

Факултет Пољопривредни

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

Веће научних области
биотехничких наука

32/10-5.2.

(Број захтева)

28.09.2022.

(Датум)

(Назив већа научне области коме се захтев
упућује)

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:

„Идентификација и карактеризација фитопатогених гљива проузроковача болести стабла
боровнице у Србији“

(пун назив предложене теме докторске дисертације)

НАУЧНА ОБЛАСТ Фитомедицина

ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:

Име, име једног од родитеља и презиме кандидата:

1.

Милош, Благоје, Марић

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

Универзитет у
Београду

Пољопривредни факултет, Фитомедицина

3. Година завршетка

претходног нивоа студија: 2019.

4. Година уписа на докторске студије: 2019/2020.

5. Назив студијског програма
докторских студија:

Пољопривредне науке, модул Фитомедицина

ПОДАЦИ О МЕНТОРУ:

Име и презиме ментора: др Александра Булајић

Звање: редовни професор

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације

1. Vučurović, A., Kutnjak, D., Mehle, N., Stanković, I., Pecman, A., Bulajić, A., Krstić, B., and Ravnika, M. (2021): Detection of four new tomato viruses in Serbia using post-hoc high-throughput sequencing analysis of samples from a large-scale field survey. Plant Disease, published online as <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-20-1915-RE>.
2. Vojvodić, M., Tanović, B., Mitrović, P., Vico, I. Bulajić, A. (2020): Waitea circinata var. zeae causing root rot of cabbage and oilseed rape. Plant Disease, 105: 787- 796. DOI: 10.1094/PDIS-05-20-0942-RE. M21=8 (ISSN:0191-2917, e-ISSN:1943-7692, Plant Sciences, 33/209, IF: 3.192)
3. Stevanović, M., Ristić, D., Živković, S., Aleksić, G., Stanković, I., Krstić, B., Bulajić, A. (2018): Characterization of Gnomoniopsis idaeicola, the Causal Agent of Canker and Wilting of Blackberry in Serbia. Plant Disease 103: 249-258., doi: 10.1094/PDIS-03-18- 0516-RE. M21=8 (ISSN 0191-2917, Plant Sciences, 38/222, 2017, IF: 3.469) 10
4. Nikolić D., Vučurović A., Stanković I., Radović N., Zečević K., Bulajić A., Krstić B. (2018): Viruses affecting tomato crops in Serbia. European Journal of Plant Pathology 225- 235. M21=8 (ISSN 0929-1873, Agronomy, 26/87, 2017, IF: 1.728) <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1467-y>
5. Hrutić, J., Delibašić, G., Stanković, I., Grahovac, M., Krstić, B., Bulajić, A., Tanović, B. (2015): Monilinia Species Causing Brown Rot of Stone Fruits in Serbia. Plant Disease 99: 709-717.

Обавештавамо вас да је Наставно-научно веће Пољопривредног факултета

на седници одржаној 28.09.2022. 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: 32/10-5.2.
Датум: 28.09.2022. 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 28.09.2022. године, донело је

ОДЛУКУ

I ПРИХВАТА СЕ тема докторске дисертације коју је поднео **МИЛОШ МАРИЋ, мастер** и одобрава израда дисертације под насловом: **«ИДЕНТИФИКАЦИЈА И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ФИТОПАТОГЕНИХ ГЉИВА ПРОУЗРОКОВАЧА БОЛЕСТИ СТАБЛА БОРОВНИЦЕ У СРБИЈИ».**

II За ментора се именује др Александра Булајић, редовни професор Универзитета у Београду - Пољопривредног факултета.

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 Милош Марић, 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 02.09.2022. године

Београд - Земун

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ ФАКУЛТЕТА

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

На основу члана 44. Став 1. Правилника о правилима докторских студија Пољопривредног факултета, а на предлог одговарајућег већа катедре и мишљења одговарајућег наставно-научног већа института, Наставно-научно веће факултета на седници одржаној 29.06.2022. године, донело је одлуку бр. 32/9-4.5. да се образује Комисија у саставу др Александра Булајић, редовни професор, Универзитет у Београду-Пољопривредни факултет (ужа научна област Фитопатологија), др Дарко Јевремовић, виши научни сарадник, Институт за воћарство, Чачак (ужа научна дисциплина Фитопатологија) и др Ивана Вицо, редовни професор, Универзитет у Београду-Пољопривредни факултет (ужа научна област Фитопатологија) за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата Милоша Марића, мастер инж., под насловом:

Идентификација и карактеризација фитопатогених гљива проузроковача болести стабла боровнице у Србији

Кандидат је дана 30.06.2022. године одбранио пријављену тему докторске дисертације, а потписан записник предат је у Студентску службу 01.07.2022. године. У име Комисије председник др Александра Булајић, редовни професор, подноси

ИЗВЕШТАЈ

1. Основни подаци о кандидату и дисертацији

1.1 Биографија кандидата

Мастер инжењер пољопривреде, Милош Марић рођен је 03.02.1995. године у Ваљеву, Република Србија. Пољопривредни факултет Универзитета у Београду, студијски програм Биљна производња, модул Фитомедицина уписао је школске 2014/15 године. Дипломирао је 2018. године са просечном оценом 8,59 (осам и 59/100), одбравивши дипломски рад под називом „Резистентност дивљег сирка (*Sorghum halepense* (L.) Pers.) на хербициде ALS инхибиторе“ са оценом 10 (десет). Исте године уписује мастер академске студије на истом факултету, студијском програму и модулу. Наредне 2019.

године стиче звање мастер инжењера пољопривреде са просечном оценом 9,13 (девет и 13/100), одбранивши мастер рад по називом „Резистентност дивљег сирка (*Sorghum halepense* (L.) Pers.) на хербициде инхибиторе АССаза“ са оценом 10 (десет). Докторске академске студије уписује школске 2019/2020 године на одсеку Фитомедицина истог факултета. За ментора изабрао је проф. др Александру Булајић. Прво радно искуство стекао је у компанији Misid d.o.o., Београд, где је од фебруара 2020. године био ангажован на пословима регистрације средстава за заштиту биља. Од 01.07.2021. године запослен је у Field Test d.o.o., Београд, где директно учествује у испитивањима биолошке ефикасности пестицида у циљу њихове регистрације и добијања дозволе за промет у Републици Србији. Такође учествује у детекцији карантинских врста бактерија кромпира *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *Ralstonia solanacearum* и *Dickeya* ssp. Говори енглески језик. До сада је објавио један научни рад. Члан је Друштва за заштиту биља Србије.

1.2 Предлог теме докторске дисертације

Предложена тема докторске дисертације **„Идентификација и карактеризација фитопатогених гљива проузроковача болести стабла боровнице у Србији“** у складу је са предвиђеним задацима и циљевима који су зацртани и у потпуности одражава програм и предмет истраживања и пружа јасну слику шта се може очекивати од истраживања која ће бити спроведена.

2. Предмет и циљ дисертације

2.1 Предмет и програм истраживања

Боровница заузима све значајније место у производњи јагодастих воћака и распрострањена је широм света у рејонима погодним за њено гајење. Боровница је вишегодишња, жбунаста или полужбунаста биљка која припада фамилији Ericaceae, роду *Vaccinium* L. Постоје разне врсте боровнице које се користе у исхрани, а највећи значај припада следећим: *Vaccinium myrtilloides* Michaux (канадска горка нискожбунаста боровница), *V. angustifolium* Aiton (нискожбунаста боровница), *V. corymbosum* L. (северна високожбунаста боровница), *V. australe* Small (југоисточна високожбунаста боровница) и *V. ashei* Reade (боровница зечје око). Врста која је задржала примат како у свету тако и код нас јесте *V. corymbosum* L. у оквиру које постоје различите групе сорти. Коренов систем боровнице је површински и дифузан. Висина зависи од врсте, сорте, начина гајења и креће се од 30 cm до 9 m. Једнослојни епидермис стабла покривен је дебелом кутикулом. Састоји се од изданака који су угласти, голи или прекривени маљама, док су листови прости, наизменично распоређени, елиптичног облика са назубљеним ободом. Лице листа је зелене, а наличје бледозелене боје. Лист високожбунасте боровнице одликује се присуством маља. Цветови боровнице су хермафродитни, појединачни или чешће код гајених сорти груписани у гроздасте цвасти. Плод боровнице је сочна бобица, округласто-спљоштеног облика, тамноплаве или љубичасте боје. Перикарп плода изграђен је из егзокарпа и мезокарпа. Плод садржи до 65 семенки, али већина није потпуно развијена (Николић и Миливојевић, 2015).

Због својих лековитих и хранљивих својстава све је већа потражња за плодовима ове воћке, који су изузетно богати гвожђем, угљеним хидратима и органским киселинама. Осим конзумирања у свежеј стању, плодови су погодни за замрзавање и прераду (сокови, јогурт, сладолед) (Миливојевић, 2018).

Према обиму производње у светским размерама боровница се налази на петом месту у групи јагодастих воћака, после јагоде, малине, бруснице и црне рибизле (Николић и Миливојевић, 2015; Миливојевић, 2018). Производња боровнице у свету 2020. године износила је 850.886 t плодова (FAO, 2022). Највећи произвођачи боровнице у свету су САД (294.000 t), Перу (180.300 t) и Канада (146.370 t). Значајно повећање производње боровнице регистровано је и у Чилеу, где је у сезони 2016/2017 производња достигла ниво од 130.000 t. У Европи највећу производњу боровнице имају Немачка (113.000 t), Пољска (55.300 t), Шпанија (48.520 t) и Холандија (9.200 t) (FAOSTAT, 2020). У САД, високожбунаста боровница највише се гаји у државама Мичиген, Њу Џерси, Орегон и Северна Каролина. Према наводима Петровић и сар. (2007), међу европским земљама боровница се узгаја на већим површинама у Немачкој (1.200 ha) и Пољској (600 ha). Нове сорте боровнице, боље адаптиране на нетрадиционалне услове гајења, повећале су укупне површине у свету чак до 90%, нарочито у периоду 1995-2005. године (Zhao, 2007). Примарна сврха ширења производње у подручјима лоцираним на малим географским ширинама (Чиле, Аргентина, Мексико и Шпанија) јесте обезбеђивање ране сезоне зрења боровнице (Николић и Миливојевић, 2010).

На основу званичних статистичких података, у Србији се боровница се гаји на око 344 ha (Републички завод за статистику, 2018), док се процењује да су стварне површине вишеструко веће и достижу око 3000 ha. Највећи број подигнутих засада се налази у околини Ариља, Ужица, Бајине Баште, Љига, Младеновца, Књажевца и Власинског језера. Сорта Duke заузима доминантно место у производњи захваљујући раном сазревању, високој родности и квалитету плода (Миливојевић, 2018).

На профитабилност производње боровнице утиче велики број фактора, абиотске и биотске природе. Од абиотских фактора, за успешну производњу боровнице неопходни су повољни климатски, земљишни и орографски чиниоци. Један од најзначајнијих ограничавајућих биотских фактора у производњи јесу фитопатогене гљиве као проузроковачи болести боровнице. Осим губитака који се огледају у смањењу висине и квалитета приноса, у екстремним ситуацијама може доћи до сушења биљака и крчења читавих засада. У свету је описано више врста фитопатогених гљива патогена боровнице, а као најважније које проузрокују симптоме на корену наводе се *Macrophomina phaseolina* проузроковач трулежи корена боровнице (Avilés et al., 2021), *Armillaria mellea* проузроковач трулежи корена (Prodorutti et al., 2007) и *Phytophthora cinnamomi* проузроковач трулежи корена високожбунасте боровнице (Smith, 2006). Економски најзначајнији патогени који доводе до појаве симптома на стаблу боровнице јесу *Neofusicoccum parvum*, *N. australe* и *N. nonquasitum*, као најчешћи проузроковачи пуцања коре стабла боровнице (Pérez et al., 2014), *Lasiodiplodia theobromae* и *L. vaccinii* као најзначајнији проузроковачи некротичне пегавости стабла боровнице (Zhao et al., 2019a), *Puccinia georepelfertianum* проузроковач рђе стабла (Николић и Миливојевић, 2015), *Botryosphaeria corticis* проузроковач пуцања коре стабла (Milholland, 1971), *B. dothidea* проузроковач некротичне пегавости стабла боровнице (Milholland, 1972) и *Phomopsis vaccinii* проузроковач рака и сушења изданка боровнице. Најзначајније фитопатогене гљиве као проузроковачи болести на листу и плоду боровнице јесу *P. myrtilis*

проузроковач рђе листа (Николић и Миливојевић, 2015), *Monilinia vaccinii corymbosi* проузроковач смеђе трулежи плода (Prodorutti, 2007), *Botrytis cinerea* проузроковач сиве трулежи (Prodorutti et al., 2007) и друге. Изолација *B. cinerea* проузроковача сиве трулежи са врхова стабљика, потврђује да ова полифагна врста може озбиљно угрозити производњу високожбунасте боровнице и бити ограничавајући фактор у висини и квалитету приноса (Szmagara, 2009).

У Чилеу, најучесталије болести забележене у интензивним засадама високожбунасте боровнице јесу пуцање коре стабла и изумирање грана са инциденцом 15 – 45%. Врсте *N. parvum*, *N. arbuti* и *N. australe* идентификоване су на основу морфолошких карактеристика, као и анализом нуклеотидних секвенци ITS региона рибозомалне DNA. Наведене врсте рода *Neofusicoccum* изоловане су из заражених делова боровнице, а спроведени тест патогености је потврдио осетљивост сорти Brigitta, Bluecrop, Brightwell, Duke, Elliott, Misty и O’Neal према наведеним врстама рода *Neofusicoccum*. Тестови патогености су доказали да је врста *N. parvum* најагресивнија, док је сорта Elliot била најосетљивија (Espinoza et al., 2009).

У истраживању спроведеном у Кини током 2012. године, на основу морфолошких карактеристика и анализа нуклеотидних секвенци ITS региона, идентификоване су три врсте: *Botryosphaeria dothidea*, *Neofusicoccum parvum* и *Lasiodiplodia theobromae*, као главни узрочници гљивичних обољења на боровници. На основу теста патогености потврђено је да су *N. parvum* и *L. theobromae* вирулентније од *B. dothidea* (Xu et al., 2015).

Слично истраживање спроведено је и у Португалу, с циљем да се утврде које врсте из фамилије Botryosphaeriaceae су најзначајнији проузроковачи болести на боровници. Идентификоване су: *B. dothidea*, *N. parvum*, *N. australe* и *N. eucaliptorum*. *N. eucaliptorum*, проузроковач пуцања коре еукалиптуса, први пут је детектован као патоген боровнице (Hilario et al., 2020). Такође, истраживањем у Кини, спроведеном 2017. године, доказано је да је 12 изолата од 37 изолата из фамилије Botryosphaeriaceae морфолошки кохерентно са родом *Lasiodiplodia*. На основу филогенетских анализа гена за RNA полимеразу II, бета-тубулин и фактора елонгације транслације-1 α тих 12 изолата идентификовани су као припадници нове врсте, *Lasiodiplodia vaccinii*. Тестови патогености показали су да ова гљива проузрокује некротичну пегавост изданка на садницама боровнице (Zhao et al., 2019a).

У Србији има мало података о присутним врстама, распрострањености и значају фитопатогених гљива проузроковача болести високожбунасте боровнице. У августу 2015. године на високожбунастој боровници први пут је детектована врста *Macrophomina phaseolina* молекуларном анализом ITS региона и дела региона TEF-1 α (Popović et al., 2017). Новији подаци везани за нашу земљу, спроведени као део истраживања у оквиру ове дисертације доказали су присуство патогена *Neopestalotiopsis clavispora* као проузроковача одумирања гранчица високожбунасте боровнице. Детекција је потврђена на основу морфолошких карактеристика, анализом секвенци ITS rDNA региона (Nuclear ribosomal internal transcribed spacer region), као и гена за TEF1 α (Translation elongation factor 1A) и β -тубулин (Beta tubulin). Тестови патогености су спроведени на сорти Elliot, а резултати доказују да су тестирани изолати патогени (Jevremović et al., 2022).

2.2 Научни циљ истраживања

Нагло и стално повећање производних површина под боровницом у Србији, у условима недостатака новијих информација, показало је да је присуство и распрострањеност фитопатогених гљива, патогена боровнице у Србији недовољно истражена област. Расветљавање етиологије и проучавање распрострањености болести боровнице у Србији представља основни циљ истраживања ове докторске дисертације. Током вишегодишњих истраживања која укључују најзаступљеније сорте, као и најинтензивније рејоне гајења боровнице, проучиће се комплекс фитопатогених гљива као проузроковача болести боровнице у Србији. Расветљавање етиологије болести стабла боровнице обавиће се полифазним приступом, кроз идентификацију и карактеризацију молекуларним, морфолошким и биолошким путем, што ће разјаснити које су све врсте гљива патогени боровнице присутне у Србији. Очекује се детекција нових врста у нашој земљи, а циљ је и да се добијени резултати упореде се са осталим проузроковачима болести боровнице у свету. Значајан циљ јесте и сагледавање варијабилности у оквиру изолованих врста да би се добио први увид у структуру популације изолата одабраних економски значајних врста. Анализа секвенци више одабраних локуса најраспрострањенијих врста гљива пружиће основу за успостављање брзих протокола за поуздану и правовремену молекуларну детекцију и идентификацију без чега је немогуће успоставити успешне мере контроле веома значајних патогена боровнице у Србији.

3. Основне хипотезе од којих се полази у истраживању

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

- Претпоставља се да стално повећање површина под боровницом и увоз садног материјала чије здравствено стање често није проверено, доводи до интродукције фитопатогених гљива проузроковача болести боровнице;
- Претпоставља се да је у Србији присутан већи број врста из различитих родова који су проузроковачи болести стабла боровнице;
- Очекује се да су таксономски разнородне врсте проузроковачи болести стабла боровнице у нашој земљи различитог значаја, да изазивају уочљиве симптоме, да је различита распрострањеност појединих проузроковача као и учесталости њихове појаве и интензитета болести које изазивају;
- Очекује се да је комплекс проузроковача болести стабла боровнице веома разноврстан, односно да га чини значајно већи број врста од до сада познатих и регистрованих у Србији. Многе од ових патогена ће по први пут бити потпуно окарактерисани у нашој земљи;
- Истраживања у оквиру дисертације даће поуздане смернице за детекцију, идентификацију и молекуларну карактеризацију патогена, што директно утиче на развој система истраживања болести боровнице;
- Добијене информације представљаће основну базу за избор и предузимање одговарајућих мера контроле у виду спречавања интродукције патогена као и даљег ширења у засадама.

4. Методе које ће се применити у истраживањима

1) Обилазак терена и сакупљање узорака биљног материјала

Прикупљање почетног биљног материјала потребног за испитивања биће обављено у засадима боровнице у периоду од 2019–2022. године, на већем броју локалитета у свим најзначајнијим рејонима гајења боровнице у Србији. Материјал ће бити сакупљен са комерцијално најзначајнијих и најзаступљенијих сорти у Србији као што су Duke, Bluescor, Dgarer и друге. Узорковање ће бити обављено у неколико термина током године, како у време мировања вегетације тако и у време вегетационог периода, како би обухватили што шири дијапазон симптома болести. Из сваког засада биће сакупљен већи број узорака који ће се даље третирали као почетни материјал за даља испитивања.

2) Изолација патогена из сакупљених узорака

Из узорака односно заражених стабала боровнице обавиће се изолација патогена према стандардним фитопатолошким методама. Фрагмент са прелаза здравог и зараженог ткива биће исечен и пребачен стерилним прибором на кромпир-декстрозни агар (PDA) и инкубиран у термостату 7-10 дана, при температури 25°C, у условима мрака. Након инкубације и развоја мицелије, у циљу добијања чистих култура, извршиће се изолација издвајањем мицелије стерилним прибором и пребацивањем на свежу PDA подлогу. Моноспорни изолати добиће се пребацивањем суспензије спора из чистих култура на водени агар (WA). Након инкубације у трајању од 12 часова на температури од 25°C вршиће се обележавање и пребацивање појединачних исклијалих спора на свежу PDA подлогу. Овим поступком добиће се моноспоријални изолати гљива који ће бити коришћени у даљим истраживањима. У случају када не буде било могуће добити моноспорне изолате, користиће се изолати врха хифе.

3) Провера патогености

Тест патогености моноспорних изолата фитопатогених гљива изолованих из стабла боровнице спровешће се путем инокулације двогодишњих биљака боровнице у контролисаним условима клима коморе (28°C) применом одговарајућих модификованих метода (Zhao et al., 2019b). На биљкама за инокулацију ће бити направљен засек под кору, дужине 5 mm. Као инокулум користиће се колоније репрезентативних изолат сваке детектоване врсте добијене током истраживања одгајене на PDA. Са добро развијених колонија издвојиће се фрагменти мицелије пречника 5 mm и нанети на претходно направљен засек навлажен стерилном водом, а затим обложити парафилмом како би задржали услове влажности. Применом истих метода, стерилна PDA подлога користиће се за инокулације резница које ће послужити као негативна контрола. Оглед ће бити постављен у 4 понављања и поновиће се 2 пута. Инокулисане биљке биће инкубирани у термостату на температури од 25°C у условима мрака, на температури 25°C и високој релативној влажности ваздуха у трајању од 3 недеље или до појаве симптома, а потом ће уследити читавање резултата. Пратиће се појава некрозе, лезија, некротичних пега као и формирање репродуктивних творевина око места инокулације. Из свих биљака са симптомима обавиће се реизолација применом истих метода као и при изолацији и

поређење са морфолошким особинама изворних испитиваних изолата. Тако добијени реизолати користиће се у даљем раду јер су тиме испуњени Кохови постулати.

4) Конвенционална идентификација

Репрезентативни изолати сваке врсте детектоване током истраживања биће идентификовани применом конвенционалних метода проучавањем морфолошких макроскопских и микроскопских особина. Морфолошке особине детектованих изолата биће проучаване на PDA као стандардној подлози, а по потреби и на селективним подлогама као што је агар од иглица бора (Espinoza et al., 2009). Морфолошке макроскопске особине подразумевају одређивање боје и изгледа колонија, присуство концентричних прстенова, текстуре мицелије, брзине пораста, формирање пигмената и друго. Микроскопским особинама проучаваће се облик, боја, величина и распоред творевина полног и бесполог размножавања. Такође ће бити извршено и мерење свих формираних репродуктивних творевина и спора.

5) Молекуларна идентификација

Ланчана реакција полимеразе (Polymerase chain reaction, PCR) биће примењена у циљу молекуларне идентификације и карактеризације различитих изолата одабраних за даља испитивања.

Екстракција нуклеинских киселина. Екстракција ДНА (дезоксирибонуклеинска киселина) обавиће се коришћењем комерцијалног кита DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), према упутству произвођача, из ваздушне мицелије изолата одгајених на PDA хранљивој подлози у условима мрака при температури од 25°C у трајању од 7 дана.

Ланчана реакција полимеразе. За идентификацију проузроковача болести користиће се метода ланчане реакције полимеразе са одговарајућим прајмерима. Биће коришћени нуклеарни, митохондријални и протеински гени (*housekeeping*). У истраживања ће бити укључени неки од следећих генских региона ITS rDNA регион (Nuclear ribosomal internal transcribed spacer region) (White et al., 1990), TEF1 α (Translation elongation factor 1 α) или β -тубулин (Beta tubulin) (Guarnaccia et al., 2020).

Визуелизација продуката PCR реакције. Амплификовани фрагменти биће визуелизовани електрофоретским раздвајањем у 1% агарозном гелу у 1 x TBE пуферу, бојењем етидијум-бромидом и посматрањем помоћу UV-трансилуминатора. За одређивање величине амплификованих фрагмената користиће се маркер, Mass Ruler DNA Leader, Low Range (Fermentas).

Секвенцирање. Умножени фрагменти ITS региона rDNA, TEF1 α и β -тубулин биће пречишћени и подвргнути секвенцирању. Коришћењем BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) анализе вршиће се упоређивање са другим секвенцама доступним у базама података: NCBI (National Centre for Biotechnology Information), BOLD (Barcode of Life Data System) и Q-bank (EPPO-Q-bank).

Филогенетске анализе. Прорачун генетичке сличности секвенци одабраних изолата са изолатима из других делова света, обавиће се коришћењем софтверског пакета MEGA X (Kumar et al., 2018). Проучавање еволутивне повезаности одабраних изолата, вишеструко упаривање секвенци и реконструкција филогенетских стабала (заснованих на појединачним генима или комбинованим вишегенским подацима) секвенцираних изолата са изолатима доступним у базама података, биће обављено коришћењем Neighbor-joining, Maximum-likelihood и Maximum-parsimony метода интегрисаних унутар програма MEGA X и bootstrap подршке са 1000 понављања. Сва испитивања, осим секвенцирања, биће изведена у Лабораторији за биљну вирусологију и микологију, Катедре за фитопатологију, Института за фитомедицину, Пољопривредног факултета Универзитета у Београду.

6) Тестови вирулентности

У циљу испитивања вирулентности добијених изолата извршиће се инокулација ожиљених резница, са одабраним референтним изолатима појединих значајних врста проузроковача болести стабла боровнице. Инокулација ће бити изведена методом повређивања и наношењем мицелије изолата на место повреде двогодишњих резница боровнице уз коришћење одговарајућих контрола. Тестови вирулентности биће изведени у условима стакленика, а резултати ће се читавати након појаве симптома према скали која ће бити развијена у оквиру ове дисертације. Сви добијени резултати биће статистички обрађени применом одговарајућих метода, а у циљу оцене значајности добијених разлика.

5. Очекивани резултати и научни допринос

У светској литератури болести стабла боровнице привлаче велику пажњу, док истраживања сличног садржаја која су предложена у оквиру ове докторске дисертације, нису раније обављена у нашој. Очекује се да ће ова истраживања допринети да се установе проузроковачи пропадања боровнице у засадима у Србији, као и бољем познавању болести боровнице у свету. Детаљна карактеризација изолата идентификованих врста показује да је пропадање боровнице у Србији изазвано са више врста гљива, а установиће се њихова распрострањеност и учесталост. Резултати морфолошких и молекуларних испитивања ће омогућити да се одреди тачна таксономска позиција изолованих патогена стабла боровнице из Србије, а указаће и на филогеографски међуоднос са изолатима сродних врста у свету. Тестови вирулентности показује биолошки међуоднос добијених изолата, као и да ли постоји разлика у реакцији боровнице на вештачке инокулације одабраним референтним изолатима различитих врста детектованих током предвиђених истраживања у Србији.

6. Закључак

На основу анализе поднете пријаве, одржане јавне одбране научне заснованости теме, предложеног програма и очекиваних резултата докторске дисертације Милоша Марића, мастер инж., под насловом: „**Идентификација и карактеризација фитопатогених гљива проузроковача болести стабла боровнице у Србији**“, Комисија сматра да ће изабрана област истраживања обезбедити резултате од великог значаја за производњу боровнице у Србији и у свету. Предложени наслов одговара постављеном циљу и програму истраживања. Током писања пријаве и током јавне одбране научне заснованости теме,

кандидат је показао широко знање везано за проблематику проучавања ових гљива, као и компетентност и иновативност у решавању задатака које поставља дисертација. Истраживања у оквиру ове дисертације ће, кроз идентификацију и детаљну молекуларну и морфолошку карактеризацију различитих врста фитопатогених гљива проузроковача пропадања боровнице у нашој земљи, дати допринос у познавању ових болести у свету. За очекивати је да пропадање жбунова боровнице у Србији изазива више врста гљива које се јављају у појединачним и мешаним заразама, а добијени резултати указаће по први пут у Србији на присуство, распрострањеност, преваленцију и значај појединих врста као и на њихову различиту вирулентност у вештачким заразама резница боровнице.

На основу свега изнетог, Комисија у саставу др Александра Булајић, др Дарко Јевремовић и др Ивана Вицо, позитивно оцењује поднету пријаву и предлаже Наставно-научном већу Пољопривредног факултета Универзитета у Београду да прихвати поднету пријаву и Милошу Марићу, мастер инж., одобри израду докторске дисертације под насловом: **„Идентификација и карактеризација фитопатогених гљива проузроковача болести стабла боровнице у Србији“**.

Комисија за ментора ове докторске дисертације предлаже др Александру Булајић, редовног професора, Универзитета у Београду-Пољопривредни факултет.

7. Име и референце предложеног ментора

Име и презиме ментора: **др Александра Булајић**

Звање: **редовни професор**

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Vučurović, A., Kutnjak, D., Mehle, N., Stanković, I., Pecman, A., **Bulajić, A.**, Krstić, B., and Ravnikar, M. (2021): Detection of four new tomato viruses in Serbia using post-hoc high-throughput sequencing analysis of samples from a large-scale field survey. *Plant Disease*, published online as <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-20-1915-RE>.
2. Vojvodić, M., Tanović, B., Mitrović, P., Vico, I. **Bulajić, A.** (2020): *Waitea circinata* var. *zeae* causing root rot of cabbage and oilseed rape. *Plant Disease*, 105: 787-796. DOI: [10.1094/PDIS-05-20-0942-RE](https://doi.org/10.1094/PDIS-05-20-0942-RE). M₂₁=8 (ISSN:0191-2917, e-ISSN:1943-7692, *Plant Sciences*, 33/209, IF: 3.192)
3. Stevanović, M., Ristić, D., Živković, S., Aleksić, G., Stanković, I., Krstić, B., **Bulajić, A.** (2018): Characterization of *Gnomoniopsis idaeicola*, the Causal Agent of Canker and Wilting of Blackberry in Serbia. *Plant Disease* 103: 249-258., doi: 10.1094/PDIS-03-18-0516-RE. M₂₁=8 (ISSN 0191-2917, *Plant Sciences*, 38/222, 2017, IF: 3.469)

4. Nikolić D., Vučurović A., Stanković I., Radović N., Zečević K., **Bulajić A.**, Krstić B. (2018): Viruses affecting tomato crops in Serbia. European Journal of Plant Pathology 225-235. M₂₁=8 (ISSN 0929-1873, Agronomy, 26/87, 2017, IF: 1.728) <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1467-y>
5. Hrustić, J., Delibašić, G., Stanković, I., Grahovac, M., Krstić, B., **Bulajić, A.**, Tanović, B. (2015): *Monilinia* Species Causing Brown Rot of Stone Fruits in Serbia. Plant Disease 99: 709-717.

Београд-Земун
Дана 02.09.2022. године

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

др Александра Булајић, редовни професор
Универзитет у Београду-Пољопривредни факултет
(ужа научна област: Фитопатологија)

др Дарко Јевремовић, виши научни сарадник,
Институт за воћарство, Чачак
(ужа научна дисциплина: Фитопатологија)

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

**Прилог 1. Списак саопштених и објављених научних и стручних радова кандидата
Милоша Марића**

Jevremović, D., Vasić, T., Živković, S., Vasiljević, B., Marić, M., Vojvodić, M., Bulajić, A.
(2022): *Neopestalotiopsis clavispora*: A Causal Agent of Twig Dieback on Highbush
Blueberries in Serbia. Journal of Plant Diseases and Protection.
<https://doi.org/10.1007/s41348-022-00610-x>.

Прилог 2. Списак литературе која ће се користити

- Avilés, M., De los Santos, B., Borrero, C. (2021): Increase of Canker Disease Severity in Blueberries Caused by *Neofusicoccum parvum* or *Lasiodiplodia theobromae* Due to Interaction with *Macrophomina phaseolina* Root Infection. *European Journal of Plant Pathology*, 159: 655–663.
- Espinoza, J., Briceno, E., Chavez, E., Urbez-Torres, J., Latorre, B. (2009): *Neofusicoccum* spp. Associated with Stem Canker and Dieback of Blueberry in Chile. *Plant Disease*, 93: 1187–1194.
- FAOSTAT (2022): <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>
- Hilario, S., Lopes, A., Santos, L., Alves, A. (2020): *Botryosphaeriaceae* Species Associated with Blueberry Stem Blight and Dieback in the Centre Region of Portugal. *European Journal of Plant Pathology*, 156: 31–44.
- Jevremović, D., Vasić, T., Živković, S., Vasiljević, B., Marić, M., Vojvodić, M., Bulajić, A. (2022): *Neopestalotiopsis clavispora*: A Causal Agent of Twig Dieback on Highbush Blueberries in Serbia. *Journal of Plant Disease and Protection*, <https://doi.org/10.1007/s41348-022-00610-x>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35: 1547–1549.
- Milholland, R. D. (1971): Factors Affecting Sporulation and Infection by the Blueberry Stem Canker Fungus, *Botryosphaeria corticis*. *Phytopathology*, 62: 137–139.
- Milholland, R. D. (1972): Histopathology and Pathogenicity of *Botryosphaeria dothidea* on Blueberry Stems. *Phytopathology*, 62: 654–660.
- Миливојевић, Ј. (2018): Јагодасте воћне врсте: Технологија гајења. Пољопривредни факултет Универзитета у Београду.
- Николић, Д. М., Миливојевић, М. Ј. (2015): Јагодасте воћке: Технологија гајења. Друго допуњено издање, Пољопривредни факултет Универзитета у Београду.
- Pérez, S. F., Meriño - Gergichevich, C. J., Guerrero, C. (2014): Detection of *Neofusicoccum nonquaesitum* Causing Dieback and Canker in Highbush Blueberry From Southern Chile. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 14, 3: 581–588.
- Петровић, С., Лепосавић, А., Вељковић, Б. (2007): Купина и боровница. Институт за воћарство, Чачак и Истраживачко развојни центар „Љекобиле“ Д.О.О., Требиње.
- Popović, T., Blagojević, J., Aleksić, G., Jelušić, A., Krnjajić, S., Milovanović, P. (2017): A Blight Disease on Highbush Blueberry Associated with *Macrophomina phaseolina* in Serbia. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 40, 1:121–127.
- Prodorutti, D., Pertot, I., Giongo, L., Gessler, C. (2007): Highbush Blueberry: Cultivation, Protection, Breeding and Biotechnology. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology*, 1, 1: 44–56.
- Smith, B. J. (2006): Phytophthora Root Rot and *Botryosphaeria* Stem Blight: Important Diseases of Southern Highbush Blueberries in The Southern United States. *Acta Horticulturae* 715: 473–480.
- Szmagara, M. (2009): Biodiversity of Fungi Inhabiting the Highbush Blueberry Stems. *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus*, 8, 1: 37–50.

- White, T.J., T. Bruns, S. Lee, and J.W. Taylor. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Academic Press, Inc., New York, 315–322.
- Xu, C., Zhang, H., Zhou, Z., Hu, T., Wang, S., Wang, Y., Cao, K. (2015): Identification and distribution of *Botryosphaeriaceae* species associated with blueberry stem blight in China. European Journal of Plant Pathology, 143: 737–752.
- Zhao, Y. (2007): Berry Fruit: Value-Added Products for Health Promotion (1st ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Zhao, L., Wang, Y., He, W., Zhang, Y. (2019a): Stem Blight of Blueberry Caused by *Lasiodiplodia vaccinii* sp. nov. in China. Plant disease, 103, 8: 2041–2050.
- Zhao, L., Cai, J., He, W. (2019b): *Macrophomina vaccinii* sp. nov. Causing Blueberry Stem Blight in China. Mico Keys, 55: 1–14.