском анализом варијансе (ANOVA), а издвајање и поређење средина третмана Duncan-овим (DMR) тестом– програм Statistika (Statsoft Inc., 2001). EC<sub>50</sub> вредности у биотестовима биће израчунате на основу процената инхибиције помоћу пробит анализе (Finney, 1971).

### 5. Очекивани резултати и научни допринос

Кандидат у пријави наводи да у Србији као и земљама ближег окружења дужи временских период нема одговарајућих података и резултата о осетљивости популација *E. necator* на фунгициде као ни ефеката различитих фунгицида у сузбијању овог патогена. Последњи резултати научних испитивања датирају од пре 20-так година, а од тада је у примену уведен значајан број активних супстанци које припадају новијим класама фунгицида, а истовремено, интензивно су примењивани и старији фунгициди, синтетисани у другој половини прошлог века. 20. века. Добијени резултати тестова ефикасности треба да дају поуздане одговоре на питање који фунгициди су и даље високо ефикасни, а код којих је, и у којој мери, дошло до појаве резистентности

Најзначајнији циљеви ове дисертације темеље се на утврђивању осетљивости популација *E. necator* на фунгициде различитих механизма деловања употребом класичних и молекуларних метода. Мониторинг, прикупљање узорака и интеграција класичних и молекуларних метода у програм дисертације, треба да омогуће идентификацију резистентних популација на територији наше земље. Употребом класичних *in vivo* метода (теста са лисним дисковима), детерминисањем EC<sub>50</sub> вредности као параметра осетљивости и израчунавањем фактора резистентности, очекује се утврђивање разлика у осетљивости популација овог патогена на различите фунгициде. Очекује се да примена Real-time PCR анализе уз употребу специфичних прајмера омогући ефикасну детекцију и квантификацију резистентности у оним популацијама у којима је потенцијално дошло до мутације у оквиру цитохром *b* гена на позицији 143 (G143A). Поред молекуларне детекције резистентности на QoI фунгициде, потенцијално је могућа детекција резистентности и на друге групе фунгицида.

Обзиром да су у испитивање укључене све групе фунгицида које се данас користе у стандардним програмима заштите винове лозе од *E. necator*, поред научног, резултати ове дисертације могу треба да дају и значајан допринос са становишта практичне примене, јер могу унапредити актуелне програме заштите винове лозе, како у смислу одабира, тако и у смислу позиционирања фунгицида у програмима заштите, а у складу са принципима антирезистентне стратегије.

## **6. Закључак**

На основу анализе поднете пријаве, предложеног програма и очекиваних резултата истраживања, као и одржане јавне одбране научне заснованости предложене теме под насловом: „**Осетљивост популација *Erysiphe necator* на фунгициде различитих механизма деловања у Србији**“, Комисија сматра да је одабрана тема од великог научног и практичног значаја. Предложени наслов у потпуности одговара описаном предмету, циљу и програму истраживања. Анализом остварених научних резултата у досадашњем раду кандидата, као и резултата јавне одбране научне заснованости предложене теме, Комисија закључује да кандидат поседује одговарајућу компетентност за даља истраживања у склопу предложене докторске дисертације, те је уверена да ће предложени програм бити у потпуности и реализован.

Вишегодишња истраживања треба да пруже увид у осетљивост популација *E. necator* на фунгициде различитих механизма деловања у Србији. Спровођење класичних *in vivo* (метод са лисним дисковима) и молекуларних (Real-time PCR) метода, омогућиће идентификацију и детекцију резистентних популација овог патогена на фунгициде. Real-time PCR анализа уз употребу специфичних прајмера, треба да обезбеди ефикасну детекцију G143A мутације код резистентних популација *Erysiphe necator* на фунгициде из групе стробилурина (QoI), а могуће је и овом методом квантификовати проценат заступљености те мутације у оквиру саме популације патогена. Узимајући у обзир да програм ове дисертације садржи и испитивања ефикасности фунгицида током три вегетационе сезоне на три различита локалитета, где ће бити укључене све групе фунгицида које се користе у савременим програмима заштите, резултати ове дисертације могу имати велики практичан значај, који би се огледао у унапређењу програма заштите винове лозе у складу са принципима антирезистентне стратегије.

На основу свега наведеног, Комисија у саставу др Милан Стевић, др Милан Ивановић и др Емил Рекановић, позитивно оцењује поднету пријаву научне заснованости теме и предлаже Наставно-научном већу Пољопривредног факултета Универзитета у Београду да прихвати поднету пријаву и кандидату, Урошу Војиновићу, маг. инж., одобри израду докторске дисертације под насловом: „**Осетљивост популација *Erysiphe necator* на фунгициде различитих механизма деловања у Србији**“.

Тема докторске дисертације је из уже научне области Пестициди. Комисија за ментора ове докторске дисертације предлаже др Милана Стевића, ванредног професора Пољопривредног факултета Универзитета у Београду.

## **7. Име и референце предложеног ментора**

Име и презиме ментора: **др Милан Стевић**

Звање: **ванредни професор**

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. **Milan Stević**, Petar Vukša and Ibrahim Elezović (2010): Resistance of *Venturia inaequalis* to demethylation inhibiting (DMI) fungicides. *Zemdirbyste-Agriculture*, 97 (4), 65-72.
2. Biljana Mirković, Brankica Tanović, Jovana Hrustić, Milica Mihajlović, **Milan Stević**, Goran Delibašić and Petar Vukša (2015): Toxicity of copper hydroxide, dithianon, fluazinam,

tebuconazole and pyraclostrobin to *Didymella applanata* isolates from Serbia. Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes, 50: 3, 175-183.

3. **Milan Stević**, Nenad Tamaš, Novica Miletić and Petar Vukša (2015): Different toxicity of the strobilurin fungicides kresoxim-methyl and trifloxistrobin to *Venturia inaequalis* isolates from Serbia. Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes, 50: 9, 633-637.

4. Biljana Mirković, Brankica Tanović, **Milan Stević**, Jovana Hrustić, Milica Mihajlović, Goran Delibašić and Petar Vukša (2015): Toxicity of mancozeb, chlorothalonil, captan, fluopyram, boscalid, and difenoconazole to *Didymella applanata* isolates from Serbia. Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes, 50: 12, 845- 850.

5. Uroš Vojinović, Biljana Pavlović, Brankica Tanović, **Milan Stević** (2019): Sensitivity and efficacy of the succinate dehydrogenase inhibitor fluxapyroxad, against raspberry spur blight fungus *Didymella applanata*. Journal of Plant Diseases and Protection, 126: (2), 145–152.

Београд-Земун  
Дана 23.10.2019. године

#### ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

1. др Милан Стевић, ванредни професор  
Универзитет у Београду-Пољопривредни факултет  
(ужа научна област: Пестициди)

2. др Милан Ивановић, ванредни професор  
Универзитет у Београду-Пољопривредни факултет  
(ужа научна област: Фитопатологија)

3. др Емил Рекановић, виши научни сарадник  
Институт за пестициде и заштиту животне средине, Београд  
(ужа научна дисциплина: Фитофармација и токсикологија)

### **Прилози:**

- Прилог 1 - Списак саопштених и објављених научних и стручних радова кандидата;
- Прилог 2 - Списак литературе која ће се користити;
- Одлука одговарајућег већа катедре;
- Одлука одговарајућег наставно-научног већа института.

### **Прилог 1 - Списак саопштених и објављених научних и стручних радова кандидата Уроша Војиновића**

#### **Рад у истакнутом међународном часопису (M22=5)**

**Uroš Vojinović**, Biljana Pavlović, Brankica Tanović and Milan Stević (2019): Sensitivity and efficacy of the succinate dehydrogenase inhibitor fluxapyroxad, against raspberry spur blight fungus *Dydymella applanata*. Journal of Plant Diseases and Protection, 126, 2: 145-152.

#### **Рад у међународном часопису (M23=3)**

Tanja Vasić, **Uroš Vojinović**, Suzana Žujović, Vesna Krnjaja, Sanja Živković, Jordan Marković and Milan Stević (2019): *In vitro* toxicity of fungicides with different modes of action to alfalfa anthracnose fungus, *Colletotrichum destructivum*, Journal of Environmental Science and Health, Part B, DOI: [10.1080/03601234.2019.1653735](https://doi.org/10.1080/03601234.2019.1653735)

#### **Рад у истакнутом националном часопису (M52 = 1,5)**

**Урош Војиновић**, Милан Стевић (2017): Ефикасност фунгицида у сузбијању *Botrytis cinerea* у засаду боровнице. Биљни лекар (45) 5, 479-487.

#### **Саопштење са скупа националног значаја штампано у изводу (M64 = 0,2)**

**Урош Војиновић**, Милан Стевић (2017): Ефекти различитих фунгицида у заштити боровнице од *Botrytis cinerea*. XIV Саветовање о заштити биља. Златибор, 27. XI -1. XII 2017. Зборник резимеа, стр. 29.

**Урош Војиновић**, Ненад Илић и Милан Стевић (2018): Ефекти различитих фунгицида у сузбијању *Mycosphaerella fragariae* на јагоди. XV Саветовање о заштити биља. Златибор, 26. XI – 30. XI 2018. Зборник резимеа, стр. 59.

**Урош Војиновић**, Сузана Жујовић, Барбара Вукоја, Ненад Илић и Милан Стевић (2018): Ефикасност различитих фунгицида у заштити јагоде од *Botrytis cinerea*. XV Саветовање о заштити биља, Златибор, 26. XI – 30. XI 2018. Зборник резимеа, стр. 58.

## Прилог 2 - Списак литературе која ће се користити

- Bartlett, D. W., Clough, J. M., Godwin, J. R., Hall, A. A., Hamer, M., and Parr-Dobrzanski, B. 2002. The strobilurin fungicides. *Pest Manag. Sci.* 58:649-662.
- Baudoin, A., Olaya, G., Delmotte, F., Colcol, J. F., and Sierotzki, H. (2008). QoI Resistance of *Plasmopara viticola* and *Erysiphe necator* in the Mid-Atlantic United States. *Plant Health Progress*, 9(1), 25.
- Caffi, T., Legler, S. E., Rossi, V., & Bugiani, R. (2011). Evaluation of a Warning System for Early-Season Control of Grapevine Powdery Mildew. *Plant Disease*, 96(1), 104–110.
- Calonnec, A., Cartolaro, P., Poupot, C., Dubourdieu, D., and Darriet, P. (2004). Effects of *Uncinula necator* on the yield and quality of grapes (*Vitis vinifera*) and wine. *Plant pathology*, 53(4), 434-445.
- Cherrad, S., Charnay, A., Hernandez, C., Steva, H., Belbahri, L., and Vacher, S. (2018). Emergence of boscalid-resistant strains of *Erysiphe necator* in French vineyards. *Microbiological Research*, 216, 79–84.
- Colcol, J. F., and Baudoin, A. B. (2015). Sensitivity of *Erysiphe necator* and *Plasmopara viticola* in Virginia to QoI Fungicides, Boscalid, Quinoxifen, Thiophanate Methyl, and Mefenoxam . *Plant Disease*, 100(2), 337–344.
- Colcol, J. F., Rallos, L. E., and Baudoin, A. B. (2012). Sensitivity of *Erysiphe necator* to demethylation inhibitor fungicides in Virginia. *Plant disease*, 96(1), 111-116.
- Cortesi, P., Bisiach, M., Ricciolini, M., and Gadoury, D. M. (1997). Cleistothecia of *Uncinula necator*—an additional source of inoculum in Italian vineyards. *Plant disease*, 81(8), 922-926.
- Délye, C., Laigret, F., and Corio-Costet, M-F. 1997. A mutation in the 14 $\alpha$ -demethylase gene of *Uncinula necator* that correlates with resistance to a sterol biosynthesis inhibitor. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:2966-2970.
- Dufour, M. C., Fontaine, S., Montarry, J., and Corio-Costet, M. F. (2011). Assessment of fungicide resistance and pathogen diversity in *Erysiphe necator* using quantitative real-time PCR assays. *Pest Management Science*, 67(1), 60–69.
- Faostat (2019). <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>, преузето 21.08.2019.
- Feng, X., Nita, M., and Baudoin, A. B. (2018). Evaluation of Quinoxifen Resistance of *Erysiphe necator* (Grape Powdery Mildew) in a Single Virginia Vineyard. *Plant Disease*, 102(12), 2586–2591.
- Gadoury, D. M., Cadle-Davidson, L., Wilcox, W. F., Dry, I. B., Seem, R. C., and Milgroom, M. G. (2012). Grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*): A fascinating system for the study of the biology, ecology and epidemiology of an obligate biotroph. *Molecular Plant Pathology*, 13(1), 1–16.
- Genet, J. L., and Jaworska, G. (2009). Baseline sensitivity to proquinazid in *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* and *Erysiphe necator* and cross-resistance with other fungicides. *Pest Management Science*, 65(8), 878–884.
- Ghule, S. B., Sawant, I. S., Sawant, S. D., Saha, S., and Devarumath, R. M. (2019). Detection of resistance to demethylation inhibitor fungicides in *Erysiphe necator* from tropical India by biological and molecular assays. *Indian Phytopathology*, 72(1), 53-61.

- Green, E. A., and Gustafson, G. D. (2006). Sensitivity of *Uncinula necator* to quinoxifen: evaluation of isolates selected using a discriminatory dose screen. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 62(6), 492-497.
- Halleen, F., and Holz, G. (2001). An Overview of the Biology, Epidemiology and Control of *Uncinula necator* (Powdery Mildew) on Grapevine, with Reference to South Africa. *South african journal of Enology and Viticulture*, 22(2), 111-121.
- Hoffmann, P., Füzi, I., and Virányi, F. (2012). Indirect effect of fungicide treatments on chasmothecia of *Erysiphe necator* Schwein overwintering on grapevine bark. *Plant Protection Science*, 48(1), 21-30.
- Kast, W. K., and Bleyer, K. (2011). Efficacy of sprays applied against powdery mildew (*Erysiphe necator*) during a critical period for infections of clusters of grapevines (*Vitis vinifera*). *Journal of Plant Pathology*, S29-S32.
- Kunova, A., Pizzatti, C., Bonaldi, M., and Cortesi, P. (2016). Metrafenone resistance in a population of *Erysiphe necator* in northern Italy. *Pest management science*, 72(2), 398-404.
- Legler, S. E., Caffi, T., and Rossi, V. (2012). A nonlinear model for temperature-dependent development of *Erysiphe necator* chasmothecia on grapevine leaves. *Plant Pathology*, 61(1), 96-105.
- Ma, Z., and Michailides, T. J. (2005). Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop protection*, 24(10), 853-863.
- Miles, L. A., Miles, T. D., Kirk, W. W., and Schilder, A. M. C. (2012). Strobilurin (QoI) Resistance in Populations of *Erysiphe necator* on Grapes in Michigan. *Plant Disease*, 96(11), 1621-1628.
- Opalski, K. S., Tresch, S., Kogel, K. H., Grossmann, K., Köhle, H., and Hückelhoven, R. (2006). Metrafenone: studies on the mode of action of a novel cereal powdery mildew fungicide. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 62(5), 393-401.
- Rallos, L. E. E., and Baudoin, A. B. (2016). Co-occurrence of two allelic variants of CYP51 in *Erysiphe necator* and their correlation with over-expression for DMI resistance. *PLoS ONE*, 11(2).
- Rallos, L. E. E., Johnson, N. G., Schmale, D. G., Prussin, A. J., and Baudoin, A. B. (2014). Fitness of *Erysiphe necator* with G143A-Based Resistance to Quinone Outside Inhibitors. *Plant Disease*, 98(11), 1494-1502.
- Rossi, V., Caffi, T., and Legler, S. E. (2010). Dynamics of Ascospore Maturation and Discharge in *Erysiphe necator*, the Causal Agent of Grape Powdery Mildew. *Phytopathology*, 100(12), 1321-1329.
- Rügner, A., Rumbolz, J., Huber, B., Bleyer, G., Gisi, U., Kassemeyer, H. H., and Guggenheim, R. (2002). Formation of overwintering structures of *Uncinula necator* and colonization of grapevine under field conditions. *Plant pathology*, 51(3), 322-330.
- Sano, S., Kasahara, I., and Yamanaka, H. (2007). Development of a novel fungicide, cyflufenamid. *Journal of Pesticide Science*, 32(2), 137-138.
- Sierotzki, H., and Scalliet, G. (2013). A review of current knowledge of resistance aspects for the next-generation succinate dehydrogenase inhibitor fungicides. *Phytopathology*, 103(9), 880-887.



- Sirven, C., and Beffa, R. 2003. Resistance to fenamidone: Monitoring by real-time quantitative PCR on *Plasmopara viticola*. Pflanzenschutz Nachrichten-Bayer-English ed. 56:523-532.
- Wheeler, I. E., Hollomon, D. W., Gustafson, G., Mitchell, J. C., Longhurst, C., Zhang, Z., and Gurr, S. J. (2003). Quinoxifen perturbs signal transduction in barley powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*). Molecular plant pathology, 4(3), 177-186.