

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Aleksandra A. Žebeljan

**ETIOLOGIJA PLAVE TRULEŽI JABUČASTOG
VOĆA U SRBIJI I FIZIOLOŠKE PROMENE U
ZARAŽENIM PLODOVIMA JABUKE**

Doktorska disertacija

Beograd, 2023

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE

Aleksandra A. Žebeljan

**ETIOLOGY OF BLUE MOLD OF POME
FRUITS IN SERBIA AND PHYSIOLOGICAL
CHANGES IN INFECTED APPLE FRUIT**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023.

Komisija za ocenu i odbranu:

Mentor: Dr Ivana Vico, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Poljoprivredni fakultet
Uža naučna oblast Fitopatologija

Članovi komisije: Dr Nataša Duduk, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Poljoprivredni fakultet
Uža naučna oblast Fitopatologija

Dr Andreja Urbanek Krajnc, vanredni profesor
Univerzitet u Mariboru, Fakultet za poljoprivredne i biološke nauke,
Maribor, Slovenija
Uža naučna oblast Botanika

Dr Goran Aleksić, naučni savetnik,
Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu
Uža naučna disciplina Fitopatologija

Dr Dragan Radivojević, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Poljoprivredni fakultet
Uža naučna oblast Opšte voćarstvo

Datum odbrane:_____

ZAHVALNICA

Veliku zahvalnost dugujem svom mentoru dr Ivani Vico, redovnom profesoru, pre svega na razumevanju i velikom strpljenju, na svoj podršci, idejama, sugestijama, kao i na pruženom znanju tokom izrade doktorske disertacije.

Izuzetnu zahvalnost dugujem prof. Nataši Duduk, redovnom profesoru, na pomoći, pruženom znanju, na korisnim savetima i idejama, tokom svih faza izrade doktorske disertacije.

Takođe želim dodatno da se zahvalim obema profesorkama Ivani Vico, Nataši Duduk, kao i Nini Radulović na svim lepim uspomenama, druženju i smehu tokom boravka u laboratoriji 228.

Zahvaljujem se i dr Andreji Urbanek Krajnc vanrednom profesoru, na pruženom znanju i pomoći oko savlađivanja metoda u fiziologiji biljaka, kao i na korisnim savetima i pomoći oko izrade i pisanja doktorske disertacije. Takođe veliko hvala na ugodnom boravku u Sloveniji i lepim uspomenama.

Zahvaljujem se i dr Goranu Aleksiću, naučnom savetniku i dr Draganu Radivojeviću, redovnom profesoru, na pomoći i korisnim savetima koji su doprineli poboljšanju kvaliteta završne verzije teksta.

Zahvaljujem se i kolegama Miljanu Vasiću, Nini Radulović, Mateji Šelih, Poloni Božič i Stefanu Paviću na pomoći u laboratorijskom radu.

Zahvaljujem se i dr Borisu Obrovskom, naučnom saradniku, na pomoći oko statističke obrade podataka i njihovog tumačenja.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici i suprugu Peri, koji su bili moja najveća snaga, pomoć, podstrek i koji su verovali u mene za sve ovo vreme. Veliko hvala i prijateljima i saborcima doktorandima na brojnim razgovorima podrške, strpljenju i razumevanju.

Ovu disertaciju posvećujem svojim najmilijima, kao i svom deda Đuri, nekadašnjem doktoru nauka rudarstva, koji je bio moja inspiracija i vodilja.

ETIOLOGIJA PLAVE TRULEŽI JABUČASTOG VOĆA U SRBIJI I FIZIOLOŠKE PROMENE U ZARAŽENIM PLODOVIMA JABUKE

Sažetak

Plava trulež koju prouzrokuju vrste iz roda *Penicillium* jedna je od najznačajnijih bolesti jabučastog voća u toku čuvanja. Iz skladišta sa različitim uslovima čuvanja iz 20 lokaliteta u Srbiji tokom 2014. i 2015. godine, prikupljeni su plodovi jabuke, kruške, dunje i mušmule sa simptomima plave truleži. Simptomi su varirali od sitnih, svetlo smeđih, vodenastih pega do potpune truleži plodova. Na zaraženim plodovima su u većini slučajeva bile prisutne plavozelene spore. Iz prikupljenih plodova izolovane su gljive koje su po morfološkim karakteristikama odgovarale *Penicillium* spp. Patogenost izolata je proverena veštačkim inokulacijama plodova jabuke i voća iz kog su izolovane. Dobijeni izolati (ukupno 96) molekularno su identifikovani, a odabrani izolati (ukupno 26) su okarakterisani na osnovu ITS, *BenA*, *CaM* i *RPB2* regiona, kao i pojedinačnih i multilokus filogenetskih analiza. Izolati su makroskopski i mikroskopski morfološki okarakterisani na diferencijalnim podlogama MEA, CYA, YES i PDA i ispitana je njihova virulentnost na plodovima jabuka sorti Zlatni Delišeš, Crveni Delišeš i Greni Smit. U plodovima jabuke sorte Ajdared inokulisanim izolatima *P. expansum* i *P. crustosum* analizirane su fiziološke promene u primarnim metabolitima i antioksidantima, a njihova dinamika je praćena od momenta inokulacije do razvoja bolesti (11 dpi).

Kao prouzrokovaci plave truleži jabučastog voća u Srbiji identifikovane su tri vrste roda *Penicillium*: *P. expansum*, *P. crustosum* i *P. solitum*. Najčešće izolovana vrsta bila je *P. expansum* (91,67%), a zatim *P. crustosum* (7,29%) i *P. solitum* (1,04%). *P. expansum* je izolovan iz plodova jabuke, kruške i dunje, *P. crustosum* iz plodova jabuke, kruške, dunje i mušmule, a *P. solitum* iz ploda dunje. U okviru ovih istraživanja su kao prouzrokovaci plave truleži prvi put u svetu opisane *P. crustosum* i *P. solitum* na plodovima dunje i *P. crustosum* na plodovima mušmule, dok je u Srbiji prvi put opisana *P. expansum* na plodovima dunje.

Na osnovu molekularnih karakteristika i filogenetskih analiza jasno su se razdvojile vrste *P. expansum*, *P. crustosum* i *P. solitum*. U okviru vrsta *P. expansum* i *P. crustosum* uočena je genetička varijabilnost (u tri, odnosno dva lokusa) i opisani su haplotipovi. Izolati sve tri vrste formirali su: plavozelene kolonije sa ili bez eksudata, različitih boja naličja, *terverticillata*, ređe *biverticillata* konidiofore, cilindrične rame i metule, cilindrične do ampuliformne fialide i konidije glatkih zidova u nizu. Konidiofore *P. expansum* bile su glatkih zidova, *P. crustosum* nazubljenih, dok su konidiofore *P. solitum* bile glatke ili blago nazubljenih zidova. *P. solitum* je formirao najveće konidije.

Na inokulisanim plodovima različitih sorti jabuke, *P. expansum* je ispoljio veću virulentnost od *P. crustosum*, a *P. solitum* je ispoljio najslabiju virulentnost. *P. expansum* je bio najvirulentniji na plodovima sorte jabuke Crveni Delišeš, dok je *P. crustosum* bio podjednako virulentan na plodovima jabuka sorti Zlatni Delišeš i Crveni Delišeš. Obe vrste su najslabiju virulentnost ispoljile na plodovima jabuke sorte Greni Smit. Najveća razlika u virulentnosti između *P. expansum* i *P. crustosum* uočena je na plodovima jabuke sorte Crveni Delišeš. Na poprečnom preseku inokulisanih plodova jabuke *P. crustosum* je izazvao trulež tamnije boje i sporulacija je bila prisutna i u unutrašnjosti plodova, za razliku od *P. expansum* koji je prouzrokovao svetlo smeđu trulež, a sporulacija je bila prisutna samo oko mesta inokulacije.

PCA i klaster analize su na osnovu molekularnih odlika, morfoloških karakteristika i virulentnosti jasno razdvojile vrste i potvrdile njihovu identifikaciju. Takođe, u okviru *P. expansum* i *P. crustosum* potvrđena je intraspecijska varijabilnost. Izdvojile su se dve grupe u okviru *P. expansum* na osnovu brzine porasta kolonije, boje naličja kolonija na PDA i MEA (krem ili žuto naličje), razlike u obojenosti naličja na CYA (krem, žuto, krem roze do crveno naličje) i filogenije (*BenA*, *CaM*, *RPB2* i multilokus). U okviru *P. crustosum* izdvojile su se tri grupe na osnovu brzine porasta kolonija, filogenije (*RPB2* i multilokus) i virulentnosti.

U plodovima jabuke sorte Ajdared nakon inokulacije izolatima *P. expansum* i *P. crustosum* došlo je do aktiviranja odbrambenih mehanizama. U toku razvoja bolesti utvđene su promene u

koncentraciji primarnih metabolita (šećera - saharoze, glukoze i fruktoze; organskih kiselina - jabučne i šikiminske kiseline), kao i antioksidanata (glutaciona, askorbata i fenola). Ove promene su bile slične, ali je njihova dinamika zavisila od patogena koji prouzrokuje infekciju (*P. expansum* ili *P. crustosum*). Reakcija zaraženog ploda jabuke bila je intenzivnija i dinamičnija nakon inokulacije izolatom *P. expansum* koji je virulentniji. Utvrđeno je da su fruktoza, glukoza i jabučna kiselina, kao i askorbatno-glutationski ciklus važni i promenljivi markeri koji kroz balansirano unakrsno delovanje imaju kompleksnu ulogu u odbrani plodova jabuke od infekcije vrstama roda *Penicillium*. Takođe, pokazano je da promene askorbatno-glutationskog ciklusa pokreću i druge odbrambene mehanizame u plodu jabuke čiji nosioci su fenolna jedinjenja.

Ključne reči: *Penicillium expansum*, *P. crustosum*, *P. solitum*, plodovi jabuke, kruške, dunje i mušmule, filogenija, morfologija, virulentnost, intraspecijska varijabilnost, askorbatno-glutationski ciklus, fenoli, primarni metaboliti

Naučna oblast: Biotehničke nauke

Uža naučna oblast: Fitopatologija

UDK: 582.282.123.2:634.12(497.11)(043.3)

ETIOLOGY OF BLUE MOLD OF POME FRUITS IN SERBIA AND PHYSIOLOGICAL CHANGES IN INFECTED APPLE FRUIT

Abstract

Blue mold, caused by *Penicillium* species, is one of the most important postharvest diseases of pome fruit. During 2014 and 2015, from 20 storage facilities in Serbia, apple, pear, quince and medlar fruits with blue mold symptoms were collected. Symptoms ranged from small, light brown, soft, watery lesions to complete decay, and in most cases blue-green colored spores were present. Fungi with morphological characteristics of *Penicillium* spp. were isolated and their pathogenicity was tested. Obtained isolates (96 in total) were identified and selected isolates (26 in total) were characterized based on single and multilocus phylogenetic analysis of ITS, *BenA*, *CaM* and *RPB2*. The isolates were morphologically characterized on differential media MEA, CYA, YES and PDA and their virulence was tested on apple fruit cvs. Golden Delicious, Red Delicious and Granny Smith. In apple fruit cv. Idared infected with *P. expansum* and *P. crustosum* physiological changes of primary metabolites and antioxidants were evaluated.

Three species of the genus *Penicillium* have been identified as the causal agents of blue mold of pome fruit in Serbia: *P. expansum*, *P. crustosum* and *P. solitum*. The most frequently isolated species was *P. expansum* (91.67%), followed by *P. crustosum* (7.29%), and *P. solitum* (1.04%). *P. expansum* was isolated from apple, pear and quince fruit, *P. crustosum* from apple, pear, quince and medlar fruit, and *P. solitum* from quince fruit. In this study, *P. crustosum* and *P. solitum* were described for the first time as causal agents of blue mold of quince fruit in the world while *P. crustosum* on medlar and *P. expansum* on quince fruit are novel findings in Serbia.

P. expansum, *P. crustosum* and *P. solitum* were clearly separated based on molecular characteristics and phylogeny. Within *P. expansum* and *P. crustosum* genetic variability was observed in three and two loci, respectively, indicating presence of different haplotypes. Morphologically, all isolates formed blue-green colonies with or without exudate and different reverse color. Conidiophores were *terverticillata*, occasionally *biverticillata*, rami and metulae were cylindrical, phialides were cylindrical to ampuliform, and conidia were smooth-walled and formed in chains. Conidiophores of *P. expansum* were smooth-walled, of *P. crustosum* with roughened walls, and of *P. solitum* with smooth or finely roughened walls. *P. solitum* had the largest conidia.

P. expansum was more virulent than *P. crustosum*, while *P. solitum* was the least virulent on inoculated apple fruit of all tested cultivars. *P. expansum* was the most virulent on cv. Red Delicious and produced larger lesions than on cv. Golden Delicious. *P. crustosum* was equally virulent on cvs. Red Delicious and Golden Delicious. Both species were the least virulent on cv. Granny Smith. The largest difference in virulence between *P. expansum* and *P. crustosum* was observed on cv. Red Delicious. On the cross section of inoculated apple fruit differences between the decay symptoms caused by *P. expansum* and *P. crustosum* were observed. *P. crustosum* isolates caused slightly darker color of the decayed tissue in all cultivars and sporulated both around the wound and in the apple flesh of cv. Red Delicious.

PCA and cluster analysis based on the molecular characteristics, morphological characteristics and virulence separated the species and confirmed the identification. Also, in *P. expansum* and *P. crustosum* intraspecific variability was proven. Two groups were separated in *P. expansum* which differed in colony growth, reverse color on PDA and MEA (cream or yellow reverse), CYA reverse (cream, yellow, salmon pink to red), and phylogeny (*BenA*, *CaM*, *RPB2* and multilocus). Within *P. crustosum* three groups were separated based on colony growth, phylogeny (*RPB2* and multilocus) and virulence.

Temporal changes in defense mechanisms of apple fruit cv. Idared were studied following inoculation with isolates of *P. expansum* and *P. crustosum* by analysing the concentrations of primary metabolites (sugars: sucrose, glucose and fructose and organic acids: malic and shikimic acids) and antioxidants (glutathione, ascorbate and phenol). These changes were similar for both pathogens during the development of the disease, but their dynamics depended on the pathogen causing the

infection. The alterations in certain metabolites were more pronounced when inoculated with the more virulent pathogen - *P. expansum*. We were able to define the fructose, glucose, malic acid and ascorbate-glutathione cycle as crucial temporary marker with balanced cross-induction playing a complex role in apple defense against *Penicillium* infection. Phenolics were viewed as a wheel of the apple fruit defense mechanism, driven by the ascorbate–glutathione system.

Key words: *Penicillium expansum*, *P. crustosum*, *P. solitum*, apple, pear, quince and medlar fruits, phylogeny, morphology, virulence, intraspecies variability, ascorbate-glutathione system, phenolics, primary metabolites

Scientific field: Biotechnology

Specific scientific field: Phytopathology

UDC: 582.282.123.2:634.12(497.11)(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE	2
2.1. Ekonomski značaj jabučastog voća.....	2
2.2. Dosadašnja proučavanja bolesti uskladištenih plodova jabučastog voća u svetu i Srbiji.....	3
2.2.1. Bolesti uskladištenih plodova jabuke.....	3
2.2.2. Bolesti uskladištenih plodova kruške.....	5
2.2.3. Bolesti uskladištenih plodova dunje i mušmule.....	6
2.3. Plava trulež jabučastog voća	6
2.3.1. Ekonomski značaj i simptomi plave truleži	6
2.3.2. Prouzrokovaci plave truleži jabučastog voća u svetu i Srbiji	7
2.4. Osnovne karakteristike <i>Penicillium</i> spp. prouzrokovaca plave truleži	9
2.5. Osnovne karakteristike <i>Penicillium expansum</i> , <i>P. crustosum</i> i <i>P. solitum</i>	11
2.5.1. Osnovne karakteristike <i>Penicillium expansum</i>	11
2.5.2. Osnovne karakteristike <i>Penicillium crustosum</i>	13
2.6. Identifikacija vrsta roda <i>Penicillium</i>	166
2.7. Fiziološke promene u zdravim i zaraženim plodovima jabuke tokom čuvanja	19
2.7.1. Fiziološke promene u plodovima jabuke zaraženim <i>Penicillium</i> spp	211
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	24
4. MATERIJAL I METODE RADA.....	25
4.1. Prikupljanje plodova jabučastog voća.....	25
4.2. Izolacija gljiva iz obolelih plodova i dobijanje čistih kultura	25
4.3. Provera patogenosti dobijenih izolata, reizolacija gljiva i dobijanje monosporijalnih izolata ...	25
4.4. Molekularna detekcija, identifikacija i karakterizacija	26
4.4.1. Ekstrakcija DNK	26
4.4.2. Lančana reakcija polimeraze.....	26
4.4.3. Vizuelizacija PCR produkata	27
4.4.4. Prečišćavanje PCR produkta	27
4.4.5. Sekvenciranje, analiza sekvenci i filogenetske analize.....	28
4.5. Morfološka karakterizacija izolata.....	28
4.5.1. Ispitivanje makroskopskih morfoloških odlika	28
4.5.2. Ispitivanje mikroskopskih morfoloških odlika	29
4.6. Ispitivanje biohemijskih osobina - Ehrlich-ov test	29
4.7. Ispitivanje virulentnosti dobijenih izolata.....	29
4.8. Ispitivanje fizioloških promena u plodovima jabuke inokulisanim <i>P. expansum</i> i <i>P. crustosum</i>	29
4.8.1. Priprema izolata <i>Penicillium</i> spp. i plodova jabuke, inokulacija i priprema uzoraka za analizu	30
4.8.2. Biohemijske analize	30
4.9. Statistička analiza podataka	32
5. REZULTATI	34
5.1. Plava trulež na prikupljenim plodovima jabučastog voća	34
5.2. Izolati <i>Penicillium</i> spp. iz zaraženih plodova jabučastog voća.....	35
5.3. Patogenost dobijenih izolata <i>Penicillium</i> spp.	37
5.4. Molekularna identifikacija i karakterizacija izolata <i>Penicillium</i> spp	38
5.4.1. Molekularna detekcija <i>Penicillium expansum</i>	38
5.4.2. Molekularna identifikacija i karakterizacija	39
5.4.3. Filogenetske analize	43
5.5. Morfološka karakterizacija izolata <i>Penicillium</i> spp.....	48

5.5.1. Makroskopske odlike <i>Penicillium</i> spp.	48
5.5.2. Mikroskopske odlike <i>Penicillium</i> spp.	54
5.6. Biohemijske karakteristike izolata <i>Penicillium</i> spp.	60
5.7. Virulentnost izolata <i>Penicillium</i> spp. na plodovima jabuka	62
5.8. Uporedna analiza izolata <i>Penicillium</i> spp.	66
5.9. Fiziološke promene u plodovima jabuke inokulisanim <i>Penicillium expansum</i> i <i>P. crustosum</i> ..	72
5.9.1. Razvoj simptoma na inokulisanim plodovima.....	72
5.9.2. Promene u sadržaju šećera (saharoza, glukoza i fruktoza)	74
5.9.3. Promene u sadržaju organskih kiselina	77
5.9.4. Promene u sadržaju antioksidanata	79
5.9.5. Korelacija između veličine pega i koncentracije ispitivanih šećera, organskih kiselina i antioksidanata u zaraženim plodovima jabuke	85
5.9.6. Poređenje promena metabolita u plodovima jabuke inokulisanim <i>P. expansum</i> i <i>P. crustosum</i>	87
6. DISKUSIJA	89
6.1. Plava trulež jabučastog voća i prouzrokovatori.....	89
6.2. Molekularne karakteristike <i>Penicillium</i> spp. iz jabučastog voća	90
6.3. Morfološke i biohemijske karakteristike <i>Penicillium</i> spp. iz jabučastog voća	91
6.4. Virulentnost <i>Penicillium</i> spp. iz jabučastog voća	93
6.5. Intraspecijska varijabilnost <i>Penicillium</i> spp. iz jabučastog voća	94
6.6. Fiziološke promene u plodovima jabuke zaraženim <i>P. expansum</i> i <i>P. crustosum</i>	95
7. ZAKLJUČAK.....	99
8. LITERATURA	101
BIOGRAFIJA.....	124
Izjava o autorstvu.....	125
Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada	126
Izjava o korišćenju	127

1. UVOD

U jabučaste voćne vrste se ubrajaju jabuka (*Malus x domestica* Borkh.), kruška (*Pyrus communis* L.), dunja (*Cydonia oblonga* Mill.), mušmula (*Mespilus germanica* L.), glog (*Crataegus* sp.) i oskoruša (*Sorbus domestica* L.). U Srbiji je ekonomski najznačajnija i najzastupljenija jabuka, koja se gaji na 27.034 ha sa ukupnom proizvodnjom od 513.000 t. Kruška se gaji na 5074 ha sa godišnjom proizvodnjom od 56.000 t, a dunja na 2009 ha sa godišnjom proizvodnjom od 10.428 t. Iako su površine pod zasadima dunje male, Srbija je jedan od vodećih proizvođača u Evropi (FAOstat, 2022).

Nakon berbe, jabučasto voće se može čuvati različito vreme, u zavisnosti od vrste. Jabuka se najduže može čuvati, do 12 meseci, kruška i dunja do šest meseci, a mušmula oko dva do tri meseca. Odgovarajuće čuvanje ima za cilj da očuva kvalitet plodova međutim, i u tom periodu plodovi su podložni bolestima i fitopatogeni mikroorganizmi imaju mogućnost da prouzrokuju ekonomski značajne bolesti i propadanje (Rosenberger, 2014; Jurick and Cox, 2016). Jedna od najznačajnijih postžetvenih bolesti jabučastog voća je plava trulež (*blue mold*). Ova bolest se ispoljava pojavom svetlosmeđih, vodenastih pega u okviru kojih patogen obilno sporuliše formirajući karakteristične plavozelene konidije. Osim izražene destrukcije plodova, gubici koji su posledica plave truleži ogledaju se i u kontaminaciji plodova mikotoksinima (Barkai-Golan, 2008).

Prouzrokovaci plave truleži su vrste iz roda *Penicillium* (Amiri and Bompeix, 2005; Louw and Korsten, 2014; van der Walt et al., 2010). To su tipični postžetveni patogeni, odlično prilagođeni za ostvarivanje infekcije plodova u toku i posle berbe. Ove vrste su nekrotrofne, oportunistički su patogeni i spadaju u grupu gljiva koje mogu da rastu na niskim temperaturama (Barkai-Golan, 2001). Glavni izvor inokuluma su konidije na zaraženim plodovima, gajbicama, u vodi i skladišnom prostoru. Osnovni način prodiranja je kroz povrede, ali konidije mogu prodirati i kroz prirodne otvore. Patogen pektolitičkim enzimima razlaže ćelijske zidove i razmekšava tkivo domaćina i na taj način prouzrokuje trulež (Amiri and Bompeix, 2005; Rosenberger, 2014). Najčešći i ekonomski najznačajniji prouzrokovac plave truleži uskladištenih plodova jabuke i kruške je *P. expansum* (Louw and Korsten, 2014; Rosenberger, 2014; Jurick and Cox, 2016), a osim jabuke i kruške *P. expansum* izaziva i plavu trulež plodova dunje (Sharma and Sumbali, 1997). Osim *P. expansum*, plavu trulež plodova mogu izazvati i druge vrste roda *Penicillium*, kao što su *P. aurantiogriseum*, *P. brevicompactum*, *P. carneum*, *P. chrisogenum*, *P. commune*, *P. crustosum*, *P. dendriticum*, *P. digitatum*, *P. glabrum*, *P. griseofulvum*, *P. ramulosum*, *P. rugulosum*, *P. solitum* i *P. verrucosum* (Sanderson and Spotts, 1995; Amiri and Bompeix, 2005; van der Walt et al., 2010; Louw and Korsten, 2014).

Posle berbe, u toku dozrevanja i starenja, fiziološki procesi u ubranim plodovima se menjaju i dolazi do serije nepovratnih procesa koje vode razgradnji i uginuću ćelija. Kao posledica tih promena, osetljivost prema postžetvenim patogenima raste. Nakon prodiranja patogena, tokom ostvarivanja infekcije i kolonizacije tkiva, ubrani plodovi reaguju tako što uključuju mehanizme odbrane koji podrazumevaju i promene u koncentraciji primarnih i sekundarnih metabolita i antioksidanata. Dinamika i kvalitet ovih promena zavise od odnosa biljka-patogen (Buron-Moles et al., 2015; Schovankova and Opatova, 2011).

Zbog velikog ekonomskog značaja i zastupljenosti plave truleži plodova uskladištenog jabučastog voća u okviru istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji utvrđena je etiologija ovog oboljenja u našoj zemlji. Kao prouzrokovaci su identifikovane i okarakterisane vrste roda *Penicillium*, na osnovu morfoloških i molekularnih karakteristika i virulentnosti. Takođe, su ispitane fiziološke promene u plodovima jabuke koje su posledica infekcije odabranim izolatima *Penicillium* vrsta. Kroz poznavanje dinamike promena primarnih metabolita i antioksidanata proučene su odbrambene reakcije ploda jabuke u toku interakcije sa patogenom, odnosno od trenutka prodiranja i ostvarivanja infekcije do kolonizacije, sloma otpornosti ploda i razvoja truleži. Razumevanje procesa infekcije nekrotrofnom gljivom i odbrambenih reakcija plodova jabuke u toku čuvanja može poslužiti kao osnov u razvoju specifičnih strategija zaštite.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Ekonomski značaj jabučastog voća

Jabučasto voće obuhvata plodove voćaka iz podfamilije Maloideae, familija Rosaceae. Plod pripada botaničkom tipu sinkarpna koštunica, koji je zajednički za voćne vrste iz rodova *Malus* (jabuka), *Pyrus* (kruška) i *Cydonia* (dunja), koji se planski uzgajaju, kao i vrste rodova *Mespilus* (mušmula), *Sorbus* (oskoruša), *Crataegus* (glog) i druge, koje su najčešće samonikle (**Đurović, 2021**). Plod jabučastih voćki spada u grupu lažnih plodova, jer u njegovom nastanku učestvuju osim plodnika, cvetna loža i čašični listići (**Keserović i sar. 2013**). Jabučaste voćke se najviše gaje u umerenom podneblju severne Zemljine polulopte, ali se uspešno mogu gajiti na svim kontinentima. Jabuka i kruška važe za najznačajnije kontinentalne vrste jabučastih voćaka, a njihovi plodovi se mogu dugi vremenski period skladištiti, što omogućava konzumaciju u svežem stanju gotovo čitave godine. Od svih voćnih vrsta koje se uzgajaju u Srbiji, jabuka zauzima prvo mesto, dok se kruška nalazi na šestom mestu, posle šljive, višnje, maline i breskve. Dunja se gaji na manjim površinama i zaostaje za proizvodnjom drugih značajnih voćaka (**Radivojević i Marković, 2015; Mratinić i Đurović, 2015; Đurović, 2021**).

Jabuka (*Malus domestica* Borkh.) je zbog visokog kvaliteta plodova jedna od najviše gajenih i najrasprostranjenijih voćnih vrsta u svetu (**Mišić, 2004**). Vodi poreklo iz Azije, područja Kine i Himalaja, gde je zastupljeno najveće bogatstvo formi. Odatle je jabuka postepeno prodirala u Iran, južna pograda Kavkaza (današnja Armenija, Gruzija i Azerbejdžan), pa potom na zapad, u malu Aziju i Grčku (**Šoškić, 2011**). Plodovi jabuke koriste se kao stono voće i kao sirovina za industrijsku preradu. Najpovoljniji uslovi za njeno gajenje su u Evropi, zatim u Aziji i Severnoj Americi, a manje povoljni su na južnoj polulopti (**Mišić, 2004**).

Po proizvodnji, prometu i potrošnji voća, jabuka se nalazi na trećem mestu, odmah posle citrusa i banana (**Mišić, 2004**). Po podacima iz 2021. godine najveći proizvođač jabuke u svetu je Kina, čija proizvodnja prelazi 45 miliona tona jabuke godišnje (49,4% od ukupne svetske proizvodnje). U Evropi se proizvodi 19,7% od ukupne svetske proizvodnje, a najveći proizvođač je Turska sa ukupnom proizvodnjom od oko 4,5 miliona t, potom Poljska od oko 4 miliona t, a na trećem mestu Italija sa 2,2 miliona t (**FAO stat, 2023**). Veoma povoljni klimatsko-edafski uslovi u Srbiji omogućavaju uspešnu proizvodnju kvalitetnih sorti jabuke (**Mišić, 2004**). Prema podacima iz 2021. godine u Republici Srbiji se pod višegodišnjim zasadima jabuke nalazi 27.034 ha sa ukupnom proizvodnjom oko 513.000 tona i prosečnim prinosom 19 t/ha (**FAO stat, 2023**). Kada posmatramo tendenciju gajenja jabuke u Srbiji uočava se da je od 2014. do 2021. godine došlo do povećanja površina pod jabukom za oko 3300 ha, dok se prosečan prinos povećao sa 15,6 t/ha 2014. godine na 19 t/ha 2021. godine.

Plodovi jabuke nakon berbe mogu se čuvati do šest meseci u hladnjačama sa normalnom atmosferom (NA), do osam meseci u hladnjačama sa kontrolisanom atmosferom (CA) i do 10 meseci u hladnjačama sa ultraniskim sadržajem kiseonika (ULO) (sadržaj kiseonika najviše 2%) (**Pašalić, 2009**). Optimalni uslovi čuvanja plodova jabuke zavise od sortnih osobina, a većina sorti jabuke se čuva pri temperaturi između 0-3°C i relativnoj vlažnosti 90-92% (**Keserović i sar., 2013**).

Kruška (*Pyrus communis* L.) među voćnim vrstama zauzima šesto mesto po proizvodnji u svetu. Spada u voćke severne hemisfere. Smatra se da je njena domovina Azija i da se još u doba neolita zajedno sa jabukom gajila na prostorima Himalaja. Kasnije se proširila u pojedine oblasti Irana, Kavkaza, gornjeg toka Tigra i Eufrata, a preko Male Azije i Grčke je preneti u Evropu, potom i na ostale kontinente. Prvi pisani podaci o gajenju kruške potiču iz doba antičkih pisaca Homera, Plutarha, Teofrasta i drugih, dok se na prostorima Srbije gajila još pre dolaska Slovena. Kruška ima značajno mesto u ukupnoj strukturi voćarske proizvodnje zahvaljujući svojim kvalitetnim plodovima, koji imaju višestruku upotrebljivu vrednost, kao i mogućnosti skladištenja, što produžava njenu upotrebnost u svežem stanju. Od plodova kruške prave se vrlo kvalitetni proizvodi: sokovi,

bebi kaše, kompoti, marmalade, džemovi, rakija i drugo, te je ona značajna sirovina u industriji prerade (**Mratinić, 2016a; Đurović, 2021**).

Najveći proizvođač krušaka u svetu je Kina sa ukupnom proizvodnjom od 18,9 miliona tona u 2021. godini (73,6% od ukupne svetske proizvodnje). U Evropi se proizvodi 9,1% od ukupne svetske proizvodnje, a najveći proizvođač je Turska sa oko 530.000 t, potom Belgija sa 355.000 t i Španija sa oko 316.000 t. U Srbiji je 2021. godine proizvedeno 56.000 tona. Ukupne površine pod kruškom u Srbiji iznose 5074 ha, sa prosečnim prinosom od 11 t/ha. Posmatrajući tendenciju gajenja kruške u Srbiji unazad nekoliko godina, od 2014. do 2021. godine zabeleženo je smanjenje ukupne proizvodnje za oko 7800 t i površina za skoro 2300 ha. Prosečan prinos se povećao, sa prosečnih 9,6 t/ha 2014. godine na 11 t/ha 2021.godine (**FAOstat, 2022**). Način čuvanja plodova kruške takođe zavise od sortnih osobina, a u hladnjačama sa kontrolisanom atmosferom se mogu čuvati od tri pa do maksimalno šest meseci, pri temperaturi između -1 i 4°C i relativnoj vlažnosti 90-95% (**Mratinić i Đurović, 2015**).

Dunja (*Cydonia oblonga* Mill.) je veoma stara voćna vrsta, koja se gaji preko 4000 godina. Pretpostavlja se da je poreklom sa Kavkaza, odakle se širila na istok i jug (u malu Aziju), a odatle u staru Grčku. Iz Grčke je prenet u Rim (p.n.e.), a zatim se raširila i u ostale delove Evrope. Plodovi dunje su trpkog kiselkastog ukusa (zbog većeg sadržaja tanina) i veće čvrstoće zbog prisustva velikog broja kamenih ćelija (veći sadržaj celuloze i pektina). Zbog takvih karakteristika malo se koriste u svežem stanju, najčešće se prerađuju u slatka, žele, kompote, džemove i sokove (**Mratinić, 2016b**). U zavisnosti od sorte, plodovi se skladište na 0–2°C u trajanju od 3 do 6 meseci, čak i duže ukoliko se skladište u CA hladnjačama (**Majeed et al., 2018**).

Prema podacima iz 2021. godine, najveći proizvođač dunja u svetu je Turska sa ukupnom proizvodnjom od oko 192.000 t (27,5% ukupne svetske proizvodnje), potom sledi Kina i Uzbekistan. Srbija je sa ukupnom proizvodnjom od 10.428 t zauzima osmo mesto u svetu, a drugo u Evropi odmah posle Turske, što predstavlja 28,8% od ukupne proizvodnje u Evropi. Površine pod dunjom u Srbiji prostiru se na 2009 ha u 2021. godini, dok je zabeležen prosečan prinos od 5,2 t/ha. Posmatrajući tendenciju gajenja dunja u Srbiji, od 2014. do 2021. godine beleži se konstantno povećanje zasada pod dunjom, što iznosi 350 ha. Međutim, ukupna proizvodnja beleži pad, od 2014. god se smanjila za 3100 t, kao i prosečan prinos sa 9 t/ha (2014. god.) je opao na 5,2 t/ha 2021 (**FAOstat, 2022**). Plodovi dunje se manje koriste u svežem stanju i najčešće se prerađuju u slatko, džem, žele, sok ili rakiju (**Mratinić i Đurović, 2015**). Pošto se berba dunje odvija kasno, tokom oktobra meseca, kada su temperature znatno niže, plodovi se mogu uspešno čuvati u provetrenim podrumima do početka januara, najkasnije marta meseca.

Mušmula (*Mespilus germanica* L.) je jabučasta voćna vrsta čije je prirodno stanište jugoistočna Evropa, Anadolija, Krim, Kavkaz, kao i severni delovi Irana i Iraka (**Browicz, 1972**). U mnogim zemljama mušmula se gaji od davnina, a pisani dokazi ukazuju da je gajena još pre 2000 godina u Grčkoj i rimskim zemljama. Plod u svežem stanju u vreme berbe ima trpak i kiseo ukus, pa se za upotrebu koristi kada se ugnjili. Plod je pogodan za jelo od druge polovine oktobra do kraja decembra, u zavisnosti od sorte, vremena berbe i načina čuvanja. Koristi se i za industrijsku preradu, za pravljenje marmelada, džemova, želea, likera, rakija, a u pojedinim delovima Srbije, u Bugarskoj i Jermeniji se koristi i za pripremu osvežavajućeg pića - vodnjike. Kao i dunja, dodaje se jabukovači radi boljeg bistrenja, jer sadrži dosta taninskih materija (**Stančević, 1986**).

2.2. Dosadašnja proučavanja bolesti uskladištenih plodova jabučastog voća u svetu i Srbiji

2.2.1. Bolesti uskladištenih plodova jabuke

Nakon berbe, plodovi jabuke se dugo čuvaju u skladištu gde su podložni propadanju. Bolest koja se u skladištu razvija može biti posledica latentne infekcije ostvarene pre berbe, kakav je slučaj sa antraknozom, smeđom ili sivom truleži, čiji su prouzrokovatori vrste iz rodova *Colletotrichum*, *Monilinia*, odnosno *Botrytis*, ili infekcije ostvarene za vreme ili posle berbe što je karakteristika plave

truleži (prouzrokovaci su *Penicillium* spp.) ili vlažne truleži (prouzrokovac je *Rhizopus stolonifer*) (Coates and Johnson, 1997; Vico i Duduk, 2020). Savremeni načini skladištenja plodova uticali su na smanjenje šteta koje su posledica ovih infekcija, ali je su pogledu zastupljenosti prouzrokovaca bolesti, i dalje dominantne vrste roda *Penicillium* (sa udelom od 90%), a zatim i vrste rodova: *Botrytis*, *Monilinia*, *Nectria*, *Neofabraea* i *Alternaria* (Rosenberger, 2014).

U novijim istraživanjima u Libanu uočeno je da su plodovi jabuke sorti Crveni Delišeš i Zlatni Delišeš sa različitih lokaliteta u najvećoj meri ispoljavale simptome plave truleži. Tačnije u proseku 76,5%, odnosno 80,6% plodova je bilo zaraženo prouzrokovacima iz roda *Penicillium*, potom u 32,7 i 31,3% slučajeva su bile zaražene *Botrytis* sp., dok su u znatno manjoj meri plodovi ispoljavali simptome crne truleži (4,9 i 2,1% plodova jabuke je bilo zaraženo *Alternaria* sp., ili 4,3 i 3,5% *Stemphylium* sp.) i vlažne truleži (3,7 i 1,4% je bilo zaraženo sa *Rhizopus* sp.) (Habib et al., 2021). U Belgiji su plodovi jabuke sorte 'Nocoter' u najvećoj meri (32,5%) bili zaraženi gljivama iz roda *Penicillium*, dok je 11,7% bilo zaraženo *Fusarium* sp., po 10,8% *Botrytis* sp., *Monilia* sp. i *Neonectria* sp., po 7,5% *Alternaria* sp. i *Trichoderma* sp., dok je znatno manji broj bio zaražen *Stemphylium* sp. (Naets et al., 2020).

U svetu je među prouzrokovacima plave truleži opisan veliki broj vrsta roda *Penicillium* među kojima su najznačajniji *P. expansum*, *P. crustosum* i *P. solitum* (Barkai-Golan, 2008). Kao prouzrokovac sive truleži plodova jabuke navodi se *Botrytis cinerea* (Xiao, 2014). Smeđu trulež plodova izazivaju gljive iz roda *Monilinia*, koje prouzrokuju propadanje plodova i tokom vegetacije i kasnije tokom čuvanja. Najznačajnije su: *M. fructigena*, *M. laxa*, *M. fructicola* i *M. polystroma* (Wormald, 1954; Byrde and Willetts, 1977; Batra, 1991; van Leeuwen et al., 2000; Xu et al., 2001; van Leeuwen et al., 2002; Holb, 2004; Petroczy and Palkovics, 2009; Berrie and Holb, 2014), a u Kini se javlja i *M. yunnanensis* (Zhu et al., 2016). *Neonectria ditissima* (syn. *Nectria galligena*) prouzrokuje tzv. nektrijsku trulež (Weber, 2014). U severnoj Evropi, zbog uticaja vlažne i hladne klime, najznačajniji patogeni u skladištu (30-64% zaraženih jabuka) su *Colletotrichum acutatum*, koji izaziva gorku trulež i pripadnici roda *Neofabraea* koji izazivaju trulež tipa volovsko oko (Borve et al. 2013). U okviru roda *Colletotrichum*, prouzrokovaci gorke truleži mogu biti i *C. acutatum*, *C. gloeosporioides*, *C. fioriniae*, *C. clavatum*, *C. fructicola*, *C. siamense* i *C. godetiae* (Ivić et al., 2013; Onofre and Antoniazzi, 2014; Wenneker et al., 2015; Park et al., 2018), dok se među prouzrokovacima truleži tipa volovsko oko navode *Neofabraea alba*, *N. malicorticis*, *N. perennans* i *Neofabraea kienholzii* (Spotts et al, 2009; Kingsnorth et al., 2017). Alternarijsku trulež izazivaju: *Alternaria alternata*, *A. arborescens*, *A. infectoria*, *A. mali* i *A. pomicola* (Vinas et al., 1992; Serdani et al., 2002; Pitt and Hocking, 2009). Fuzarijsku trulež u najvećoj meri izaziva *Fusarium avenaceum*, potom vrste *F. solani*, *F. equiseti*, *F. proliferatum*, *F. trincictum* i *F. decemcellulare* (Pitt and Hocking, 2009; Konstantinou et al., 2011; Gao et al., 2013; Wenneker et al., 2016a; Seung-Yeol et al., 2017). Poslednjih godina došlo je do učestale pojave patogena iz familije Bothryosphaeriaceae i roda *Diaporthe* kao patogena plodova jabuke, među kojima su značajni *Bothryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata*, *Neofusicoccum parvum*, *Neofusicoccum ribis* i *Diaporthe eres* (Jurick et al., 2013a; Jurick et al., 2013b; Rosenberger, 2014; Glos et al., 2021). Kao patogene jabuke iz familije Bothryosphaeriaceae navode se i: *Bothryosphaeria rosaceae*, *Diplodia bulgarica*, *D. intermedia*, *D. malorum*, *D. mutila*, *D. pseudoseriata*, *D. sapinea*, *Dothiorella iberica*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Neofusicoccum algeriense*, *N. australe*, *N. italicum*, *N. luteum*, *N. nonquasitum* (Laundon, 1973; Brown and Britton, 1986; Brown-Rytlewski and McManus, 2000; Slippers et al., 2004, 2007; Phillips et al., 2005, 2012; Delgado-Cerrone et al., 2016; Rooney-Latham and Soriano, 2016; Marin-Felix et al., 2017; Zhou et al., 2017; Zhang et al., 2021; Vučković et al., 2022), a iz roda *Diaporthe*: *D. actinidiae*, *D. ambigua*, *D. amygdali*, *D. cynaroidis*, *D. eres*, *D. foeniculina*, *D. mali*, *D. malorum*, *D. nobilis*, *D. padi*, *D. pernicioza*, *D. pomigena*, *D. rudis*, *D. serafiniae*, *D. tanakae*, *D. virgiliae*, *Phomopsis pernicioza* i *P. truncicola* (Gomes et al., 2013; Udayanga et al., 2014a, 2014b; Santos et al., 2017; Vučković et al., 2022; Farr and Rossman, 2022). Prouzrokovaci propadanja plodova jabuke mogu biti i *Mucor piriformis*, *M. mucedo*, *M. racemosus*, *M. strictus* (Spotts, 2014a) i *Rhizopus oryzae* (Jin-Hyeuk et al., 2011).

koji prouzrokuju vlažnu trulež, kao i toksigene vrste *Aspergillus niger* i *Aspergillus flavus* (Hasan, 2000; Farr and Rosseman, 2022).

Ružičastu trulež izaziva *Trichothecium roseum* (Snowdon, 1990; Rosenberger and Xiao, 2014). Ređe se, kao prouzrokovatelji bolesti plodova jabuke u toku čuvanja mogu detektovati *Cladosporium herbarum* (Sugar, 2014), *Coprinus psychromorbidus* (Spotts, 2014b), *Butlerella eustacei*, *Stemphylium herbarum* (Rosenberger and Xiao, 2014), *Phytophthora syringae* (Lolas et al., 2016), *P. cactorum* (Liu et al., 2018), *Sphaeropsis pyriputrescens* (Xiao et al., 2004), *Phacidiopycnis washingtonensis* (Xiao et al., 2005; Weber, 2011), *Lambertella corni-marisi* (Wiseman et al., 2015), *Truncatella angustata* (Wenneker et al., 2016b), *Phacidium lacerum* (Wiseman et al., 2016), *Paecilomyces niveus* (Biango-Daniels and Hodge, 2018), *Cylindrosporium pomi*, *Phoma pomi* (Xu et al., 2000), *Acremonium mali*, *Sarocladium liquanensis*, *Sarocladium mali* i *Sarocladium terricola* (Hou et al., 2019). U Holandiji je otkriveno da vrsta *Fibulorhizoctonia psychrophila* prouzrokuje simptom lenticelnih pega (Wenneker et al., 2017). Nekoliko godina unazad *Tilletiopsis pallescens* je prouzrokovao značajne štete na uskladištenim plodovima jabuke, zbog formiranja beličaste navlake na površini plodova (Prencipe et al., 2016).

U Srbiji je na uskladištenim plodovima jabuke utvrđeno prisustvo plave truleži koju prouzrokuju *Penicillium expansum*, *P. crustosum* (Perišić, 1972; Babović i sar., 1979; Vico et al., 2014a, 2014b) i *P. solitum* (Žebeljan et al., 2021). Utvrđeno je da smeđu trulež plodova prouzrokuju *Monilinia fructigena* (Babović i sar., 1979; Tošić i sar., 1994; Vučković i Babović, 1997; Vasić et al., 2018), *M. fructicola*, *M. polystroma* i *M. laxa* (Vasić et al., 2012; Vasić et al., 2013a; Vasić et al., 2018). Među prouzrokovateljima truleži i propadanja plodova jabuke opisane su i *Neofabraea alba* (Vico et al., 2015), *Diplodia seriata* (syn. *Botryosphaeria obtusa*) (Stojanović i sar., 1996; Vučković et al., 2022), *Botryosphaeria dothidea* (Vasić et al., 2013b; Vučković et al., 2022), *Diplodia bulgarica*, *Diplodia sapinea*, *Neofusicoccum parvum*/N. *yunnanense*, *Diaporthe eres*, *Diaporthe rudis* (Vučković et al., 2022), *Botrytis cinerea* (Babović i sar., 1997), *Colletotrichum acutatum*, *C. gloeosporioides* (Trkulja, 2003; Grahovac, 2014), *Fusarium lateritium* (Stojanović, 1968), *F. lactis* (Babović i sar., 1979), *F. avenaceum* (Babović i sar., 1994), *Stemphylium botryosum*, *Leptothyrium pomi*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium fulvum*, *Alternaria tenuissima* (Babović i sar., 1979), *Pestalotiopsis* sp. (Arsenijević i Jasnić, 1988), i *Phomopsis perniciosa* (Arsenijević i Gavrilović, 2005).

2.2.2. Bolesti uskladištenih plodova kruške

Najučestalije i najštetnije bolesti koje se na plodovima kruške javljaju u toku čuvanja su plava trulež prouzrokovana gljivom *Penicillium expansum*, siva trulež prouzrokovana *Botrytis cinerea* i vlažna ili tranzitna trulež koju izaziva *Mucor piriformis*. Međutim, bolesti a time i značajne štete mogu prouzrokovati i druge vrste gljiva među kojima: *Phialophora malorum*, *Alternaria* spp., *Cladosporium herbarum*, *Neofabraea* spp. i *Colletotrichum* spp. (Sutton et al., 2014; Fu et al., 2019). Kao prouzrokovatelji plave truleži na plodovima kruške, pored *P. expansum*, u svetu su opisane i *P. crustosum*, *P. digitatum*, *P. solitum* i *P. brevicompactum* (Louw and Korsten, 2014). Značajnu bolest plodova kruške, sivu trulež izaziva *Botrytis cinerea*, dok *B. prunorum* izaziva trulež ploda oko cvetne lože (Xiao, 2006; Ferrada et al., 2020). Vlažnu trulež kruške, osim najznačajnijeg prouzrokovatelja vrste *Mucor piriformis* (Farr and Rosseman, 2022) može izazvati i srodna vrsta *Rhizopus oryzae* (Khokhar et al., 2019). Osim ovih bolesti, značajna je trulež tipa volovsko oko koju na plodovima kruške, kao i kod jabuke, izazivaju četiri vrste roda *Neofabraea*: *N. alba*, *N. malicorticis*, *N. perennans* i *N. kienholzii* (Garipey et al., 2005), kao i smeđa trulež prouzrokovana vrstama *Monilinia fructigena*, *M. laxa*, *M. polystroma*, *M. fructicola* i *M. yunnanensis* (Cote et al., 2004; Martini et al., 2015; Zhu et al., 2016). Kao prouzrokovatelji gorke truleži plodova kruške opisane su *Colletotrichum acutatum*, *C. aenigma*, *C. citricola*, *C. conoides*, *C. fioriniae*, *C. fructicola*, *C. gloeosporioides*, *C. karstii*, *C. plurivorum*, *C. siamense*, *C. wuxiense*, *C. jinshuiense* i *C. pyrifoliae* (Guerber et al., 2003; Fu et al., 2019). Vrste iz roda *Diaporthe* se sve češće opisuju kao prouzrokovatelji propadanja plodova kruške u toku čuvanja, a detektovane su vrste *Diaporthe ambigua*,

D. rudis i *D. eres* (Smit et al., 1996; Bertetti et al., 2018; KC and Rasmussen, 2019). Za *Phacidium lacerum* i *Rosellinia quercina* se navodi da izazivaju svetlo smeđu trulež (Wiseman et al., 2016; Wenneker et al., 2019), dok se delovanje *Neonectria candida* opisuje kao prekrivanje ploda kruške žućkasto beličastom micelijom (Wenneker et al., 2016c). Navodi iz literature upućuju na to da trulež (side rot) uskladištenih plodova kruške izaziva vrsta *Cadophora luteo-olivacea* (Wenneker et al., 2016d), lenticelne pege izaziva vrsta *Fibulorhizoctonia psychrophila* (Wenneker et al., 2017), dok se kao prouzrokovaci bolesti plodova kruške u skladištu navode i *Stemphylium vesicarium* (Köhl et al., 2009), *Sphaeropsis pyriputrescens* (Xiao, 2006), *Phomopsis velata* (Grantina-Ievina, 2015), *Potrebniomyces pyri* (Xiao, 2006), *Aurebasidium pullulans* (Dobra et al., 2015), *Athelia bombacina* (Jia et al., 2018), *Talaromyces diversus* (Borecka et al., 1977) i *Trichothecium roseum* (Farr and Rosseman, 2022).

U Srbiji su na plodovima kruške u toku čuvanja proučavane antraknoza prouzrokovana gljivama iz roda *Colletotrichum* (Živković i sar., 2012), kao i plava trulež prouzrokovana vrstama *Penicillium expansum*, *P. crustosum*, *P. italicum*, *Talaromyces minioluteus* i *T. rugulosus* (Stošić et al., 2021; Žebeljan et al., 2021).

2.2.3. Bolesti uskladištenih plodova dunje i mušmule

U svetu se kao uzrok propadanja plodova dunje u toku čuvanja navodi trulež. Najzastupljeniji prouzrokovaci različitih vrsta truleži su gljive: *Penicillium expansum*, *Lasiodiplodia theobromae* (syn. *Botryodiplodia theobromae*), *Corynascus sepedonium*, *Lichtheimia corymbifera* (syn. *Absidia corymbifera*), *Syncephalastrum racemosum*, *Clonostachys rosea* (syn. *Gliocladium roseum*), *Fusarium solani*, *Aspergillus niger*, *A. flavus* (Sharma and Sumbali, 1997), *Botrytis cinerea* (Sharma and Sumbali, 1997; Mirzaei, 2007), *Alternaria alternata* (Sharma and Sumbali, 1997; Lahuf et al., 2020), *Colletotrichum acutatum* (Guerber et al., 2003), *Diplodia seriata* (Moral et al., 2007), *Botryosphaeria dothidea* (Marinelli et al., 2012), *Monilinia fructigena*, *M. fructicola*, *M. polystroma*, *Diplodia seriata*, *Neofabraea alba*, *N. malicortis*, *N. perennans*, *Rhizopus stolonifer* i *Trichothecium roseum* (Farr and Rosseman, 2022).

U Srbiji se na plodovima dunje u toku čuvanja, takođe javljaju različite vrste truleži čiji su prouzrokovaci *Monilia fructigena*, prouzrokovac smeđe truleži (Hrustić et al., 2012), *Colletotrichum calvatum*, prouzrokovac antraknoze (Živković et al., 2014), *Diaporthe eres* (Ristić et al., 2016), *Diplodia seriata* (Vico et al., 2017), *Diplodia sapinea* (Vučković et al., 2022) i *Botryosphaeria dothidea* (Vučković et al., 2023) prouzrokovaci smeđe do mrke truleži plodova, kao i *Talaromyces minioluteus* (Stošić et al., 2020), *Penicillium expansum*, *P. crustosum* i *P. solitum* (Žebeljan et al., 2021) prouzrokovaci plave truleži.

Mušmula je ekonomski manje značajna voćna vrsta, pa su samim tim i bolesti plodova ove vrste manje proučavane. U svetu, značajnu trulež i propadanje plodova mušmule u toku čuvanja prouzrokuju vrste *Botrytis cinerea* i *Trichothecium roseum* (Farr and Rosseman, 2022), dok su u Srbiji opisane vrste *Diplodia sapinea* (Vučković et al., 2022) prouzrokovac smeđe do mrke truleži i *Penicillium crustosum* (Žebeljan et al., 2021) prouzrokovac plave truleži.

2.3. Plava trulež jabučastog voća

2.3.1. Ekonomski značaj i simptomi plave truleži

Plava trulež ili plesnivost (*blue mold*) je jedna od ekonomski najznačajnijih postžetvenih bolesti plodova jabučastog voća (Rosenberger, 2014). Gubici koji su posledica pojave ove bolesti su kvantitativni zbog izražene destrukcije i propadanja plodova, ali i kvalitativni, jer zaraženi plodovi mogu biti kontaminirani mikotoksinima i kao takvi predstavljati opasnost za ishranu ljudi i životinja (Barkai-Golan, 2008). Ovo oboljenje je posebno izraženo kod biljnih vrsta čiji se plodovi ili drugi biljni delovi dugo čuvaju, kao što su jabuka ili kruška. Pre uvođenja skladišta sa kontrolisanom

atmosferom, gubici koji su posledica plave truleži plodova su u proseku iznosili 30%, a nekim slučajevima dostizali i 90% (**Themen, 2014; FAO, 2018**). Moderanim načinima skladištenja plodova znatno su se smanjili gubici, koji su tokom 2013. godine u Evropi i Aziji iznosili oko 7% (**Themen, 2014**). Iako su gubici smanjeni, plava trulež je i dalje najzastupljenija bolest uskladištenih plodova jabučastog voća (**Rosenberger, 2014**). U SAD-u, državi Vašington, od ukupnog broja zaraženih plodova jabuka, plava trulež je bila najzastupljenija sa udelom od 32% (**Kim and Xiao, 2008**).

Plava trulež je dobila ime po razmekšavanju tkiva, truleži, koje je praćeno obilnom sporulacijom patogena plavozelene boje. Početni simptomi bolesti se javljaju u vidu vlažnih vodenastih pega, najčešće oko povrede koja je uobičajeno mesto prodora i ostvarivanja infekcije. Pega mogu biti različite veličine, svetlo smeđe do mrke boje, a tkivo u okviru pega je vodenasto i ima staklast izgled. U okviru pega, patogen obilno formira tipične znakove oboljenja: na početku se može uočiti beličasta micelija, a zatim se formiraju konidiofore i konidije plavozelene boje u grupama, koje često mogu biti u koncentričnim krugovima ili nepravilno raspoređene. Zaraženo tkivo je meko i vodenasto i lako se na pritisak odvajava od zdravog dela ploda formirajući udubljenje glatkih ivica koji ima izgled činije (**Turechek, 2004; Rosenberger, 2014; Vico i Duduk, 2020**). Pojava truleži i prisustvo glatkih ivica na prelazu između zaraženog i zdravog tkiva je posledica lučenja velikog broja pektolitičkih enzima koji imaju značajnu ulogu u patogenosti i virulentnosti prouzrokovaca plave truleži. Poznato je da jedan od najznačajnijih prouzrokovaca plave truleži, vrsta *P. expansum* stvara najmanje pet poligalakturonaza u kulturi (**Jurick et al., 2010**). Razvojem bolesti trulež se širi i izaziva propadanje celog ploda. Pokožica postaje smežurana, a prisutan je i karakterističan miris buđi (**Mattheis and Roberts, 1992; Rosenberger, 2014**).

2.3.2. Prouzrokovaci plave truleži jabučastog voća u svetu i Srbiji

Prouzrokovaci plave truleži su vrste iz roda *Penicillium* (**Amiri and Bompeix, 2005; Louw and Korsten, 2014; van der Walt et al., 2010**). To su tipični postžetveni patogeni koji su prilagođeni za ostvarivanje infekcije plodova u toku i posle berbe. Ove vrste su nekrotrofne, oportunistički su patogeni i spadaju u grupu gljiva koje mogu da rastu pri niskim temperaturama (**Barkai-Golan, 2001**).

Mnoge vrste roda *Penicillium*, tačnije 24 vrste, su do danas opisane kao prouzrokovaci propadanja plodova jabuke (Tabela 1). Među njima se izdvaja *P. expansum* Link kao ekonomski najznačajnija i najrasprostranjenija vrsta (**Rosenberger, 2014**), a zatim se kao veoma značajne vrste navode *P. crustosum* Thom i *P. solitum* Westling (**Louw and Korsten, 2014**). Davne 1931. godine **Heald and Ruehle (1931)** su pored vrste *P. expansum* identifikovali još tri vrste ovog roda kao prouzrokovace propadanja plodova jabuke: *P. aurantiogriseum* Dierckx (tadašnji naziv *P. martensii* Biourge), *P. verrucosum* Dierckx i *P. viridicatum* Westling. Sedamdesetih i osamdesetih godina prošlog veka opisano je više vrsta iz roda *Penicillium*, prouzrokovaca plave truleži plodova jabuke, među kojima i: *P. brevicompactum* Dierckx, *P. rugulosum* Thom, *P. diversum* Raper and Fennell, *P. spinulosum* Thom, *P. funiculosum* Thom i *P. puberulum* Bainier (tadašnji naziv *P. commune* Thom) (**Barkai-Golan, 1974; Borecka, 1977; Combrink et al., 1985; Koffman i Penrose, 1987**). U novijim istraživanjima kao prouzrokovaci plave truleži plodova jabuke identifikovane su i: *P. commune*, *P. chrysogenum* Thom, *P. digitatum* (Pers.) Sacc, *P. carneum* Frisvad, *P. polonicum* Zalesky, *P. italicum*, *P. griseofulvum* Dierckx, *P. ramulosum*, *P. glabrum*, *P. adametzii* Zalesky i *P. steckii* Zalesky (**Amiri and Bompeix, 2005; Andersen and Thrane, 2006; Moslem et al., 2010; Sang et al., 2010; van der Walt et al., 2010; Spadaro et al., 2011; Peter et al., 2012; Alwakeel, 2013; Louw and Korsten, 2014**).

Tabela 1. Pregled opisanih *Penicillium* vrsta prouzrokovaca plave truleži plodova jabučastog voća

Naziv vrste	Reference
Domaćin: jabuka	
<i>P. adometzii</i>	Alwakeel, 2013
<i>P. aurantiogriseum</i>	Heald and Ruehle, 1931; Borecka, 1977; Koffman and Penrose, 1987; Moslem et al., 2010
<i>P. brevicompactum</i>	Barkai-Golan, 1974
<i>P. carneum</i>	Andersen and Thrame, 2006; Peter et al., 2012
<i>P. commune</i>	Amiri and Bompeix, 2005
<i>P. chrysogenum</i>	Amiri and Bompeix, 2005; Alwakeel, 2013
<i>P. commune</i>	Amiri and Bompeix, 2005
<i>P. crustosum</i>	Prusky and Ben-Arie, 1985; Andersen and Thrame, 2006; Sang et al., 2010; Louw and Korsten, 2014; Vico et al., 2014b
<i>P. digitatum</i>	Amiri and Bompeix, 2005; Louw and Korsten, 2014
<i>P. diversum</i>	Borecka, 1977
<i>P. expansum</i>	Heald and Ruehle, 1931; Perišić, 1972; Borecka, 1977; Babović i sar., 1979; Pianzzola et al., 2004; Amiri and Bompeix, 2005; Andersen and Thrame, 2006; Sang et al., 2010; Louw and Korsten, 2014; Vico et al., 2014a
<i>P. funiculosum</i>	Combrink et al., 1985
<i>P. glabrum</i>	van der Walt et al., 2010
<i>P. griseofulvum</i>	Moslem et al., 2010; Spadaro et al., 2011
<i>P. italicum</i>	Sang et al., 2010
<i>P. polonicum</i>	Andersen and Thrame, 2006
<i>P. puberulum</i>	Koffman and Penrose, 1987
<i>P. ramulosum</i>	van der Walt et al., 2010
<i>P. rugulosum</i>	Barkai-Golan, 1974; Amiri and Bompeix, 2005
<i>P. solitum</i>	Holmes, 1990; Pianzzola et al., 2004; Amiri and Bompeix, 2005; Andersen and Thrame, 2006; Sang et al., 2010; Louw and Korsten, 2014
<i>P. spinulosum</i>	Borecka, 1977
<i>P. steckii</i>	Alwakeel, 2013
<i>P. verrucosum</i>	Penrose et al., 1984; Amiri and Bompeix, 2005
<i>P. viridicatum</i>	Heald and Ruehle, 1931
Domaćin: kruška	
<i>P. aurantiogriseum</i>	Sanderson and Spotts, 1995
<i>P. brevicompactum</i>	Louw and Korsten, 2014
<i>P. commune</i>	Sanderson and Spotts, 1995
<i>P. crustosum</i>	Sanderson and Spotts, 1995; Louw and Korsten, 2014; Stošić et al., 2021; Žebeljan et al., 2021
<i>P. cyclopium</i>	Borecka, 1977
<i>P. digitatum</i>	Louw and Korsten, 2014
<i>P. diversum</i>	Borecka, 1977
<i>P. expansum</i>	Sanderson and Spotts, 1995; Louw and Korsten, 2014; Stošić et al., 2021; Žebeljan et al., 2021
<i>P. griseofulvum</i>	Sanderson and Spotts, 1995
<i>P. italicum</i>	Stošić et al., 2021
<i>P. polonicum</i>	Khokhar et al., 2019
<i>P. solitum</i>	Sanderson and Spotts 1995; Louw and Korsten, 2014
<i>P. spinulosum</i>	Borecka, 1977
Domaćin: dunja	
<i>P. crustosum</i>	Žebeljan et al., 2021
<i>P. expansum</i>	Sharma and Sumbali, 1997; Žebeljan et al., 2021
<i>P. solitum</i>	Žebeljan et al., 2021
Domaćin: mušmula	
<i>P. crustosum</i>	Žebeljan et al., 2021

Najznačajniji prouzrokovaci plave truleži uskladištenih plodova kruške, prema navodima u literaturi, su *P. expansum*, *P. crustosum* i *P. solitum* (Louw and Korsten, 2014). Osim njih plavu trulež plodova kruške mogu prouzrokovati i *P. digitatum*, *P. brevicompactum*, *P. polonicum*, *P. cyclopium*, *P. diversum*, *P. spinulosum*, *Penicillium aurantiogriseum*, *P. commune* i *P. griseofulvum* (Borecka, 1977; Sanderson and Spotts, 1995; Louw and Korsten, 2014; Khokhar et al., 2019) (Tabela 1).

Iz plodova dunje sa simptomima plave truleži koja se javila u toku transporta, u skladištima, na pijacama i marketima u SAD izolovan je *P. expansum* (Pierson et al., 1971), a ovaj patogen je takođe izolovan iz zaraženih plodova dunje i u Indiji (Sharma and Sumbali, 1997) (Tabela 1).

U Srbiji su iz uskladištenih plodova jabuke, kruške i dunje sa simptomima plave truleži izolovane *P. expansum* (Perišić, 1972; Babović i sar., 1979; Vico et al., 2014a; Stošić et al., 2021; Žebeljan et al., 2021) i *P. crustosum* (Vico et al., 2014b; Stošić et al., 2021; Žebeljan et al., 2021), dok je iz plodova kruške izolovan i *P. italicum* (Stošić et al., 2021), a iz dunje *P. solitum* (Žebeljan et al., 2021). Iz zaraženog ploda mušmule sa simptomima plave truleži izolovan je *P. crustosum* (Žebeljan et al., 2021).

2.4. Osnovne karakteristike *Penicillium* spp. prouzrokovaca plave truleži

Vrste roda *Penicillium* su široko rasprostranjene, mogu se razvijati u gotovo svakom okruženju, nisu zahtevne u pogledu različitih hranljivih materija i oportunistički su patogeni. Većina opisanih vrsta naseljava zemljište i korisna je jer učestvuje u razgradnji organskih materija, međutim postoji određeni broj vrsta koje su patogeni biljaka. Među njima su od velikog značaja vrste koje izazivaju propadanje biljnih proizvoda tokom čuvanja i koje su tipični postžetveni patogeni (Frisvad and Samson, 2004; Pitt and Hocking, 2009; Vico i Duduk, 2020).

Rod *Penicillium* je opisao i imenovao Link (1809) po konidioforama koje su razgranate i podsećaju na četkicu, na latinskom *penicillus* (Muntanola-Cvetković, 1987; Visagie et al., 2014). Prve vrste ovog roda koje su okarakterisane bile su *P. expansum*, *P. glaucum* Link i *P. candidum* Link (Samson and Pitt, 1985), a za tipičnog predstavnika roda imenovana je vrsta *P. expansum*. Danas rod *Penicillium* broji 354 vrste i podeljen je u dva podroda (*Penicillium* i *Aspergilloides*) (Visagie et al., 2014). Gljive iz roda *Penicillium* pripadaju razdelu Ascomycota, podrazdelu Pezizomycotina, klasi Eurotiomycetes, podklasi Eurotiomycetidae, redu Eurotiales i familiji Aspergillaceae (Schoch et al., 2020).

Klasifikacija vrsta roda *Penicillium* pretrpela je brojne promene. Prema najnovijim istraživanjima i klasifikaciji (Houbraken et al., 2020) u okviru reda Eurotiales kom pripada rod *Penicillium*, razlikuje se pet familija, tri ranije izdvojene: Aspergillaceae, Thermoascaceae i Trichocomaceae (Houbraken and Samson, 2011) i dve nove: Elaphomycetaceae i Penicillaginaceae (Houbraken et al., 2020). Rod *Penicillium* pripada familiji Aspergillaceae, koja obuhvata dva podroda: *Aspergilloides* i *Penicillium*, 32 sekcije i 89 serija. Najznačajniji prouzrokovaci plave truleži jabučastog voća, *P. expansum*, *P. crustosum* i *P. solitum*, pripadaju sekciji *Penicillium*. Vrsta *P. expansum* pripada seriji *Penicillium*, dok vrste *P. crustosum* i *P. solitum* pripadaju seriji *Camembertiorum* (Houbraken et al., 2020).

Morfološke odlike. Vrste iz roda *Penicillium* obrazuju septiranu, hijalinsku miceliju na kojoj se obilno formiraju konidije na konidioforama koje mogu biti jednostavne i kratke sa pojedinačnim fijalidama, što je ređe, ili složene, razgranate. Konidiofore se sastoje iz razgranatog dela (lat. *penicillus*) i stabla (stipa; lat. *stipe*). *Penicillus* može da bude izgrađen iz koncentrično postavljenih fijalida ili može biti dva ili više puta razgranat, asimetrično ili simetrično. *Penicillus* se sastoji iz grana (lat. *ramuli*) koje su u odnosu na stipe postavljene na jedan, dva ili više nivoa, a zatim su metule (lat. *metula* - mala piramida) koje su poslednje grane u sastavu konidiofora i one nose fijalide. Fijalide su konidiogene ćelije, flašolikog oblika, i na njima se obrazuju konidije u lancima. Konidije su

okrugle i glatke, ali kod nekih vrsta mogu imati ornamentaciju. Fijalide imaju sužen vrh, koji se naziva kolula (lat. *collulum* - mali vrat) (Muntanola-Cvetković, 1987; Vico i Duduk., 2020).

Konidiofore vrsta roda *Penicillium* mogu biti razgranate na različite načine u obliku spirale, uvojka ili koncentričnog kruga (lat. *verticillata*) tako da se razlikuje pet tipova grananja konidiofora. *Monoverticillata* konidiofore se sastoje iz stipe na kojoj se formiraju fijalide u vidu uvojka. Najčešće se obrazuje jedan uvojak od fijalida. Kod nekih vrsta, vrh stipe može biti proširen, pa podseća na konidiofore vrsta roda *Aspergillus*. Drugi tip grananja konidiofora - *divaricata* obuhvata više načina grananja, od jednostavnih do složenih, pri čemu grane mogu biti neujednačene i može postojati veći broj bočnih grana zbog čega se opisuju i kao nepravilne konidiofore (*irregular*). *Biverticillata* konidiofore (treći tip grananja) se sastoje od stipe na čijem kraju se obrazuju tri ili više koncentrično raspoređene metule sa fijalidama u koncentričnim krugovima. Ove konidiofore imaju jedno mesta grananja. Kod četvrtog tipa grananja - *terverticillata* konidiofora postoje dva mesta grananja gde se na stipi formiraju pojedinačne grane, mada postoje i konidiofore koje na prvom mestu grananja obrazuju tri ili više grana koje nose metule i fijalide. Ove konidiofore su najčešće asimetrične. Peti tip grananja konidiofora, označen kao *quatterverticillata* je najsloženiji tip grananja i prisutan je samo kod nekoliko vrsta. Odlikuje ga postojanje tri mesta grananja, a konidiofore su asimetrične. Često se dešava, naročito u starijim kulturama kod vrsta koje obrazuju *terverticillata* ili *quatterverticillata* konidiofore, da bočne grane nisu u potpunosti ujednačene, već nastaju neke prelazne forme, te se ne može lako utvrditi koji tip grananja je najzastupljeniji (Pitt and Hocking, 2009; Visage, 2014; Vico i Duduk., 2020).

U kulturi, vrste roda *Penicillium* obrazuju belu miceliju u okviru koje obilno sporulišu pa otuda plavozelena boja kolonija. Izgled kolonija gljiva ovog roda zavisi od načina grupisanja konidiofora pa kolonije mogu biti somotaste, gromuljičaste, vunaste, končaste, krastaste i sinematozne. Kolonije izolata kod kojih se pojedinačne konidiofore uzdižu sa supstrata i koje imaju ujednačen somotast izgled označavaju se kao somotaste (*velvety*). Kod mnogih vrsta konidiofore koje se uzdižu sa površine podloge mogu da se grupišu u gromuljice (grudvice ili fascikle) i tad se obrazuje gromuljičasta kolonija (*fasciculata*). Ukoliko se konidiofore formiraju na masi vazdušnih hifa obrazuje se vunasta kolonija (*floccosa*), dok se u slučaju gde se vazdušne hife sa konidioforama udružuju i obrazuju se končasti zamotuljci, kolonija ima končast (funikulozan, *funiculose*) izgled. Konidiofore mogu da se udruže i da formiraju sineme ili koremije, pa se ovakva kolonija naziva sinematozna kolonija (Moss, 1987). Sineme se uzdižu iz supstrata što omogućava lakše rasejavanje konidija (Gow and Gadd, 1995). Najupadljivije koremije obrazuju vrste *P. vulpinum* (raniji naziv *P. claviforme*) i *P. isariiiforme* (Moss, 1987). Kod nekih vrsta u kulturi mogu da se odvajaju mase konidija u vidu krasti pa se ovakva kolonija naziva krastasta (*crustose*). Ovakav tip kolonija je karakteristika vrste *P. crustosum* (Frisvad and Samson, 2004; Houbraken et al., 2020).

Većina vrsta roda *Penicillium* u kulturi ne obrazuje sklerocije, ali ih neke vrste mogu stvarati u određenim uslovima. Sklerocije su karakteristične za vrste *P. gladioli* i *P. sclerotigenum*, kao i za pojedine izolate *P. olsonii* izolovane iz zemljišta na lokalitetima sa tropskom klimom. Ponekad se dešava da izolati *P. roqueforti* obrazuju strukture nalik na sklerocije na podlozi od sladnog agara nakon tri nedelje inkubacije. Vrsta *P. italicum* formira krupne, bele sklerocije na podlozi od ovsenih pahuljica u mraku pri 0°C nakon tri meseca, dok sklerocije mogu biti prisutne i kod *P. persicum* u starijim kulturama (Frisvad and Samson, 2004). Uočeno je da vrste *P. alexiae*, *P. indicum*, *P. rolsii* i *P. tsitsikammaense* stvaraju bele sklerocije, potom *P. araracuaraense*, *P. flavisclerotiatum*, *P. mariae-cruscis*, *P. olsonii*, *P. salami*, *P. soliforme* i *P. tanzanicum* formiraju sklerocije različitih nijansi žute. Narandžaste do narandžasto-braon sklerocije formiraju *P. aurantiacobrunneum*, *P. cairnsense*, *P. gallaicum*, *P. griseoflavum*, *P. manginii*, *P. miczynskii*, *P. pasqualense*, *P. quebecense* i *P. quercetorum*. *P. thomii* može da formira roze, *P. neocrassum* braon, a *P. atrofulvum* crne sklerocije (Houbraken et al., 2020).

Životni ciklus. *Penicillium* spp. se održavaju u zemljištu, na organskoj materiji na površini zemljišta, na trulim i prezimelim plodovima, drugim biljnim ostacima, opremi, ili gajbicama za nošenje jabuka (Domsch et al., 1980; Vico i Jurick, 2012; Rosenberger, 2014). Većina *Penicillium*

vrsta se razmnožava samo bespolnim putem, dok manji broj ima sposobnost i polnog razmnožavanja. Teleomorfni stadijumi vrsta roda *Penicillium* pripadaju rodu *Eupenicillium* (Pitt, 2014) i u njemu se obrazuju kleistotecije - askogene strukture, čvrstog zida koji je izgrađen od čvrstih izodiametrijskih ćelija (Samson et al., 2011; Pitt and Hocking, 2009). Pošto se većina vrsta roda *Penicillium* razmnožava samo bespolnim putem, šire se brojnim konidijama koje mogu u toku vegetacije dospeti na plod putem vetra ili kiše (Domsch et al., 1980; Rosenberger, 2014). U voćnjaku se plava trulež uglavnom javlja na opalim plodovima koji su u kontaktu sa zemljištem. Veoma retko može doći do infekcije dok je plod još na drvetu, a ukoliko se to desi, patogen obično dospeva u unutrašnjost ploda preko cvetne lože i čašičnog kanala, gde izaziva vlažnu trulež unutrašnjeg dela (van der Walt, 2010). Ekonomski najznačajnije su zaraze plodova nakon dospevanja u skladište gde su osnovni izvori inokuluma gajbice, boks palete, voda za pranje i transport plodova, oprema i zidovi skladišta kontaminirani konidijama i micelijom, kao i zaraženi plodovi (Turechek, 2004; Vico i Jurick, 2012). Patogen ne prodire direktno, već najčešće putem povreda, pri čemu su dovoljne i niske koncentracije spora (manje od 10 vitalnih spora po cm²) da bi se ostvarila infekcija (Domsch et al., 1980; Spotts and Cervantes, 1999; Amiri and Bompeix, 2005; Rosenberger, 2014). Pored povreda, patogen može prodrati i preko prirodnih otvora: lenticela, drški i cvetne lože (Raper and Thom, 1949; van der Walt, 2010; Rosenberger, 2014).

2.5. Osnovne karakteristike *Penicillium expansum*, *P. crustosum* i *P. solitum*

2.5.1. Osnovne karakteristike *Penicillium expansum*

Rasprostranjenost. *P. expansum* je široko rasprostranjena vrsta u svetu koja je prisutna na svim kontinentima. U Evropi je opisana u Belgiji, Bugarskoj, na Kipru, Češkoj, Danskoj, Francuskoj, Grčkoj, Italiji, Letoniji, Litvaniji, Poljskoj, Rumuniji, Srbiji, Slovačkoj, Španiji, Švedskoj i Ukrajini. U Aziji je prisutna u Jermeniji, Bruneju, Kini, Gruziji, Indiji, Iranu, Izraelu, Japanu, Kazahstanu, Koreji, Pakistanu, na Filipinima, u Saudijskoj Arabiji, Šri Lanki i Turskoj, a u Africi u Egiptu, Gani, Keniji, Mauricijusu, Maroku, Nigeriji, Južnoj Africi i Zimbabveu. Rasprostranjena je u Severnoj Americi (Kanada – Britanska Kolumbija, Manitoba, Nova Škotska, Ontario, Kvebek, Ostrvo Princa Edvarda), Sjedinjenim Američkim Državama (Kalifornija, Kolorado, Florida, Havaji, Idaho, Illinois, Indijana, Ajova, Kansas, Kentaki, Luisijana, Minesota, Misuri, Montana, Nebraska, Njujork, Severna Karolina, Severna Dakota, Ohajo, Oregon, Južna Dakota, Vašington, Zapadna Virdžinija i Viskonsin), Centralnoj Americi i Karibima (Honduras, Nikaragva), Južnoj Americi (Argentina, Brazil, Čile, Urugvaj, Venecuela) i zemljama Okeanije (Australija - Novi Južni Vels, Kvinslend, Južna Australija, Viktorija, Zapadna Australija i Novi Zeland) (CABI, 2021).

Krug domaćina. *P. expansum* je vrsta koja ima širok krug domaćina. Najznačajnija je kao prouzrokovatelj plave truleži jabučastog (jabuka, kruška i dunja) i koštičavog voća (trešnja, višnja, šljiva, nektarine i breskva), ali je izolovna i iz plodova velikog broja drugih biljnih vrsta: paradajza, papaje, avokada, ananasa, citrusa, kivija, oraha, žira, šišarke, grožđa, maslina, manga, jagode, pasulja, kukuruza, pšenice, ječma, uljane repice, šećerne repe, pirinča, pistača, kikirikija, lešnika, luka, mrkve i kupusa. Osim iz biljaka ova vrsta je izolovana i iz suvog mesa i ribe, sira, zamrznutog peciva sa voćem, voćnog jogurta, voćnog želea i soka od jabuke (Raper and Thom, 1949; Frisvad and Samson, 2004; Pitt and Hocking, 2009; Sanzani et al., 2013; Vico et al., 2014a; Houbraken et al., 2016; Louw and Korsten, 2016; Duduk et al., 2017; Prodromou et al., 2017; Prencipe et al., 2018; Strausbaugh, 2018; Houbraken et al., 2020; Luciano-Rosario et al., 2020; Stošić et al., 2021; Žebeljan et al., 2021).

Makroskopske morfološke odlike. Izolati *P. expansum* formiraju koncentrično naborane, gromuljičaste kolonije, sa ravnim rubom na podlozi Čapekov agar sa kvašćevim ekstraktom (Czapek Yeast Autolysate Agar, CYA). Micelija je bele boje, dok je boja konidija plavozelena do zelena

(Frisvad and Samson, 2004; Pitt and Hocking, 2009; Houbraken et al., 2020). U koloniji stvaraju eskudat u vidu bistrih kapi. Boja naličja kolonije je kremasta do žuta sa narandžastim, narandžasto braon ili tamno braon centrom (Frisvad and Samson, 2004). Izgled kolonija na podlozi sladni agar (Malt Extract Agar, MEA) može da bude različita, kod nekih izolata je uvek somotasta, dok kod drugih mogu u koloniji biti prisutne koremijske. Micelija je supstratna (Pitt and Hocking, 2009). Naličje kolonije na podlozi kvašćev agar sa saharozom (Yeast Extract Sucrose Agar, YES) je kremasto žute ili narandžaste boje (Frisvad and Samson, 2004). Prosečan prečnik kolonija nakon sedam dana inkubacije pri 25°C na različitim podlogama prikazan je u Tabeli 2.

Tabela 2. Pregled porasta kolonija *P. expansum*, *P. crustosum* i *P. solitum* na diferencijalnim podlogama nakon sedam dana inkubacije pri 25°C (Frisvad and Samson, 2004).

Vrsta	Porast kolonije na diferencijalnim podlogama (mm)			
	CYA	MEA	YES	CREA
<i>P. expansum</i>	16-34	16-34	38-65	23-28
<i>P. crustosum</i>	32-46	25-46	40-56	22-35
<i>P. solitum</i>	16-34	14-26	25-39	6-22

Mikroskopske morfološke odlike. Konidiofore *P. expansum* su tipa *terverticillata* ponekad i *biverticillata*, formiraju se na površinskoj ili substratnoj hifi. Mogu biti pojedinačne, grupisane u vidu grudvica (gromuljica, fascikli) ili koremijske, koje su ponekad vidljive golim okom (Pitt and Hocking, 2009). Veličina struktura koje grade konidiofore i konidija prikazana je u Tabeli 3. Stipe su uglavnom glatkih zidova, povremeno hrapave u nižim delovima (Frisvad and Samson, 2004; Pitt and Hocking, 2009). Rame (grane) i metule su cilindrične, metule su obično u grupi od 3 do 6 (Raper and Thom, 1949). Fijalide su cilindrično kupaste, sa kratkom kolulom (Frisvad and Samson, 2004; Pitt and Hocking, 2009) i formiraju se u grupama od 5 do 9 (Raper and Thom, 1949). Konidije su elipsoidne, glatkih zidova gusto su zbijene u nejednakim nizovima (Frisvad and Samson, 2004; Pitt and Hocking, 2009). Kada se prvi put formiraju oblik im može varirati od elipsoidnog do cilindričnog, dok su kasnije uglavnom elipsoidne (Raper and Thom, 1949). Sineme se formiraju u mladim kulturama ili nakon čuvanja u frižideru, na MEA ili podlozi od ovsenog agara (Frisvad and Samson, 2004).

Mikotoksini i drugi sekundarni metaboliti. *P. expansum* ima svojstvo da sintetiše veliki broj sekundarnih metabolita među kojima su i mikotoksini: patulin, citrinin, penicilinska kiselina, ciklopiazonska kiselina, hetoglobosini, komunensin A i B, rokuefortin C i ekspanzolidi (Andersen et al., 2004; Frisvad and Samson, 2004). U literaturi se navodi da hetoglobosini i komunensin ispoljavaju citotoksične efekte, citrinin i rokfortin C nefrotoksične, dok patulin ispoljava citotoksično, mutageno, embriotoksično i teratogeno dejstvo (Osswald et al., 1978; Roll et al., 1990; Smith et al., 1993; Karlshøj et al., 2007; Liu et al., 2007). Patulin se svrstava u grupu najtoksičnijih mikotoksina koje sintetiše *P. expansum* (Puel et al., 2010), a najznačajnija kontaminacija patulinom javlja se u plodovima jabuke (Jackson and Dombrink-Kurtzman, 2006) i soku od jabuke, dok u jabukovom sirćetu nije prisutan, jer se razgrađuje procesima alkoholne fermentacije (Battilani et al., 2008). *P. expansum* se može razviti i na otpacima od šećerne repe, kori krompira i raznim drugim biljnim ostacima, te treba voditi računa čime se hrane domaće životinje, da ne bi došlo do trovanja (Andersen et al., 2004). Zbog svoje toksičnosti, patulin je jedan od mikotoksina čija je količina u hrani zakonom regulisana u svetu i našoj zemlji. Propisana maksimalna dozvoljena količina patulina u Evropskoj uniji za sok od jabuka iznosi 50 µg/l, za čvrste proizvode od jabuka 25 µg/l i za sokove i hranu namenjenu za bebe i decu 10 µg/l (EU, 2003), dok u Srbiji dozvoljena količina patulina za voćne sokove, rekonstituisane voćne sokove, voćne nektare, alkoholna pića, fermentisana pića dobijena od jabuka iznosi 50 µg/kg, a za proizvode od jabuka u čvrstom stanju, uključujući kompot i pire od jabuka iznosi 25 µg/kg („Sl. Glasnik RS“, br. 29/2014 i 37/2014). Od mirisnih i isparljivih metabolita izolati *P. expansum* imaju sposobnost da stvaraju:

izobutanol, izopentanol, 1-metoksi-3-metil-benzen i geosmin (Mattheis and Roberts, 1992; Larsen and Frisvad, 1995).

Tabela 3. Pregled dimenzija konidiofora i konidija (μm) *Penicillium expansum*, *P. crustosum* i *P. solitum* posle sedam dana inkubacije na MEA podlozi pri 25°C, prema navodima u literaturi.

Struktura		<i>P. expansum</i>	<i>P. crustosum</i>	<i>P. solitum</i>	Autori
Stipe	dužina	200-500 400	200-400	200-400; 150-250	Frisvad and Samson, 2004; Pitt and Hocking, 2009; Raper and Thom, 1949
	širina	3-4 3-3,5	3,5-4,5	3,5-4,2	Frisvad and Samson, 2004; Raper and Thom, 1949
Rame	dužina	15-25 15-25	15-25	12-18	Frisvad and Samson, 2004; Raper and Thom, 1949
	širina	3-4 2,5-3,5	3,5-4	3,5-4,2	Frisvad and Samson, 2004; Raper and Thom, 1949
Metule	dužina	11-15 10-15	10-15	11-15	Frisvad and Samson, 2004; Raper and Thom, 1949
	širina	3-4 2-3	3-3,5	3-3,5	Frisvad and Samson, 2004; Raper and Thom, 1949
Fijalide	dužina	8-12 8-12	9-12 (11)	9-11 (10)	Frisvad and Samson, 2004 (Pitt and Hocking, 2009) Raper and Thom, 1949
	širina	2,5-3,2 2-2,5	2,5-3	2,5-3	Frisvad and Samson, 2004 Raper and Thom, 1949
Konidije	dužina	3-3,5 4-5	3-4	3,5-4,5	Frisvad and Samson, 2004; Pitt and Hocking, 2009) Raper and Thom, 1949
	širina	2,5-3 2,5-3,5	/	/	Frisvad and Samson, 2004 Raper and Thom, 1949

Ekološke odlike. Optimalna temperatura za porast *P. expansum* je 25°C, dok se minimalna temperatura na kojoj je zabeležen porast razlikuje u istraživanjima, pa tako ona u većini slučajeva iznosi -2°C (Mislivec and Tuite, 1970), dok Pasheko (1967) navodi -3°C, a kod Brooks i Hansfors (1923) čak i -6°C (loc. cit Pitt and Hocking, 2009). Maksimalna temperatura na kojoj je zabeležen rast je oko 35°C (Pasheko, 1967; loc. cit Pitt and Hocking, 2009). U radu Gougouli and Koutsoumanis (2010) prikazana je zavisnost brzine porasta micelije *P. expansum* od temperature. Razvijanjem modela došlo se do podataka da je minimalna temperatura na kojoj je zabeležen rast iznosi 5,74°C, optimalna 22,08°C, a maksimalna 30,97°C. Relativna vlažnost vazduha koja je optimalna za razvoj iznosi između 82 i 95%, dok je minimalna količina vlage koja je potrebna za sporulaciju 85% (Ostry et al., 2004). Međutim, *P. expansum* može da raste i pri niskoj relativnoj vlažnosti kao i niskim pH vrednostima, ali toleriše kako kisele tako i alkalne uslove (Frisvad et al., 2000). Potreba za kiseonikom je veoma mala, o čemu svedoči istraživanje u kom je porast ostao nepromenjen pri koncentraciji kiseonika manjoj od 2,1% (Golding, 1940, 1945; loc cit. Pitt and Hocking, 2009). Primećeno je da koncentracija ugljen dioksida do 15% pospešuje porast, dok viša koncentracija izaziva inhibiciju. Spore se mogu umrtviti držanjem kulture 21 dan u uslovima sa koncentracijom ugljen dioksida od 13% (Cossentine et al., 2004).

2.5.2. Osnovne karakteristike *Penicillium crustosum*

Rasprostranjenost. *P. crustosum* je vrsta gljiva koja je prisutna na svim kontinentima. U Evropi je detektovana u Bugarskoj, Danskoj, Grčkoj, Italiji, Nemačkoj, Norveškoj, Portugaliji, Sloveniji, Srbiji, Škotskoj i Švedskoj. U Aziji je opisana u Hong Kongu, Indiji, Indoneziji, Kazahstanu, Koreji, Libiji i Pakistanu, a na američkom kontinentu u Argentini, Gvatemali, SAD-u i Kanadi. Detektovana je i u Južnoj Africi, Australiji, Novim Zelandu i Papua Novoj Gvineji. (Frisvad and Samson, 2004; Vico et al., 2014b; Farr and Rossman, 2022).

Krug domaćina. *P. crustosum* ima širok krug domaćina. Prisustvo ove vrste je potvrđeno na većini žitarica i životinjskih uzoraka, a može se naći u zemljištu, sloju rizosfere oko korena biljke, u vazduhu, morskoj vodi i glečerima (Frisvad and Samson, 2004; Sonjak et al., 2005). Izolovan je iz kukuruza, pirinča, pistača, badema, kikirikija, lešnika, oraha, zrna bibera, kafe, soje, pasulja, lukovica crnog luka, kupusa, plodova jabuke, kruške, dunje, nektarine, citrusa, dinja, malina, trešanja i suvog voća. Osim toga, *P. crustosum* je izolovan iz obrađenog mesa, sira, jaja, hleba, keksa, kolača, pudinga i voćnih sokova (Frisvad and Samson, 2004; Pitt and Hocking, 2009; Sanzani et al., 2013; Lopez et al., 2016; Duduk et al., 2020; Žebeljan et al., 2021; Farr and Rossman, 2022).

Makroskopske morfološke odlike. Izolati *P. crustosum* na CYA podlozi formiraju somotaste ili gromuljičaste, ravne, a ređe radijalno naborane kolonije. Micelija je bele boje sa obilnom sporulacijom i konidijama uglavnom tamno zelene do zelenotirkizne boje. Kapljice eksudata su prozirne, svetlo smeđe, a ponekad tamno smeđe boje. Naličje je blede (krem) ili žuto narandžasto braon boje, često jarko obojeno po ivicama kolonije. Na MEA podlozi, kolonije su somotaste, sa belom micelijom na kojima formira masa spora. Zbog velikog broja, konidiofore i konidije se odlamaju i formiraju kraste kada se kolonija protrese (Pitt and Hocking, 2009). Naličje je krem do žućkasto smeđe boje. Naličje kolonije na YES podlozi je jarko žute boje (Frisvad and Samson, 2004). *P. crustosum* je jedna od bržerastućih vrsta u rodu *Penicillium*. Prosečan prečnik kolonija pri 25°C posle sedam dana inkubacije na diferencijalnim podlogama prema Frisvad and Samson (2004) prikazan je u Tabeli 2. Prečnik kolonija pri različitim temperaturama 7 dana od inokulacije na CYA podlozi iznosi: 28-31 mm pri 15°C, 15-26 mm pri 30°C, dok pri 37°C nije zabeležen porast (Frisvad and Samson, 2004).

Mikroskopske morfološke odlike. *P. crustosum* najčešće formira konidiofore tipa *terverticillata*, ponekad *quatterverticillata*. Veličina struktura koje grade konidiofore i konidija prikazana je u Tabeli 3. *P. crustosum* formira stipe nazubljenih zidova. Rame i metule su cilindrične (Frisvad and Samson, 2004; Pitt and Hocking, 2009). Pitt and Hocking (2009) navode da je oblik fijalida ampuliforman, dok su Frisvad and Samson (2004) zabeležili fijalide cilindričnog oblika. Konidije su uglavnom okrugle, glatkih zidova, ređe ovalne ili eliptične. Formiraju se u velikom broju u nizovima (Frisvad and Samson, 2004; Pitt and Hocking, 2009).

Mikotoksini i drugi sekundarni metaboliti. *P. crustosum* proizvodi veliki broj sekundarnih metabolita: penitrem A-F, terestričnu kiselinu, ciklopenol i rokuefortin C-E, viridikatine (ciklopeptin, dehidrociklopeptin, ciklopenin ciklopenol, viridikatin, viridikatol), hadacin i andrasin (Frisvad and Samson, 2004; Sonjak et al., 2005). Od mikotoksina se izdvajaju peritrem A i rokuefortin C, koji spadaju u moćne neurotoksine (Hocking et al., 1988; Pitt, 2002; Cole et al., 2003). Penitrem A u većim količinama može prouzrokovati smrt ili ozbiljno oštećenje mozga kod domaćih životinja (Hocking et al., 1988). Za stvaranje penitrema A neophodna je visoka vlažnost vazduha (Pitt, 2002). Sonjak et al. (2005) su utvrdili da su svi ispitivani *P. crustosum* izolati lučili penitrem A i to u velikim količinama, što predstavlja opasnost po ljudsko zdravlje. Od mirisnih i isparljivih metabolita izolati *P. crustosum* imaju sposobnost da stvaraju: etil acetat, izobutanol, etil propanat, izopentanol, dimetildisulfid, etil izobutanoat, izobutil acetat, etil butanoat, etil-2-metil butanoat, etil izopentanoat, izopentil acetat, stiren, etil pentanoat, 3-oktanon, etil heksanoat, etil oktanoat, 2-metil-izoborneol i geosmin (Frisvad and Samson, 2004).

Ekološke odlike. Optimalna temperatura za porast *P. crustosum* je 25°C, minimalna -2°C, a maksimalna oko 30°C. Optimalne pH vrednosti na kojima raste se kreću od 4,5 do 9. Minimalna pH vrednost na kom je zabeležen porast je 2,2, a maksimum 10 (Pitt and Hocking, 2009).

2.5.3. Osnovne karakteristike *Penicillium solitum*

Rasprostranjenost. *P. solitum* je vrsta roda *Penicillium* koja je takođe rasprostranjen na svim kontinentima. U Evropi je detektovana u Danskoj, Francuskoj, Holandiji, Nemačkoj, Norveškoj, Poljskoj, Rusiji, Srbiji, Švedskoj i Velikoj Britaniji, dok je u Aziji zabeležena u Kini i Libanu. Na američkom kontinetu je prisutna u SAD-u, Kanadi, Grenlandu, Urugvaju. Detektovana je i u Južnoj Africi, Australiji i na Antartiku (Frisvad and Samson, 2004; Pianzzola et al., 2004; Mulenko et al., 2008; Gonçalves et al., 2013; Louw and Korsten, 2014; Žebeljan et al., 2021; Farr and Rossman, 2022).

Krug domaćina. Prisustvo *P. solitum* je potvrđeno na jabuci, krušci, dunji, orašastim plodovima, limunu, paradajzu, šafranu, siru, suvom mesu, a izolovan je i iz sedimenata u moru (Frisvad and Samson, 2004; Pitt and Hocking, 2009; Chatterton et al., 2012; Gonçalves et al., 2013; Louw and Korsten, 2014; Zhang et al., 2020; Habib et al., 2021; Žebeljan et al., 2021).

Makroskopske morfološke odlike. Izolati *P. solitum* na CYA podlozi formiraju kolonije koje su somotaste, ređe granulirane i gromuljičaste, slabo radijalno naborane, ređe ravne ili lepezaste. Micelija je bela, obično vidljiva na rubu kolonije, koja obilno sporuliše. Boja konidija je tamnoplavozelena. Eksudat uglavnom nije prisutan, ponekad biva obilan, providan i dominira površinom kolonije. Naličje je obično krem ili bezbojno, ređe žuto ili smeđe. Kolonije na MEA su somotaste do gromuljičaste, ređe vunaste. Micelija je bela, ređe žuta, sa tamnoplavozelenim konidijama. Naličje je sivonarandžasto do smeđenarandžasto (Pitt and Hocking, 2009). Naličje na YES podlozi je žute do narandžaste boje (Frisvad and Samson, 2004). Prečnik kolonija *P. solitum* prema Frisvad and Samson (2004) pri 25°C, 7 dana od inokulacije diferencijalnih podloga prikazan je u Tabeli 2. Prečnik kolonija pri različitim temperaturama posle sedam dana inkubacije na CYA podlozi iznosi: 3-5 mm pri 5°C, 18-30 mm pri 15°C, dok pri 30°C i 37°C nije zabeležen porast (Frisvad and Samson, 2004).

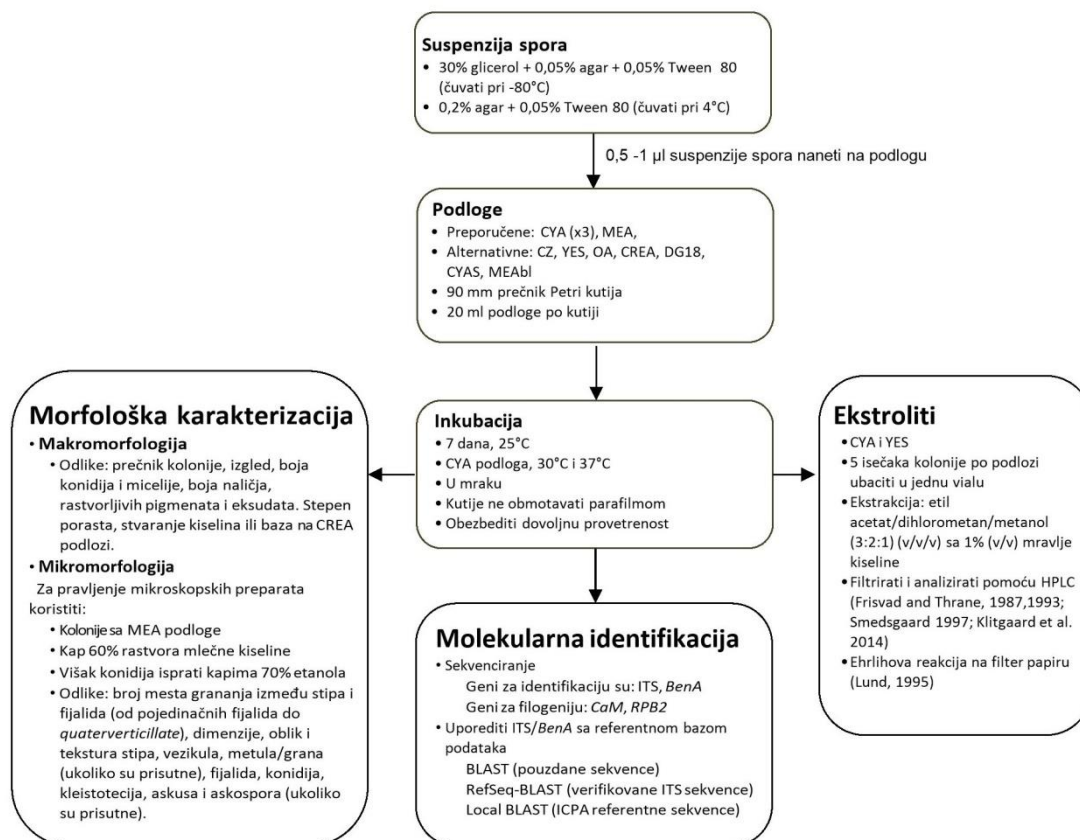
Mikroskopske morfološke odlike. *P. solitum* formira konidiofore tipa *terverticillata*, a veličina delova konidiofora i konidija prikazana je u Tabeli 3. Formira stipe glatkih i nazubljenih zidova (Pitt and Hocking, 2009). Rame i metule su cilindrične (Frisvad and Samson, 2004), a fjalide su cilindrične do ampuliformne. Konidije su okrugle do ovalne, glatkih do blago nazubljenih zidova (Frisvad and Samson, 2004; Pitt and Hocking, 2009).

Mikotoksini i drugi sekundarni metaboliti. Za *P. solitum* u dostupnoj literaturi nema podataka o proizvodnji mikotoksina (Frisvad and Samson, 2004), a od sekundarnih metabolita ova vrsta proizvodi jedinjenja iz grupe kompaktina, solistatina, viridikatina (ciklopenol, ciklopenin, ciklopeptin, dehidrociklopeptin, viridikatin, viridikatol, 3-metoksiviridikatin), benzodiazepin alkaloida, meroterpenoida i palitantin (Frisvad and Samson, 2004; Nunez et al., 2007; Boruta et al., 2018). Od mirisnih i isparljivih metabolita izolati *P. solitum* stvaraju izobutanol, izopentanol i 2-metil-izoborneol (Larsen and Frisvad, 1995).

Ekološke odlike. *P. solitum* je mezofil, ali ujedno ima sposobnost da toleriše niske temperature. Utvrđeno je da raste pri temperaturi od 5°C, dok pri 37°C nije zabeležen porast. Smatra se da je maksimalna temperatura na kojoj može da raste nešto viša od 30°C. Takođe, toleriše visoku koncentraciju soli (Pitt and Hocking, 2009; Gonçalves et al., 2013).

2.6. Identifikacija vrsta roda *Penicillium*

U taksonomiji i identifikaciji vrsta roda *Penicillium* morfologija je igrala ključnu ulogu u prošlosti, a danas zajedno sa filogenetskom analizom više genskih regiona i profilom ekstracelularnih metabolita čini deo sveobuhvatnog koncepta za proučavanje *Penicillium* vrsta. Ovaj polifazni pristup (Slika 1) obuhvata proučavanje fenotipskih karakteristika (mikroskopskih i makroskopskih), fizioloških karakteristika (porast na različitim diferencijalnim podlogama pri različitim temperaturama i zahteve za hemijski aktivnom vodom), biohemijskih karakteristika (profil ekstrolata) i molekularnih karakteristika (osobine više genskih lokusa i filogenetsku analizu) (Visagie et al., 2014).



Slika 1. Postupci i metode za identifikaciju i karakterizaciju vrsta roda *Penicillium* (Visagie et al., 2014).

Makroskopske morfološke karakteristike. Osnovni koraci u procesu identifikacije vrsta roda *Penicillium* su ispitivanje morfoloških karakteristika kolonije, kao i merenje brzine porasta kolonija na određenoj podlozi. Karakteristike kolonija značajne za identifikaciju *Penicillium* vrsta su izgled i boja, prisustvo i boja rastvorljivih pigmenata i eksudata, boja naličja, kao i brzina porasta i proizvodnja kiselina na podlozi CREA. Hranljive podloge za proučavanje *Penicillium* spp. su: Čapekov agar sa kvašćevim ekstraktom (Czapek Yeast Autolysate Agar, CYA) (Pitt, 1979) i sladni agar (Malt Extract Agar, MEA) (Samson et al., 2010), a mogu se koristiti i Čapekov agar (Czapek Agar, CZ) (Raper and Thom, 1949), kvašćev agar sa saharozom (Yeast Extract Sucrose Agar, YES) (Frisvad, 1981), agar od ovsenih pahuljica (Oatmeal Agar, OA) (Samson et al., 2010), kreatin agar sa saharozom (Creatine Sucrose Agar, CREA) (Frisvad, 1981), agar sa dihloranom i 18% glicerolom (Dichloran 18% Glycerol Agar, DG18) (Hocking and Pitt, 1980), Blakeslee-ov sladni agar (Blakeslee's Malt Extract Agar, MEAbI) (Blakeslee, 1915) i CYA sa 5 % NaCl (CYAS). Za ispitivanje morfoloških osobina, diferencijalne podloge se zasejavaju na tri mesta suspenzijom spora

ispitivanog izolata i inkubiraju sedam dana pri 25°C. Za ispitivanje brzine porasta izolata na 30°C i 37°C koristi se CYA podloga (Visagie et al., 2014).

Mikroskopske morfološke karakteristike. Mikroskopske morfološke karakteristike za identifikaciju *Penicillium* vrsta su karakteristike konidiofora i kleistotecija (ukoliko ih vrsta obrazuje). Donedavno je način grananja konidiofora igrao ključnu ulogu u klasifikaciji, a danas nije osnovna, ali je i dalje neizostavna karakteristika vrste (Visagie et al., 2014). Osim tipa grananja konidiofora jedna od bitnih karakteristika je i izgled konidiofora i stipa (Visagie et al., 2014). Za posmatranje mikroskopskih karakteristika vrste u identifikaciji se koriste 7 do 10 dana stare kulture odgajene na MEA podlozi. Mikroskopski preparati se najčešće pripremaju u mlečnoj kiselini (Visagie et al., 2014), a prema Frisvad and Samson (2004) i Samson et al. (2010) mogu se koristiti i Širerov rastvor ili mlečna kiselina sa metilenskim plavim. Pogodno je dodati i kapi 70% etanola (Visagie et al., 2014).

Biohemijske odlike - Ehrlich-ov test. Kod gljiva iz roda *Penicillium* utvrđeno je da postoji razlika između vrsta u sekundarnom metabolizmu, zbog čega su biohemijske odlike značajne i u taksonomiji vrsta ovog roda. Vrste koje su se razdvojile na osnovu različitih profila ekstrofita kasnije su razdvojene i primenom molekularnih metoda. Ehrlich-ov test je metoda ispitivanja biohemijskih osobina izolata *Penicillium* spp. kojom se utvrđuje proizvodnja ciklopiazonske kiseline i drugih alkaloida. U ovoj metodi se koristi filter papir natopljen Ehrlich-ovim reagensom koji se nanosi na lice isečka 7–10 dana stare kolonije na CYA podlozi. Pojava ljubičastog prstena nakon 2–6 min pokazuje da kultura sadrži ciklopiazonsku kiselinu, dok roze i žuti prsten ukazuju na to da gljiva proizvodi druge alkaloida. Ako se reakcija pojavi nakon 7–10 min označava se kao slaba (Lund, 1995; Frisvad and Samson, 2004). Kolonije *P. expansum* u reakciji sa Ehrlich-ovim reagensom najčešće obrazuju jaku, ljubičastu boju prstena, kolonije *P. crustosum* formiraju žuti prsten, dok u reakciji kolonija *P. solitum* sa Ehrlich-ovim reagensom izostaje pojava boje (Frisvad and Samson, 2004).

Molekularne karakteristike. Tokom 1990. godine metoda sekvenciranja DNK postala je najznačajnija metoda u identifikaciji gljiva, a molekularne karakteristike važan činilac u njihovoj taksonomiji. ITS region predstavlja primarni barkod region za identifikaciju gljiva (Schoch et al., 2012). U slučaju roda *Penicillium*, na osnovu ITS regiona je moguće odrediti kojoj sekciji određeni izolat pripada, a ponekad i izvršiti identifikaciju (Visagie et al., 2014). Međutim, kao i kod drugih rodova pripadnika razdela Ascomycota, ovaj DNK region nije dovoljno varijabilan da bi omogućio razlikovanje između svih srodnih vrsta (Skouboe et al., 1999, Seifert et al., 2007, Schoch et al., 2012). Zato je neophodna analiza i drugih genskih regiona, kako bi sa sigurnošću identifikovali izolat do nivoa vrste. Karakteristike koje genski regioni moraju da ispune kako bi bili pogodni za identifikaciju i karakterizaciju su mogućnost lakog umnožavanja, lako razlikovanje veoma srodnih vrsta, reprezentativnost za sve vrste i moraju da budu korisni u filogenetskim istaživanjima. Na osnovu ovih karakteristika u identifikaciji i karakterizaciji vrsta iz roda *Penicillium* izdvojili su se geni za β -tubulin (*BenA*), kalmodulin (*CaM*) i gen za sintezu druge po veličini podjenice u okviru RNA polimeraze II (*RPB2*). *BenA* region je najpogodniji za pouzdanu identifikaciju vrsta roda *Penicillium* (Visagie et al., 2014). Wilson and Borisy (1997) su pokazali da iako su geni za tubuline visoko konzervativni i kao takvi se razlikuju između vrsta, sadrže i varijabile regione koji određuju divergentnost unutar vrste. Familija tubulin gena se sastoji iz tri visoko konzervativne subfamilije: α , β i γ -tubulina (Edlind et al., 1996; Keeling and Doolittle, 1996; loc. cit. Tuszyński et al., 2006). *CaM* i *RPB2* regioni takođe poseduju sličnu sposobnost razlikovanja među vrstama kao i *BenA* (Visagie et al., 2014). *RPB2* region se smatra pogodnim za filogenetska istraživanja jer postoji samo jedna kopija gena koji je sporo evoluirao (Liu, 1999). Nakon umnožavanja pristupa se poređenju sličnosti dobijenih sekvenci sa sekvencama u svetskoj bazi podataka (GenBank) korišćenjem BLAST algoritma za čije tumačenje je potrebno dobro poznavanje genetičkih i drugih osobina patogena. Zbog toga je Internacionalna komisija za *Penicillium* i *Aspergillus* (International Commission of

Penicillium and *Aspergillus*, ICPA) učinila dostupnim pristupne brojeve sekvenci referentnih sojeva kao barkodove za identifikaciju vrsta roda *Penicillium* (Visagie et al., 2014). Dakle, za pouzdanu identifikaciju vrsta iz roda *Penicillium* se preporučuje umnožavanje ITS regiona i *BenA* gena, dok za identifikaciju nove vrste neophodno je analizirati sledeće regione: ITS, *BenA*, *CaM* i *RPB2* (Visagie et al., 2014). Prajmeri koji se preporučuju za umnožavanje pomenutih regiona i uslovi PCR umnožavanja su prikazani u Tabelama 4 i 5.

Za detekciju i identifikaciju vrste *P. expansum* Marek et al. (2003) su dizajnirali specifične prajmere (PEF/PER) zasnovane na genu za poligalaktironazu, koji PCR metodom umnožavaju sekvencu veličine oko 404 bp. Ova metoda pouzdano razlikuje *P. expansum* od srodnih vrsta i veoma je osetljiva, jer je dovoljno samo 25 konidija da se *P. expansum* detektuje (Marek et al., 2003).

Tabela 4. Pregled prajmera za umnožavanje genskih regiona neophodnih za filogenetska ispitivanja *Penicillium* vrsta.

DNK region	Naziv prajmera	Redosled nukleotida u prajmeru (5'→3')	Reference
ITS rDNK region	ITS 1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	White et al. 1990
	ITS 4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	
	V9G	TTA CGT CCC TGC CCT TTG TA	de Hoog and Gerrits van den Ende, 1998
	LS266	GCA TTC CCA AAC AAC TCG ACT C	Masclaux et al., 1995
β -tubulin (<i>BenA</i>)	Bt _{2a}	GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC	Glass and Donaldson, 1995
	Bt _{2b}	ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC	
Kalmodulin (<i>CaM</i>)	CMD5	CCG AGT ACA AGG ARG CCT TC	Hong et al., 2006
	CMD6	CCG ATR GAG GTC ATR ACG TGG	
	CF1	GCC GAC TCT TTG ACY GAR GAR	Peterson et al., 2005
	CF4	TTT YTG CAT CAT RAG YTG GAC	
RNK polimeraza II (<i>RPB2</i>)	5F	GAY GAY MGW GAT CAY TTY GG	Liu et al., 1999
	7CR	CCC ATR GCT TGY TTR CCC AT	
	5Feur	GAY GAY CGK GAY CAY TTC GG	Houbraken et al., 2012
	7CReur	CCC ATR GCY TGY TTR CCC AT	

Tabela 5. Uslovi za umnožavanje genskih regiona neophodnih za filogenetska ispitivanja *Penicillium* vrsta (Visagie et al., 2014).

DNK region	Početna denaturacija	Broj ciklusa	Denaturacija	Vezivanje prajmera	Elongacija	Završna elongacija
ITS, <i>BenA</i> , <i>CaM</i>	94°C, 5 min	35	94°C, 45 s	55°C, 45 s	72°C, 60 s	72°C, 7 min
alternativa	94°C, 5 min	35	94°C, 45 s	52°C, 45 s	72°C, 60 s	72°C, 7 min
<i>RPB2</i>	94°C, 5 min	5	94°C, 45 s	50°C, 45 s	72°C, 60 s	72°C, 7 min
		5	94°C, 45 s	52°C, 45 s	72°C, 60 s	
		30	94°C, 45 s	55°C, 45 s	72°C, 60 s	
<i>RPB2</i>	94 °C, 5 min	5	94°C, 45 s	48°C, 45 s	72°C, 60 s	72°C, 7 min
alternativa		5	94°C, 45 s	50°C, 45 s	72°C, 60 s	
		30	94°C, 45 s	52°C, 45 s	72°C, 60 s	

2.7. Fiziološke promene u zdravim i zaraženim plodovima jabuke tokom čuvanja

Čuvanje plodova ima za cilj da obezbedi njegovo neprekidno korišćenje u svežem stanju bez pogoršanja kvaliteta i zasniva se na usporavanju dozrevanja, odnosno fizioloških i biohemijskih procesa (**Mratinić i Đurović, 2015**). Fiziološki procesi kod obranih plodova jabuke razlikuju se od onih tokom vegetacije i tokom čuvanja ova živa tkiva nastavljaju da se menjaju. Najznačajniji fiziološki procesi koji se menjaju u toku čuvanja plodova su disanje, transpiracija, proizvodnja etilena, promene u sastavu, porast i razvoj (**Mratinić i Đurović, 2015; Vico i Duduk, 2020**). Zbog ovih promena sveže voće gubi kvalitet, ali dolazi i do povećavanja njegove osetljivosti prema postžetvenim patogenima. Neki od razloga su razgradnja pektina i razmekšavanje plodova, smanjivanja količine antimikrobnih jedinjenja kao što su na primer fenolna jedinjenja ili promene u sastavu šećera i organskih kiselina (**Barkai-Golan, 2001**). Nakon prodiranja patogena i tokom ostvarivanja infekcije i kolonizacije tkiva fiziološki procesi u zaraženim plodovima u toku čuvanja takođe prolaze kroz različite promene koje zavise od specifičnog odnosa ploda i patogena, odnosno od patosistema biljka-patogen (**Vico i Duduk, 2020**).

Fiziološke promene u zdravim plodovima. U zdravim plodovima jabuke posle berbe dolazi do promena u koncentraciji šećera, organskih kiselina i amino kiselina. Proces dozrevanja plodova jabuke počinje u plodovima dok su na drvetu i tada se uočava postepen porast koncentracije šećera i polarnih jedinjenja, postepeno smanjenje koncentracije organskih kiselina i nepolarnih jedinjenja, kao i naglo smanjenje sadržaja amino kiselina. Takođe, tokom procesa dozrevanja dolazi i do naglog nagomilavanja skroba. Njegovim razlaganjem povećava se sadržaj prostih šećera, što poboljšava ukusa ploda, a ujedno razlaganjem prostih šećera se obezbeđuje energija za mnogobrojne fiziološke procese. Jabučna kiselina utiče na nagomilavanje skroba, koja se tom prilikom razgrađuje, pa se njena količina smanjuje. Smanjena količina amino kiselina posledica povećane sinteze proteina, neophodnih za različite procese tokom dozrevanja. Povećana koncentracija polarnih jedinjenja koji učestvuju u metaboličkim procesima tokom sazrevanja objašnjava se povećanom aktivnošću metabolizma, naročito tokom klimakteričnog perioda ploda jabuke, kada koncentracija polarnih jedinjenja dostiže svoj maksimum. Sadržaj nepolarnih jedinjenja, kao što su polisaharidi koji ulaze u sastav ćelijskog zida smanjuje se tokom dozrevanja. Razlozi za to su raskidanje veza među strukturnim jedinjenjima i izostanak njihove ponovne sinteze, što prouzrokuje razmekšavanje ploda jabuke (**Ackerman, 1992; Sadar et al., 2016; Xu et al., 2020**).

Antioksidanti čine značajnu grupu jedinjenja koja imaju, kako ulogu u otpornosti plodova prema biljnim patogenima, tako i kod ljudi koji ih koriste u svojoj ishrani. Najznačajniji antioksidanti u biljkama su askorbinska kiselina ili askorbat, glutation i fenolna jedinjenja (**Francini and Sebastiani, 2013**). Koncentracija antioksidanata u plodovima jabuke može zavisiti od sorte, faze dozrevanja, spoljašnjih faktora, kao i uslova čuvanja: temperature, atmosfere i dužine čuvanja. Zbog toga se često dešava da su u različitim istraživanjima rezultati kontradiktorni (**Lachman et al. 2000; Lee and Kader 2000; Van der Sluis et al. 2001; Avad and de Jager 2003; Leja et al. 2003; Planchon et al. 2004; loc cit. Lata et al., 2005**). Jabuka sadrži raznovrsna fenolna jedinjenja (polifenole) koji uključuju hidroksicimetne kiseline (hlorogenksa kiselina, kafa kiselina, p-kumarinska kiselina), različite flavanoide - flavonole (glukozidi kvercetina), flavan-3-ole (katehin, epikatehin i proantocijanini), dihidrohalkone (floridzin) i antocijanine (glukozidi cijanidina) (**Slatnar et al., 2012; Francini and Sebastiani, 2013; Čebulj et al., 2017**). Sadržaj fenola u plodovima jabuke zavisi od sorte, faze dozrevanja, spoljašnjih faktora, kao i uslova skladištenja. Koncentracija fenolnih jedinjenja je mnogo veća u kori nego u mesu ploda jabuke, a u osunčanoj strani je koncentracija fenola čak četiri puta veća negu zasenjenoj strani ploda (**Čebulj et al., 2017**).

Usled dugog skladištenja plodova na niskim temperaturama dolazi do različitih promena u sastavu primarnih metabolita, što nepovoljno utiče na ukus plodova, te smanjuje njihov kvalitet. Tokom dugog čuvanja plodova, dolazi do smanjenja skroba i povećanja nivoa čak 33 vrste šećera (saharoza, fruktoza, glukoza, ksiloza, rafinoza, sorbitol, inositol, mio-inositol, itd.). Dolazi do povećanja nivoa jabučne kiseline i malata, citrata i sukcinata, kao i nivoa nezasićenih masnih kiselina.

Takođe dolazi i do povećanja nivoa fitohormona: etilena, abscisinske kiseline i jasmonata (**Zhao et al., 2020**). **Begić -Akagić (2011)** su zabeležili postepeno smanjenje sadržaja fenola kod plodova šest sorti jabuke čuvanih dva meseca pri temperaturi 1°C., dok su **Carbone et al., 2011**) zabeležili smanjenje koncentracije fenola i to za 50% u mesu ploda, a 20% u pokožici plodova, kod sorte Breburn, a kod sorti Zlatni Delišeš i Fudži nije zabeležena promena u koncentraciji fenola, tri meseca nakon čuvanja na temperature 1°C.

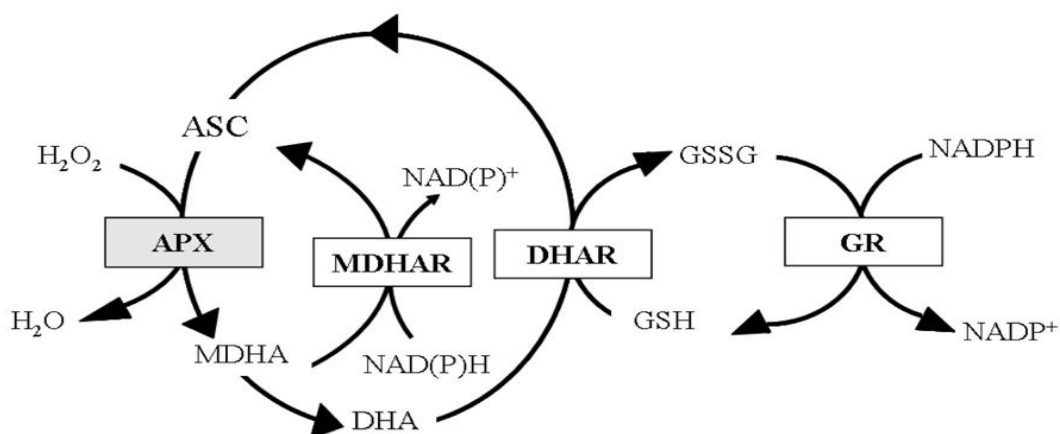
Koncentracija askorbata i askorbat peroksidaze se smanjuje nakon 60 dana skladištenja, dok se posle tog perioda povećava. Koncentracija katalaze se smanjuje tokom skladištenja plodova jabuke, a sadržaj jedinjenja sa tiol grupom (cistein, γ -glutamin cistein, redukovani i oksidovani glutathion) je najveća u semenu, potom u pokožici i najmanja u mesu ploda. Koncentracija glutathiona tokom skladištenja se značajno ne menja u svim delovima ploda jabuke, ali je zabeležena viša koncentracija prekursora glutathiona (γ -glutamin cistein), kao i enzima zaduženog za njegovu regeneraciju (glutathion reduktaza) (**Lata et al., 2005**).

Patofiziološke promene. Biljke su tokom evolucije razvile mehanizme odbrane koji se zasnivaju na prepoznavanju jedinjenja koja nastaju usled prisustva patogena (**Singh et al., 2021**). To mogu biti različiti proteini, glikoproteini, peptidi, ugljenihidrati, lipidi koji ako ih određeni receptor biljke prepozna, aktiviraju različite mehanizme odbrane (**Punja, 2004**). Jedna od prvih reakcija zaraženih biljaka na prisustvo patogena je akumulacija reaktivnih kiseonikovih radikala (ROS - *Reactive Oxygen Species*), kao i aktiviranje sistema antioksidativne zaštite enzimima i jedinjenjima kao što su askorbat i glutathion, koji međusobno intereaguju u formi askorbatno-glutathionskog ciklusa (AA-GSH) (**Kunert et al., 2023**). ROS se stvaraju u zdravim ćelijama domaćina u niskim koncentracijama, usled transporta elektrona u hloroplastima i mitohondrijama i usled oksido-reduktivnih reakcija, koje se odvijaju u drugim delovima ćelije. U zdravim ćelijama stvaraju se ROS radikali: superoksid radikal ($\bullet O_2^-$), vodonik peroksid (H_2O_2), hidroksi radikal ($\bullet OH$) i azot-monoksid (NO), od kojih se u uslovima stresa u najvećoj stvari H_2O_2 . ROS su veoma reaktivni i mogu reagovati sa proteinima, nukleinskim kiselinama i lipidima koji ulaze u sastav ćelijskih membrana, usled čega dolazi do smanjene fotosinteze, povećanog curenja elektrolita iz ćelije, ubrzavanja procesa starenja i ćelijske smrti. Posledica može biti smrt ćelije patogena (antimikrobno dejstvo), ali i smrt ćelije domaćina (hipersenzitivna reakcija) čiji je cilj sprečavanje širenja patogena u domaćinu (**Qin et al., 2011; Kuzniak and Kopczewski, 2020; Singh et al., 2021**). ROS takođe, poseduju i signalnu ulogu, jer lako dospevaju do ostalih ćelija putem difuzije, gde aktiviraju odbrambene mehanizme biljke (**Torres et al., 2006; Singh et al., 2021**) kao što su povećano stvaranje fitoaleksina, taloženje kaloze u ćelijskim zidovima oko plazmodezmi, stvaranje sistemčne indukovane otpornosti, povećanu sintezu antioksidanata: askorbata, poliamina, glutathiona, kao i povećanu aktivnost antioksidativnih enzima: superoksid dismutaze, katalaze i glutathion-S-transferaze (**Singh et al., 2021**).

Aktivacija odbrambenih mehanizama zahteva dodatnu energiju koja se dobija intenziviranjem disanja, razgradnjom šećera, amino kiselina i lipida i aktivacijom fenilpropanoidnog biosintetskog puta (**Grace 2005; Ramon et al., 2008; Rojas et al., 2014**). Za to vreme se primarni metabolički procesi zaduženi za rast i razvoj biljke usporavaju ili prekidaju, kako se energija ne bi nepotrebno trošila (**Bolton, 2009**). Pored toga što predstavljaju dodatni izvor energije šećeri imaju i signalnu ulogu, a organske kiseline su značajne kao prekursori u sintezi mnogih sekundarnih metabolita. Poznato je da je šikiminska kiselina neizostavno jedinjenje u sintezi fenola (**Grace 2005**), dok je jabučna kiselina ključan intermedijer u Krebsovom ciklusu i kao takva bitan faktor u proizvodnji energije (**Casati et al., 1999; Libik-Konieczny et al., 2012**). Osim energije, u zaštiti od visokih količina ROS-a, biljnoj ćeliji su potrebni antioksidanti. U biljkama postoji čitav splet antioksidanata, od jednostavnih do veoma složenih molekula, a neki od najznačajnijih su glutathion i askorbat, koji kroz askorbatno-glutathionskog ciklus (AA-GSH ciklus; ili *Foyer-Halliwel-Ascada* ciklus) vrše deaktivaciju ROS-a. H_2O_2 se, kao najčešća forma ROS-a u reakciji sa askorbatom uz posredstvo askorbat peroksidaze redukuje do vode, dok se askorbat oksiduje. Askorbat se može vratiti u redukovani oblik (aktivna forma) posredstvom enzima monodehidroaskorbat peroksidaza (MDHAR) ili preko glutathiona uz posredstvo enzima dehidroaskorbat peroksidaza (DHAR). Oksido-

redukcijske reakcije između askorbata i glutationa čine AA-GSH ciklus (Slika 2). Glutation može da inaktivira ROS preko askorbata, ali to može činiti i direktno uz pomoć glutation peroksidaze, pri čemu nastaje oksidovana forma glutation disulfid (GSSG) (Kunert et al., 2023).

Pojedini fenoli takođe, igraju ključnu ulogu u detoksifikaciji ROS-a, a njihove oksidovane forme se mogu redukovati, predavanjem elektrona askorbatu, a moguće i tiolima (Foyer and Noctor, 2011, Urbanek Krajnc et al. 2014). Pored toga što su pomenuta jedinjenja ključna u borbi sa viškom ROS-a, ona imaju i druge karakteristike: askorbat i glutation se zbog male molekulske mase lako transportuju do drugih ćelija i imaju važnu ulogu kao signalni molekuli (Mullineaux and Rausch, 2005), dok su fenoli značajna antifungalna jedinjenja (Sun et al., 2017). Biljke se uz pomoć antioksidanata oslobađaju toksičnog viška ROS-a, nekada potpunom, a nekada delimičnom deaktivacijom – čime povišen nivo ROS-a ostavljaju na nivou koji nije toksičan, da bi služio za signalizaciju drugim ćelijama da aktiviraju odbrambene mehanizme (Mittler, 2002).



Slika 2. Šema askorbatno-glutationskog ciklusa (AA-GSH ciklus, Foyer-Halliwell-Ascada ciklus): ASC - askorbat (redukovana forma), APX - askorbat peroksidaza, MDHA - monodehidroaskorbat, DHA - dehidroaskorbat, MDHAR - monodehidroaskorbat reduktaza (oksidovana forma), DHAR - dehidroaskorbat reduktaza (oksidovana forma), GSH - glutation (redukovana forma), GSSG - glutation disulfid (oksidovana forma), GR - glutation reduktaza (Locato et al., 2013).

2.7.1. Fiziološke promene u plodovima jabuke zaraženim *Penicillium* spp.

Ispitivanja fizioloških procesa u plodovima jabuke zaraženih vrstama roda *Penicillium*, kao i samih mehanizama ostvarivanja infekcije i kolonizacije plodova jabuke obuhvataju događaje vezane za rane faze ostvarivanja interakcije i to ROS, promene sastava aminokiselina, građe proteina, količine kiselina, fenolnog sastava, disanja, stvaranja etilena i drugih isparljivih jedinjenja, kao i promene pH domaćina (Torres et al., 2003; Jurick et al., 2010; Schovankova and Opatova, 2011; Sanzani et al., 2013; Munoz-Bertomeu and Lorences, 2014; Vilanova et al., 2014; 2017; Barad et al., 2014; Buron-Moles et al., 2015; Wang et al., 2019; Gong et al., 2019; 2021).

Istraživanja patosistema plod jabuke – *Penicillium* spp. pokazala su da je jedna od prvih promena vezana za povećano prisustvo ROS jedinjenja u inokulisanim plodovima (Torres et al., 2003; Buron-Moles et al., 2015; Wang et al., 2019). Wang et al. (2019) su ispitivanjem ekspresije gena u plodovima jabuke i u *P. expansum* tokom ranih faza predprodiranja i prodiranja (aktiviranje konidija – 1 hpi, bubrenje – 3 hpi i klijanje konidija i prodiranje – 6 hpi) pokazali da je u povređenom plodu došlo do aktivacije imuniteta podstaknutog patogenom (PAMP-triggered immunity, PTI), kao i aktiviranja signalnog puta već u fazi aktiviranja konidije (1 hpi). Tokom ove faze u konidiji je došlo do ekspresije gena za sintezu enzima za razgradnju ćelijskog zida, koji razlažući ćelijski zid oslobađaju komponente ćelijskog zida koji pokreće PTI u plodu jabuke. Imunitet podstaknut efektorima (Effector-triggered immunity, ETI) se aktivirao u plodu jabuke u fazi bubrenja konidije (3 hpi). U ovom periodu došlo je do stvaranja ROS-a u plodu, dok je kao reakcija na biljni ROS *P.*

expansum stvarao glutation peroksidaze koja neutrališe delovanje biljnog ROS-a. Takođe, patogen je stvarao glukoza oksidazu kojom može da menja pH sredine, obezbeđujući time optimalnu pH za klijanje spora, razvoj micelije i aktivnost hidrolitičkih enzima za razlaganje ćelijskog zida. Najintenzivniji odgovor zasnovan na PTI, ETI i signalnom putu **Wang et al. (2019)** su uočili u plodovima jabuke u fazi klijanja konidija (6 hpi). U cilju inhibiranja odbrambenih reakcija ploda jabuke *P. expansum* je sintetisao efektore – proteine koji izazivaju nekrozu, hitinaze i druge efektore koji onemogućavaju prepoznavanje i pokretanje odbrambenog odgovora zasnovanog na prepoznavanju hitina. Ovi efektori se vezuju za hitin tako da ih maskiraju i čuvaju od PTI. Povećana ekspresija efektoru u *P. expansum* vezana je za prevazilaženje ETI. Najveći broj gena koji su se prepisali u *P. expansum* odnose se na enzime za razgradnju ćelijskog zida (celulaze, hemicelulaze, pektinaze i hidrolaze), antioksidativni stres, pH regulaciju i druge efektore. Enzimi uključeni u razgradnju ćelijskog zida predstavljaju faktore virulentnosti za *P. expansum* (**Jurick et al., 2010**).

Torres et al. (2003) su u svojim ispitivanjima fizioloških promena u patosistemu jabuka - *P. expansum* u početnim fazama zaraze (6 hpi) utvrdili naglo povećanje koncentracije H₂O₂, dok se nakon 12 i 24 hpi koncentracija naglo smanjila. Povećana koncentracija H₂O₂ dovela je do oksidacije nekih biljnih proteina i poremećaja njihovih funkcija (**Buron-Moles et al., 2015**). U plodovima jabuke inokulisanim *P. expansum* (24 hpi) utvrđeno je da su proteini - ATP sintetaza, RuBisCO i šikiminska dehidrogenaza u najvećoj meri bili oksidovani. Slično tome, u plodovima jabuke inokulisanim vrstom *P. digitatum* (24 hpi) utvrđeno je povećanje oksidacije proteina koji učestvuju u različitim metaboličkim procesima: ATPaza (anabolički procesi), malat dehidrogenaze (Krebsov ciklus), ACC oksidaza (sinteza etilena) i polifenol oksidaza (sinteza fenola). Nakon 48 h od inokulacije zabeležena je oksidacija vakuolarne ATP-aze i glutamin sintaze - proteina zaduženog za usvajanje slobodnog amonijaka. Oksidacijom navedenih proteina dolazi do poremećaja različitih metaboličkih procesa, stvaranja energije i nedostatka određenih hranljivih materija, što stvara nepovoljne uslove za razvoj *P. expansum* i *P. digitatum*. Ova ispitivanja su takođe pokazala da u plodovima jabuke prisustvo patogena različite virulentnosti, kao i mehanička povreda dovode do promena u sastavu proteina i da su oksidacije biljnih proteina koje inicira ROS odbrambene reakcije ploda jabuke prema biotskim i abiotskim faktorima (**Buron-Moles et al., 2015**).

U plodovima jabuke zaraženim *P. expansum* utvrđeno je značajno smanjenje aktivnosti nekih biljnih enzima kao što je ksiloglukan endotransglukozilaza (XET). Ovaj enzim koji je uključen u metabolizam hemiceluloze, značajan je za održavanje integriteta ćelijskog zida, kao i za rast i dozrevanje plodova jabuke. Smanjenje njegove aktivnosti doprinosi razmekšavanju plodova jabuke što ima povoljan uticaj na kolonizaciju plodova jabuke gljivom *P. expansum*. Zbog toga se i smatra da ovo delovanje na XET domaćina predstavlja jedan od faktora virulentnosti patogena (**Munoz-Bertomeu and Lorences, 2014**).

Vrste kao što su *Penicillium expansum*, *P. digitatum* i *P. italicum* imaju sposobnost da snižavaju pH vrednost u ćelijama svog domaćina, tako što luče veće količine organskih kiselina. Cilj promene pH vrednosti u ćeliji domaćina je da patogen obezbedi najpovoljnije uslove za ekspresiju gena koji učestvuju u patogenezi (**Jurick et al., 2010; Sanzani et al., 2013**). U plodovima jabuke zaraženim *P. expansum* primećeno je smanjenje pH vrednosti, dok to nije bio slučaj u jabukama zaraženim *P. digitatum*, čiji jabuka nije prirodni domaćin. Nakon ostvarene infekcije *P. expansum* u plodovima jabuke je detektovano povećanje sadržaja glukonske, fumarne i galakturonske kiseline i smanjenje jabučne kiseline, dok je količina limunske kiseline ostala nepromenjena (**McCallum et al. 2002; Hadas et al. 2007; Vilanova et al., 2014**). Smatra se da glukonska i fumarna kiselina utiču na smanjenje pH u zaraženom tkivu plodova jabuke (**Vilanova et al., 2014**), jer glukonska kiselina dovodi do blagog smanjenja pH (za 0,2) (**Barad et al., 2014**), dok i male količine fumarne kiseline imaju sposobnost da smanje pH u jabučnom soku (**Vilanova et al., 2014**). Kao posledica sniženog pH dolazi do povećane ekspresije gena, koji su zaduženi za sintezu hidrolitičkih enzima (**Bateman and Beer, 1965; loc cit. Vilanova et al., 2014**), dok povećan sadržaj glukonske kiseline prouzrokuje povećanu sintezu patulina, jer se smatra da je glukonska kiselina jedna od prekursora za njegovu sintezu (**Barad et al., 2014**).

Istraživanja takođe pokazuju da plodovi jabuke zaraženi vrstama *P. expansum* i *P. digitatum* emituju veće količine etilena (**Gong et al., 2019; Vilanova et al., 2017**), a kod plodova jabuke zaraženih *P. expansum* dolazi i do povećanja intenziteta disanja (**Gong et al., 2019**). Time biljka počinje da stvara više energije, koja je neophodna za sintezu različitih odbrambenih jedinjenja. U plodovima jabuke zaraženim *P. expansum* uočena je i povećana sinteza određenih amino kiselina, kao i isparljivih jedinjenja. U početnim fazama zaraze povećava se sadržaj asparaginske, glutaminske i aromatičnih amino kiselina, što pospešuje primarni metabolizam i odbrambene reakcije ploda, dok povećanje sadržaja amino kiselina iz piruvat i serin familije pozitivno utiče na dalju sintezu antimikrobnih jedinjenja. Napredovanjem kolonizacije tkiva takođe se povećava sadržaj amino kiselina, ali kao posledica degradacije proteina u zaraženom tkivu (**Gong et al., 2021**).

U plodovima jabuke zaraženim *P. expansum* kao jedan od najznačajnijih vidova odbrane dolazi do povećanja sadržaja fenolnih jedinjenja kako u tkivu koje okružuje zaraženu zonu, tako i u zdravom tkivu. Fenoli su jedna od najznačajnijih antimikrobnih jedinjenja (**Mikulič Petkovšek et al. 2003; 2008; 2010**). U istraživanju **Schovankova and Opatova (2011)** uočeno je da je porast u sadržaju fenola najveći nakon sedam dana od inokulacije, dok znatno opada 14 i 21 dana. Ova istraživanja su pokazala da je *P. expansum* izazvao povećanu sintezu floridzina u zdravom delu ploda, dok je u zoni oko zaraženog tkiva zabeležena veća količina hlorogenske kiseline i epikatehina. Aktivnost fenilalanin-amonijum liaze (enzim koji učestvuje u sintezi fenola) je bila povećana u zoni oko zaraženog tkiva. Takođe, **Sun et al. (2017)** navode da se *P. expansum* sporije razvija u plodovima jabuke sa većim sadržajem fenola, kao što su: procijanidini, dihidrohalokoni, flavonoli i hidroksicimetna kiselina.

U istraživanjima dinamike fizioloških promena u plodovima jabuke inokulisanih vrstama *P. expansum* i *P. crustosum*, koja su ujedno i istraživanja u okviru ove disertacije, **Žebeljan et al. (2019a; 2019b)** su uočili sličnosti u reakciji plodova na infekciju, ali i razlike u dinamici tih promena. Oba patogena su uslovila slične promene u plodovima jabuke, gde se slom otpornosti ogledao u smanjenju sadržaja glutaciona i ukupnih fenola. Međutim, *P. expansum* je kao virulentniji patogen izazivao intenzivnije reakcije i brže promene u plodovima jabuke nego *P. crustosum*., a samim tim i brže napredovanje plave truleži.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Plava trulež je jedna od ekonomski najznačajnijih postžetvenih bolesti jabučastog voća koju prouzrokuju gljive iz roda *Penicillium*. Osim intenzivnog propadanja plodova u toku čuvanja, veliki broj vrsta ovog roda su toksigene gljive koje mogu kontaminirati plodove mikotoksinima. Zbog značaja i zastupljenosti plave truleži uskladištenog jabučastog voća u svetu, kao i doprinosa u poznavanju ovog oboljenja i njegovih prouzrokovaca u našoj zemlji, ciljevi ove disertacije bili su:

- da se ispita etiologija oboljenja, odnosno utvrde prouzrokovaci plave truleži jabučastog voća u Srbiji,
- da se identifikuju i okarakterišu vrste roda *Penicillium*, prouzrokovaca plave truleži jabučastog voća u Srbiji, na osnovu na osnovu morfoloških, biohemijskih i molekularnih osobina,
- da se utvrdi virulentnost dobijenih izolata *Penicillium* vrsta na plodovima jabučastog voća,
- da se utvrde sličnosti i razlike među identifikovanim vrstama, kao i izolatima iste vrste,
- da se ispitaju fiziološke promene u plodovima jabuke, koje su posledica infekcije vrstama roda *Penicillium* i
- da se kroz poznavanje dinamike promena primarnih metabolita i antioksidanata prouče odbrambene reakcije ploda jabuke u toku interakcije sa patogenom, odnosno od trenutka prodiranja i ostvarivanja infekcije do kolonizacije, sloma otpornosti ploda i razvoja truleži.

4. MATERIJAL I METODE RADA

4.1. Prikupljanje plodova jabučastog voća

Tokom 2014. i 2015. godine prikupljeni su plodovi jabučastog voća sa simptomima plave truleži iz skladišta sa različitim uslovima čuvanja. Simptomatični plodovi jabuke, kruške, dunje i mušmule sakupljeni su iz ukupno 20 lokaliteta (Balta Berilovac, Bavanište, Belosavci, Brestovik, Bogatić, Valjevo, Grocka, Kamendol, Leskovac, Mala Remeta, Paraćin, Ralja, Radmilovac, Ritopek, Smederevo, Sremska Mitrovica, Sremski Karlovci, Čelarevo, Šabac, Šid). Plodovi jabuke i kruške su sakupljeni u periodu od mesec dana do šest meseci posle berbe iz hladnjača, ULO hladnjača i podruma, dok su plodovi dunje i mušmule sakupljeni u periodu od nekoliko dana do mesec dana posle berbe iz hladnjača i podruma. Prikupljeni plodovi su pojedinačno pakovani u kese i obeležavani, nakon čega su preneti u Laboratoriju za postžetvenu fitopatologiju, Katedra za fitopatologiju, Poljoprivrednog fakulteta – Univerziteta u Beogradu, gde su dalje vršena ispitivanja.

4.2. Izolacija gljiva iz obolelih plodova i dobijanje čistih kultura

Plodovi jabučastog voća sa simptomima plave truleži su oprani, a zatim dezinfikovani 70% etanolom. Nakon aseptičnog uklanjanja pokožice ploda, fragmenti tkiva sa prelaza zdravog i zaraženog dela ploda su isečeni, postavljeni na hranljivu podlogu od krompir dekstroznog agara (Potato dextrose agar, PDA) i inkubirani u mraku pri temperaturi $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Nakon 5 dana inkubacije, fragmenti kolonije su iz razvijenih kultura preneti na sterilnu PDA podlogu u cilju dobijanja čistih kultura.

4.3. Provera patogenosti dobijenih izolata, reizolacija gljiva i dobijanje monosporijalnih izolata

Provera patogenosti svih dobijenih izolata obavljena je veštačkim inokulacijama zdravih plodova jabuke sorte Ajdared, a izolata poreklom iz kruške, dunje ili mušmule patogenost je proverena i na domaćinu iz kojeg su izolovani. Korišćeni su zdravi plodovi kruške sorte Vilijamovka, dunje sorte Leskovačka i lokalna sorta mušmule. Plodovi su oprani deterdžentom, isprani sterilnom vodom i površinski sterilisani 70% alkoholom. Svaki plod je povređen na dva mesta (ubod dubine 14 mm i širine 4 mm), sa suprotnih strana ploda, i u povredu je uneseno 40 μl suspenzije spora koncentracije 10^6 konidija/ml. Suspenzija spora pripremana je tako što je u 5 ml sterilne vode sa dodatkom 0,05% Tween 20 (Sigma-Aldrich, SAD) prenet fragment kolonije izolata (prečnika 6 mm) iz kulture stare 10 dana odgajene na PDA na sobnoj temperaturi. Koncentracija suspenzije spora je merena pomoću Bürker-Türk-ovog hemocitometra. Po dva ploda jabuke su inokulisana po izolatu, odnosno dva ploda jabuke i dva ploda odgovarajućeg domaćina. Kontrolni plodovi (po dva ploda jabuke, kruške, dunje i mušmule) su tretirani na isti način, osim što je umesto suspenzije spora gljive, korišćena ista količina sterilne vode sa dodatkom Tween-a 20 (0,05%). Inokulisani i kontrolni plodovi su inkubirani u sterilnim plastičnim posudama sa navlaženim filter papirom (da se obezbedi visoka vlažnost) pri temperaturi $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$, a nakon sedam dana je posmatran razvoj simptoma. Iz inokulisanih plodova na kojima su se pojavili simptomi plave truleži, izvršena je reizolacija gljiva. Monosporijalne kulture su dobijene kod svih patogenih izolata metodom iscrpljivanja (Janisiewicz, lična komunikacija). Izolati su čuvani u rastvoru 30% glicerola, 0,05% agara i 0,05% Tween 20, pri temperaturi od -80°C .

4.4. Molekularna detekcija, identifikacija i karakterizacija

4.4.1. Ekstrakcija DNK

Ekstrakcija DNK obavljena je po CTAB protokolu (**Day and Shatock, 1997**) iz micelije kultura starih sedam dana odgajenih na PDA podlozi. Iz kulture svakog izolata oko 10 mg micelije je homogenizovano u sterilnom avanu uz dodatak tečnog azota. U svaki uzorak je dodato po 800 µl ekstrakcionog CTAB pufera (100 mM Tris HCl, pH 8,0; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA i 2% CTAB, cetiltrimetilamonijumbromid, pH 8). Sadržaj je prebačen u sterilne mikrotube od 2 ml i inkubiran u vodenom kupatilu na 65°C, u trajanju od 1h, gde je na 15 minuta sadržaj snažno mućkan. Po završenoj inkubaciji u svaku mikrotubu je dodato po 600 µl hloroforma, 10 s mešano u Vortex tresilici i centrifugirano 10 min pri 13.000 rpm. Izdvojeni gornji sloj tečnosti zapremine oko 500 µl je ispipetiran i prenet u novu sterilnu mikrotubu gde je dodato 300 µl izopropanola. Ovako pripremljeni uzorci su inkubirani u trajanju od 10 min na -20°C, pa centrifugirani 10 min pri 13.000 rpm. Sva tečna faza je pažljivo odlicena iz mikrotuba, pri čemu je ostao talog nukleinskih kiselina. U svaku mikrotubu je dodato po 600 µl 70% etanola i centrifugirano je 10 min pri 13.000 rpm. Nakon toga je supernatant ponovo pažljivo odlicen, a mikrotube sa talogom su ostavljene otvorene nekoliko sati na sobnoj temperaturi da se osuše. Talog je resuspendovan u 100 µl TE pufera (10 mM Tris pH 8 i 1 mM EDTA) i ostavljen nekoliko sati pri 4°C u frižideru da se dobro rastvori. Dobijena nukleinska kiselina čuvana je pri temperaturi od -20°C.

4.4.2. Lančana reakcija polimeraze

Metoda lančane reakcije polimeraze (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) primenjena je za umnožavanje specifičnih regiona DNK u cilju molekularne detekcije, identifikacije i karakterizacije gljiva roda *Penicillium* izolovanih iz plodova jabučastog voća. Preliminarno, za specifičnu detekciju vrste *P. expansum* korišćeni su PEF/PER prajmeri zasnovani na delu gena za poligalakturonazu (*Pepg1*) (**Marek et al., 2003**). Zatim su za molekularnu identifikaciju i karakterizaciju umnožena četiri regiona: ITS region, korišćenjem prajmera ITS1/ITS4 (**White et al., 1990**), deo gena za β-tubulin (*BenA*) korišćenjem prajmera Bt2a/Bt2b (**Glass and Donaldson, 1995**), deo gena za kalmodulin (*CaM*), korišćenjem prajmera CMD5/CMD6 (**Hong et al., 2006**) i deo gena za drugu po veličini podjedinicu koja sačinjava enzim RNA polimerazu II (*RPB2*) korišćenjem prajmera 5F/7CR (**Liu i sar. 1999**) (Tabela 6).

Priprema smeše u kojoj će se odviti PCR reakcija obavljena je u radnoj zapremini od 25 µl, dodavanjem 12,5 µl 2x PCR Master miksa (Fermentas, Lithuania), 9,5 µl RNase-free vode Molecular Biology Grade Water, Eppendorf), 1 µl svakog prajmera (10 pmol/µl, Metabion international AG, Germany) i 1 µl ekstrahovane DNK izolata. Kao negativna kontrola korišćena je PCR reakciona smeša bez dodatka DNK. PCR reakcija izvedena je u termosajkleru (Thermocycler T-1, Biometra, UK) pri različitim uslovima zavisno od korišćenih prajmera.

Za umnožavanje specifičnih regiona DNK u PCR reakciji primenjeni su sledeći uslovi:

- za *Pepg1*: inicijalna denaturacija nukleinskih kiselina 5 min pri 92°C; 30 ciklusa (denaturacija 1 min pri 92°C, hibridizacija (annealing) 45 s pri 55°C i elongacija 45 s pri 72°C); finalna elongacija 7 min pri 72°C (**Marek et al., 2003**);
- za ITS region: inicijalna denaturacija nukleinskih kiselina 2 min pri 95°C; 35 ciklusa (denaturacija 30 s pri 95°C, hibridizacija 30 s pri 55°C i elongacija 1 min pri 72°C); finalna elongacija 10 min pri 72°C;
- za *BenA* i *CaM*: inicijalna denaturacija nukleinskih kiselina 5 min pri 94°C; 35 ciklusa (denaturacija 45 s pri 94°C, hibridizacija 45 s pri 55°C i elongacije 1 min pri 72°C); finalna elongacija 7 min pri 72°C;
- za *RPB2*: inicijalna denaturacija nukleinskih kiselina 5 min pri 94°C; 5 ciklusa (denaturacija 45 s pri 94°C, hibridizacija 45 s pri 50°C i elongacija 1 min pri 72°C); 5 ciklusa (denaturacija

45 s pri 94°C, hibridizacija 45 s pri 52°C i elongacija 1 min pri 72°C); 30 ciklusa (denaturacija 45 s pri 94°C, hibridizacija 45 s pri 55°C i elongacija 1 min pri 72°C); finalna elongacija 7 min pri 72°C (Visagie et al., 2014).

Tabela 6. Prajmeri korišćeni za umnožavanje specifičnih regiona DNK *Penicillium* spp.

Ciljna sekvenca	Naziv	Sekvenca 5'-3'	Veličina	Literatura
<i>Pepg1</i>	PEF PER	ATC GGC TGC GGA TTG AAA G AGT CAC GGG TTT GGA GGG A	404 bp	Marek et al., 2003
ITS rDNK	ITS1 ITS4	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	~600 bp	White et al., 1990
<i>BenA</i>	Bt2a Bt2b	GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC	511 bp	Glass and Donaldson, 1995
<i>CaM</i>	CMD5 CMD6	CCG AGT ACA AGG AGG CCT TC CCG ATA GAG GTC ATA ACG TGG	~500 bp	Hong et al., 2006
<i>RPB2</i>	5F 7CR	GA(T/C) GA(T/C) (A/C)G(A/T) GAT CA(T/C) TT(T/C) GG CCC AT(A/G) GCT TG(T/C) TT(A/G) CCC AT	~1000 bp	Liu et al., 1999

4.4.3. Vizuelizacija PCR produkata

Za vizuelizaciju, PCR produkti su prvo razdvojeni elektroforezom u 1,5% agaroznom gelu. Agarozni gel je pripremljen u 1 x TBE puferu (Tris-Borat 90 mM, EDTA 1 mM), razliven u kalup i nakon očvršćavanja uronjen u 1 x TBE pufer u kadici za horizontalnu elektroforezu. Umnoženi produkti (5 µl) su pomešani sa 1 µl boje (6x Loading Dye Solution, Fermentas Lithuania) i odmah nalivani u bunarčiće u gelu po odgovarajućem rasporedu. Pored produkata naliveno je i 6 µl markera (Gen Ruler 100 bp DNA Ladder, Fermentas Lithuania). Elektroforeza je izvedena u aparatu za horizontalnu elektroforezu (PeqPOWER, Peqlab Germany), pri konstantnoj struji od 100 V u trajanju od 35 min. Po završenoj elektroforezi gel je uronjen u vodeni rastvor etidijum bromida u koncentraciji od 5 µg/ml i inkubiran 20 min. Umnoženi produkti posmatrani su pomoću UV transiluminatora i fotografisani.

4.4.4. Prečišćavanje PCR produkta

Za odabrane izolate, PCR produkti su prečišćeni korišćenjem mi-PCR Purification Kit (Metabion International AG, Germany) po uputstvu proizvođača: u tubice sa 20 µl PCR produkta dodato je 100 µl pufera za vezivanje (DNAmBunding Buffer), a zatim je pipetiranjem sve dobro promešano. Smeša je prebačena u kolonu sa filterom i centrifugirana na maksimalnom broju obrtaja (13.000 rpm) u trajanju od 1 min u cilju vezivanja DNK za filter. Nakon centrifugiranja tečna faza je odbačena, a tubica je vraćena u kolonu sa filterom i u nju je dodato 750 µl pufera za ispiranje (Washing Buffer). Nakon centrifugiranja pri 13.000 rpm u trajanju od 1 min u kolone je dodato još 250 µl istog pufera (Washing Buffer), centrifugirano na 13.000 rpm u trajanju od 1 min i na kraju tečna faza je odbačena i kolona je vraćena u istu kolekcionu tubicu i centrifugirana pri istim uslovima. Nakon centrifugiranja kolona je prebačena u novu kolekcionu tubicu kroz koju je pipetirano po 50 µl zagrejane vode (Rnase-free water, Molecular Biology Grade Water, Eppendorf) temperature 65-75°C i još jednom centrifugirana pri istim uslovima. Odmah po završetku poslednjeg centrifugiranja kolona je odbačena, a prečišćen uzorak sakupljen u kolekcionoj tubici čuvan je pri -20°C.

4.4.5. Sekvenciranje, analiza sekvenci i filogenetske analize

Prečišćeni produkti poslani su na uslužno sekvenciranje u oba smera u MacroGen Inc. (<http://dna.macrogen.com>, Korea). Dobijene sekvence su obrađene u programu Pregap 4 u okviru Staden paketa (Staden et al., 2000) i dobijene su konzenzus nukleotidne sekvence. Molekularna identifikacija *Penicillium* izolata poreklom iz Srbije izvršena upoređivanjem obrađenih konzenzus sekvenci sa dostupnim sekvencama deponovanim u GenBank bazi podataka NCBI (National Center for Biotechnology and Information), pomoću BLAST analize (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Višestruko poravnanje dobijenih sekvenci sa sekvencama preuzetim iz GenBank baze podataka uređeno je pomoću Clustal X (Thompson et al., 1997) za svaki genski region posebno.

Međusobno poređenje sekvenci dobijenih i odabranih izolata, za proučavanje evolutivnih odnosa i rekonstruisanje filogenetskih stabala vršeno je korišćenjem različitih metoda u okviru programskog paketa MEGA X (Kumar et al., 2018). Filogenetske analize urađene su na osnovu pojedinačnih sekvenci četiri genska regiona (ITS, *BenA*, *CaM* i *RPB2*), kao i na osnovu spojenih sekvenci više genskih regiona (multilokus analiza) i to tri genska regiona (*BenA*, *CaM* i *RPB2*) i sva četiri regiona. U analizama su korišćene sekvence 26 dobijenih izolata, kao i sekvence referentnih izolata vrsta *P. expansum*, *P. crustosum*, *P. solitum*, *P. marinum*, *P. discolor* i *P. echinulatum* iz NCBI GenBank baze podataka. Broj referentnih izolata zavisio je od dostupnosti sekvenci za određeni genski region, pa je u ITS filogeniju uključeno 11, u *BenA* filogeniju 20, u *CaM* 15, *RPB2* 10, *BenA-CaM-RPB2* filogeniju 10 i filogeniju zasnovanu na 4 regiona 8 referentnih izolata. Kao koren stabla u svim filogenetskim analizama korišćena je vrsta *Penicillium lanosocoeruleum* (izolat CBS 215.30). Filogenetska stabla konstruisana su pomoću dve metode: Maximum Likelihood, (ML) i Maximum Parsimony, (MP). MP stabla su dobijena upotrebom Subtree-Pruning-Regrafting (SPR) algoritma sa trećim nivoom pretrage, u kojoj su inicijalna stabla dobijena slučajnim dodavanjem sekvenci (deset ponavljanja). U ML analizama izabran je nukleotidni supstitucioni model koji je MEGA X predložila kao najoptimalniji. Za procenu statističkog značaja pretpostavljenih klada korišćena je bootstrap metoda u 1000 ponavljanja.

4.5. Morfološka karakterizacija izolata

Morfološka karakterizacija izolata obuhvatila je ispitivanje makroskopskih i mikroskopskih morfoloških odlika. Od makroskopskih odlika praćeni su izgled kolonija lica i naličja, prisustvo eksudata i porast kolonija, dok su od mikroskopskih odlika praćeni izgled konidiofora i konidija i dužina i širina konidija, fialida, metula i rama.

4.5.1. Ispitivanje makroskopskih morfoloških odlika

Izgled kolonije, boja, rub, naličje kolonije, prisustvo plodonosnih tela i prisustvo i boja eksudata posmatrane su na PDA (39 g smeše ekstrakta krompira, dekstroze i agara, 1000 ml dH₂O), sladnom agaru (Malt extract agar, MEA: 30 g ekstrakta slada 1000 ml destilovane vode), Čapekovom agaru sa kvaščevim ekstraktom (Czapeck yeast autolizate agar, CYA: 30 g saharoze, 5 g ekstrakta kvasca, 0,3 g NaNO₃, 1 g K₂HPO₄, 0,05 g MgSO₄ x 7H₂O, 0,05 g KCl, 0,001 g FeSO₄, 0,001 g ZnSO₄, 0,0005 g CuSO₄, 15 g agara, 1000 ml destilovane vode) i kvaščevom agaru (Yeast extract agar, YES: 20 g ekstrakta kvasca, 150 g saharoze, 20 g agara, 1000 ml destilovane vode) (Visagie et al., 2014). Svaki izolat je zasejan na po tri mesta na podlozi nanošenjem 1 µl suspenzije spora koncentracije 10⁶ konidija/ml, napravljene iz sedam dana starih kultura gajenih na PDA podlozi. Zasejavane su po tri podloge za svaki izolat. Nakon sedam dana inkubacije u mraku pri temperaturi 24±2°C opisane su makroskopske odlike kolonije i određen je porast kolonija izolata merenjem dva unakrsna prečnika kolonije.

4.5.2. Ispitivanje mikroskopskih morfoloških odlika

Za ispitivanje mikroskopskih odlika (izgled i tip grananja konidiofora, veličina, oblik i ornamentacija stipa, rama, metula, fialida i konidija) korišćene su kulture izolata starih 7-10 dana, odgajenih na MEA podlozi pri temperaturi $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ (Visagie et al., 2014). Nativni preparat je pripreman tako što je u kap 70% etanola sterilnom iglom prenesen fragment kolonije, a nakon što se kap osušila dodata je kap mlečne kiseline pa je prekriveno pokrovnim staklom. Mikroskopske odlike su posmatrane pod mikroskopom Carl Zeiss Axio Lab.A1, Jena, Germany. Strukture su fotografisane kamerom AxioCam ErC.5s, a za njihovo merenje je korišćen program ZEN 2 (blue edition), Carl Zeiss microscopy GmbH, Jena, Germany. Za svaki izolat mereno je po 50 konidija, fialida i metula, kao i 30 rama i određene su prosečne vrednosti.

4.6. Ispitivanje biohemijskih osobina - Ehrlich-ov test

Korišćenjem Ehrlich-ovog testa, pomoću filter papir metode (Lund, 1995), ispitivana je sposobnost izolata da proizvode ciklopiazonsku kiselinu i druge alkaloidne. Filter papir (20x20 mm) natopljen Ehrlich-ovim reagensom (2 g 4-dimetil aminobenzaldehid + 85 ml 96 % etanola + 15ml 10 NHCl) postavljen je na isečak kolonije (10 mm), stare 7 dana, odgajane na CYA podlozi pri temperaturi $24\pm 2^{\circ}\text{C}$. Reakcija je posmatrana 10 minuta. Ukoliko je došlo do pojave ljubičastog prstena nakon 2 do 6 minuta, reakcija se smatra jakom, to jest ocenjivano je da izolat intenzivno stvara ciklopiazonsku kiselinu i druge alkaloidne. Ukoliko se ljubičasti prsten pojavio nakon 7 do 10 minuta, reakcija je ocenjena kao slaba. Posmatrana je i pojava žutih, crvenih ili roze prstenova koji se mogu kod nekih izolata javiti u reakciji sa Erlihovim reagensom (Frisvad and Samson, 2004).

4.7. Ispitivanje virulentnosti dobijenih izolata

Virulentnost izolata ispitivana je veštačkim inokulacijama plodova tri sorte jabuke: Zlatni Delišeš, Crveni Delišeš i Greni Smit. Plodovi su prvo oprani deterdžentom, isprani sterilnom vodom i površinski sterilisani 70% etanolom. Za svaki izolat korišćena su dva ploda jabuke povređena na dva mesta (ubod dubine 14 mm i širine 4 mm). U povredu je uneto po 40 μl suspenzije spora iz kultura starih deset dana odgajenih na PDA. Koncentracija spora od 10^5 spora/ml određena je pomoću Bürker-Turk-ovog hemocitometra. Kontrolni plodovi su tretirani na isti način, osim što je umesto suspenzije spora gljive korišćena ista količina sterilne vode sa dodatkom Tween 20 (0,05%). Inokulisani plodovi su postavljeni u sterilisane posude sa navlaženim filter papirom, inkubirani pri temperaturi $24\pm 2^{\circ}\text{C}$. Nakon sedam i devet dana su zabeleženi simptomi i određena je veličina pege merenjem dva unakrsna prečnika.

4.8. Ispitivanje fizioloških promena u plodovima jabuke inokulisanim *P. expansum* i *P. crustosum*

Promene u sadržaju šećera (saharoze, glukoze i fruktoze), organskih kiselina (jabučne, šikiminske i askorbinske kiseline) i antioksidanata (ukupnog glutaciona i ukupnih fenola) praćene su nakon inokulacije plodova jabuke sorte Ajdared odabranim izolatima dve najznačajnije vrste roda *Penicillium*. Fiziološke promene su praćene u različitim vremenskim intervalima: šest i 24 časova posle inokulacije, kao i tri, pet, sedam i 11 dana posle inokulacije). Za ova ispitivanja korišćeni su izolati *P. expansum* i *P. crustosum* prethodno okarakterisani u ovim istraživanjima: *P. expansum* izolat JPN2 i *P. crustosum* izolat JBA11.

4.8.1. Priprema izolata *Penicillium* spp. i plodova jabuke, inokulacija i priprema uzoraka za analizu

Za inokulaciju plodova jabuke korišćena je suspenzija konidija pripremljena iz sedam dana starih kultura izolata JPN2 (*P. expansum*) i JBA11 (*P. crustosum*) odgajenih na PDA podlozi. Koncentracija suspenzije konidija 10^5 spora/ml određena je korišćenjem hemocitometra Mod–Fuchs Rosenthal.

Za ispitivanje i upoređivanje fizioloških promena u inokulisanim, povređenim i nepovređenim plodovima, korišćeni su plodovi sorte Ajdared koji su uzgajani tokom 2016. godine u konvencionalnom voćnjaku u Pivoli, posedu Fakulteta za poljoprivredu i biološke nauke, Univerziteta u Mariboru. Poslednji tretman pesticidima pre berbe plodova jabuke (16.08.2016) urađen je aktivnom materijom kaptan (Scab 80 WG, “Sharda Cropchem”, Indija), nakon čega su plodovi čuvani mesec dana do dva meseca u skladištu pri temperaturi od 1 do 2°C do početka eksperimenta. Plodovi jabuke koji su čuvani u skladištu u trajanju od mesec dana zaraženi su izolatom JBA11 (*P. crustosum*), dok su plodovi jabuke koje su čuvane u skladištu dva meseca zaražene izolatom JPN2 (*P. expansum*). Veštačke inokulacije obavljene su po metodi opisanoj kod ispitivanja virulentnosti izolata, povređeni plodovi su tretirani kao kontrola u eksperimentu ispitivanja virulentnosti. Inokulisani i kontrolni plodovi (povređeni i nepovređeni) čuvani su u sterilisanim posudama sa navlaženim filter papirom i inkubirani pri temperaturi $20 \pm 3^\circ\text{C}$.

Fiziološke promene u inokulisanim, povređenim i nepovređenim plodovima praćene su 6 h, 24 h, kao i 3, 5, 7 i 11 dana od inokulacije, a veličina pega je određena merenjem dva unakrsna prečnika. Za svaki termin su korišćene dve inokulisane, dve povređene (M-mock) i dve nepovređene jabuke (K-kontrola), dok su u trenutku postavljanja eksperimenta uzorkovane još po dve nepovređene jabuke, što predstavlja početnu kontrolu (0 h). Sa svakog ploda jabuke uzeto je ukupno 8 fragmenta (dužine 65 mm i prečnika 11 mm) na udaljenosti 5 mm od zaraženog dela ploda, odnosno povrede ili sredine nepovređenog ploda jabuke. Kako bi se smanjila moguća varijacija u koncentraciji metabolita među plodovima, od ukupno 8 uzetih fragmenata, 4 su uzeta iz zrelijeg dela ploda, a 4 iz zelenijeg dela ploda. Fragmenti jabuke su odmah potopljeni u tečni azot, da bi se izbegla oksidacija metabolita, nakon čega je usledila liofilizacija u trajanju od 7 dana, pri temperaturi od -52°C .

4.8.2. Biohemijske analize

Za potrebe analize korišćen je liofiliziran, samleven uzorak, iz koga su, u zavisnosti od metabolita koji se ekstrahuje, korišćene odgovarajuće metode ekstrakcije. Određivanje koncentracije šećera, organskih kiselina, ukupnog askorbata i glutaciona u uzorcima obavljeno je pomoću tečne hromatografije visoke performanse (HPLC): Waters Alliance 2695 HPLC system, sa različitim detektorima u zavisnosti od prirode analita [Waters 410 Differential refraktometar (RI), fotodiodni Waters 996 PDA detektor i Waters 2475 multifluorescentni detektor (FLD)], dok je koncentracija ukupnih fenola utvrđena pomoću spektrofotometra. Pre svake analize pripremljen uzorak je prethodno prečišćen korišćenjem filtera sa veličinom pora od $0,45\ \mu\text{m}$ (Chromafil RC45/25, Macherey-Nagel; Düren, Nemačka). Detektori u HPLC metodi izlazak svake komponente iz kolone registrovali su kao pik, a na osnovu njegovog retencionog vremena utvrđeno je koja je komponenta u pitanju. Utvrđeno je retenciono vreme (vreme zadržavanja analita u koloni) kao karakteristika komponente na specifičnoj koloni pod tačno određenim eksperimentalnim uslovima, dok je na osnovu površine pika određena koncentracija ispitivane komponente (analita) u uzorku.

Identifikacija i izračunavanje koncentracije analita u uzorku izvršeno je metodom spoljašnjeg standarda. Za svaki pojedinačni standard pripremljen je osnovni rastvor standarda, a od njega su dalje pripremljeni radni i serija kalibracionih rastvora. Na osnovu vrednosti masenih koncentracija standarda i površine pikova izračunata je regresiona jednačina, ispitana njena linearnost i formirana je kalibraciona kriva. Dobijena jednačina linearne zavisnosti predstavljala je relaciju između signala na detektoru (površina pika) i koncentracije analita, te je na osnovu unetih vrednosti površine pika ispitivanog analita preračunavana njegova koncentracija u uzorku. Standardi za svaku komponentu

su analizirani svakog dana, pre analize uzoraka.

Ekstrakcija i određivanje koncentracije šećera (glukoze, fruktoze i saharoze).

Ekstrakcija šećera obavljena je po metodi **Mikulič-Petkovšek et al. (2012)**: 60 mg samlevenog uzorka dodato je u epruvetu sa 4 ml vode i homogenizovano nekoliko sekundi pomoću aparata Ultraturex. Nakon toga su epruvete prenete na tresilicu 30 minuta, centrifugirane 15 minuta pri 2500 rpm pri temperaturi od 4°C. Dobijeni supernatant u zapremini od 1,5 ml je ponovno centrifugiran u trajanju od 45 minuta pri 12.500 rpm pri temperaturi od 4°C, a novodobijeni supernatant je prebačen u vijale, čiji je sadržaj analiziran izokratski pomoću Waters 2695 HPLC sistema uz korišćenje kolone Rezex RCM–Monosaccharide Ca+2 (300 x 7,8 mm) (Phenomenex, USA). Injektirano je 20 µl rastvora, a za razdvajanje komponenata u smeši korišćenja je bidestilovana voda, kao mobilna faza, sa protokom od 0,4 ml/min. Temperatura kolone postavljena je na 65°C, dok je temperatura autosemplera bila 8°C. Ukupno vreme trajanja analize jednog uzorka iznosilo je 30 min. Detekcija je vršena pomoću refraktometra Waters 410 (RI-Refracting Index detector) pri talasnoj dužini od 410 nm. Za pripremu različitih koncentracija standarda za konstruisanje kalibracione krive korišćeni su saharoza (M=342,3 g/mol, Supelco, SAD), glukoza (M=180,16 g/mol, Supelco, SAD) i fruktoza (M=180,16 g/mol, Supelco, SAD). Retenciono vreme za fruktozu, glukozu i saharozu je bilo redom: 8,62 min, 9,70 min i 13,22 min.

Ekstrakcija i određivanje organskih kiselina (jabučne i šikiminske kiseline). Ekstrakcija organskih kiselina obavljena je po metodi **Mikulič-Petkovšek et al. (2012)**. Priprema uzoraka za biohemijsku analizu obavljena je na isti način kao kod utvrđivanja šećera. Uzorci su analizirani pomoću HPLC sistema korišćenjem kolone Aminex HPX–87H ion (300 x 7,8 mm) (Bio–Rad, USA). Injektirano je 30 µl rastvora, a za mobilnu fazu korišćen je 0,004 M rastvor sumporne kiseline u vodi, sa protokom od 0,6 ml/min. Temperatura kolone postavljena je na 45°C, dok je temperatura autosemplera bila 8°C. Detekcija organskih kiselina je vršena pomoću fotodiodnog (PDA-Photodiode Array Detector) detektora Waters 996 pri talasnoj dužini od 210 nm. Ukupno vreme trajanja analize 1 uzorka iznosilo je 27 min. Za pripremu različitih koncentracija standarda za konstruisanje kalibracione krive korišćeni su jabučna kiselina (M=134,09 g/mol Supelco, SAD), šikiminska kiselina (M=174,15 g/mol, Supelco, SAD). Retenciono vreme za jabučnu kiselinu bilo je 9,7 minuta, a za šikiminsku kiselinu 12,1 minut.

Ekstrakcija i određivanje koncentracije ukupnog glutaciona. Ekstrakcija ukupnog glutaciona je urađena po metodi **Tausz et al. (2003)**. U epruvetu je najpre dodato 60 mg polivinilpirolidona (PVP, Sigma–Aldrich, SAD), pa sipano 2 ml 0,1 M rastva hlorovodonične kiseline (Fluka) i ostavljeno u frižideru u toku noći da PVP nabubri. Sutradan je u epruvetu dodato 150 mg samlevenog uzorka, homogenizovano pomoću Ultratureksa i centrifugirano 15 minuta pri 2800 rpm pri temperaturi od 4°C. PVP se dodaje u cilju otklanjanja viška fenola, koji mogu da remete tok reakcije. Nakon centrifugiranja uzeto je 280 µl novonastalog supernatanta i pomešano je sa 420 µl CHES pufera (300 mM cikloheksilamino etansulfonska kiselina, pH 9,0, Sigma–Aldrich, SAD) i dodato je 70 µl 5 mM rastvora ditiotreitola (DTT, Fluka). Nakon inkubacije od 1 h na sobnoj temperaturi, dodato je 50 µl 8 mM rastvora monobromobimane (mBBr, Sigma–Aldrich, SAD) i inkubirano u mraku 15 minuta na sobnoj temperaturi, kako bi se obeležile sulfhidrilne grupe. Derivatizacija je zaustavljena dodavanjem 600 µl 0,25% (v/v) metansulfonske kiseline (Merk, Germany), nakon čega su uzorci centrifugirani u trajanju od 45 min pri 14.000 rpm pri temperaturi od 4°C. Nakon centrifugiranja, 1 ml uzorka je prebačen u vijale odakle je analiziran.

Pripremljeni uzorci su analizirani pomoću Waters 2695 HPLC sistema, korišćenjem kolone: Grace Waters Spherisorb ODS–2,5µm (250 x 4,6 mm). Injektirano je 50 µl rastvora i eluirano mobilnom fazom, pri protoku od 1ml/min, koja je sastavljena od mobilne faze A: 5% metanola i 0,25% sirćetne kiseline u vodi (pH 3,9) i mobilne faze B: rastvor 90% metanola i 0,20% sirćetne kiseline (pH 3,9) uz primenu sledećeg linearnog gradijenta: 0-20 min 90% mobilne faze A i 10% mobilne faze B; 20-30 min 85% mobilne faze A i 15% mobilne faze B; 30-35 min 5% mobilne faze A i 95% mobilne faze B; preko 35 min 90% mobilne faze A i 10% mobilne faze B. Temperatura kolone postavljena je na 25°C, dok je temperatura autosemplera bila 4°C. Ukupno vreme trajanja analize 1 uzorka iznosilo je 25 min. Detekcija ukupnog glutaciona izvršena je pomoću detektora

Waters 2475 Multi Fluorescence Detector (FLD) (ekstinkcija: 380 nm talasne dužine; emisija: 480 nm talasne dužine). Za pripremu različitih koncentracija standarda za konstruisanje kalibracione krive korišćen je redukovani glutation (GSH, M=307.3 g/mol, Sigma–Aldrich, SAD). Retenciono vreme za glutation bilo je 10,67 min.

Ekstrakcija i određivanje koncentracije ukupnog askorbata. Ekstrakcija ukupnog askorbata (tAA) obavljena je po metodi **Tausz et al. (2003)**. Pre početka ekstrakcije u epruvetu je dodato 60 mg PVP-a i 3 ml rastvora 3% metafosforne kiseline (Sigma–Aldrich, SAD) i ostavljeno tokom noći da PVP nabubri. Nakon 24 h u epruvetu dodato 80 mg samlevenog uzorka, homogenizovano pomoću Ultratureksa i centrifugirano 15 min pri 2800 rpm pri temperaturi od 4°C. Nakon centrifugiranja 600 µl supernatanta je prebačeno u mikrotube i dodato 280 µl 0,4 M Tris pufera [tris (hidroksimetil) aminometan, Sigma–Aldrich, SAD] i 50 µl 0,26 M rastvora DTT. Nakon inkubacije od 10 min na sobnoj temperaturi u mraku, reakcija je zaustavljena dodavanjem 100 µl 8,5% fosforne kiseline (Sigma–Aldrich, SAD). Uzorci su na kraju centrifugirani 45 minuta pri 14.000 rpm pri temperaturi od 4°C.

Pripremljeni uzorci su analizirani pomoću Waters 2695 HPLC sistema uz korišćenje kolone: Synergy 4 µm Hydro–RP 80 A (150 x 4,60 mm) (Phenomenex, USA). Injektirano 50 µl ispitivanog rastvora i eluirano mobilnom fazom, koja se sastojala od 50 mM rastvora natrijumhidrogenfosfata (NaH₂PO₄) u vodi, sa protokom od 0,5 ml/min. Kolona nije bila zagrevana, a temperatura autosamplera je bila 4°C. Ukupno vreme trajanja analize 1 uzorka iznosilo je 20 min. Za detekciju askorbinske kiseline korišćen je PDA detektor Waters 996, koji je koristio talasnu dužinu od 245 nm. Za pripremu različitih koncentracija standarda, neophodnih za konstruisanje kalibracione krive, korišćena je askorbinska kiselina (M=176.13 g/mol, Sigma–Aldrich, SAD). Retenciono vreme za askorbat je 4,31 min.

Ekstrakcija i određivanje koncentracije ukupnih fenola. Ekstrakcija ukupnih fenola urađena je po metodi **Ainsworth and Gillespie (2007)**. Metoda se zasniva na prenosu elektrona sa fenolnih jedinjenja na kompleks fosfomolibdensko-fosfovolframskog reagensa (Folin-Ciocalteu (F–C) reagensa). Na osnovu intenziteta reakcije u kojoj nastaje kompleksno jedinjenje plave boje, određivana je koncentracija fenola. U epruvetu sa 1,5 ml 95% metanola (Sigma–Aldrich, SAD) dodato je 40 mg samlevenog uzorka i homogenizovano u ultrazvučnoj kadici 5 minuta pri 30 Hz. Potom su uzorci stresani u tami u trajanju od 30 minuta uz prisustvo leda i centrifugirani pri 14000 rpm u trajanju od 15 min na 4°C. Posle centrifugiranja, izdvojeno je 200 µl supernatanta i pomešano sa 100 µl 10% F–C reagensa (Merck, Germany). Nakon tačno 3 minuta dodato je 800 µl 700 mM natrijumkarbonata (Sigma–Aldrich, SAD) kako bi se zaustavila reakcija. Sadržaj je pomešan i inkubiran u trajanju od 2h na sobnoj temperaturi u mraku, nakon čega je analiziran na spektrofotometru pri talasnoj dužini od 765 nm.

U ispitivanju je uz pripremu uzoraka pripremljena je i slepa proba (bez uzorka) kako bi se pravilno očitali rezultati i niz koncentracija standarda (2,5–50 mM galna kiselina u 95% metanolu (Sigma–Aldrich, SAD)). Na osnovu merenja absorbancije različitih koncentracija galne kiseline izračunata je regresiona jednačina i konstruisana kalibraciona kriva, na osnovu koje su preračunate vrednosti ukupnih fenola u uzorku.

4.9. Statistička analiza podataka

Statistička analiza podataka rađena je u program IBM SPSS 22 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Normalna raspodela dobijenih podataka je proverena pomoću Shapiro–Wilk i Kolmogorov–Smirnov testa, a homogenost varijansi pomoću Levene-ovog testa. Analiza dobijenih podataka urađena je uz pomoć parametarskih testova. Iako je u pojedinim podacima primećena narušenost normalne raspodela ili homogenosti varijanse, odabrani su parametarski testovi, jer su moćniji od neparametarskih testova, a mogu se primeniti kada imamo veliki broj uzoraka (n>30), koristeći niži nivo značajnosti od $\alpha=0,01$, kako bi se smanjila mogućnost nastanka greške (**Stevens, 1996; Tabachnick and Fidell, 2007**). Dvofaktorska analiza varijanse korišćena je za utvrđivanje uticaja faktora (vrsta i podloga) na veličinu kolonije, kao i uticaj faktora (vrsta i sorta) na veličinu

pege na zaraženim plodovima jabuke. Jednofaktorska analiza varijanse sa post hoc Tukey HSD je korišćena da bi se utvrdilo postoji li razlika u veličini kolonije među izolatima ili vrstama na istoj podlozi, da li se određena podloga izdvaja kao pogodnija za porast izolata i da li postoji razlika u veličini konidija i delova konidiofora (fijalide, metule i rame) između izolata ili vrsta. Utvrđivanje jačine uticaja faktora na zavisnu promenljivu je vršen pomoću parcijalnog eta kvadrata (η^2). Ove statističke analize rađene su u programu IBM SPSS 22 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Utvrđivanje značajnosti fizioloških promena u zaraženim i povređenim plodovima jabuka utvrđena je poređenjem medijana (Me) metabolita zaraženih i povređenih plodova sa kontrolnim (nepovređenim) plodovima u okviru svakog termina, kao i poređenjem sa početnom kontrolom pomoću Man Whitney U testa i Bonferonijeve korekcije ($\alpha=0,025$ za poređenje u okviru termina i $\alpha=0,0083$ za poređenje sa početnom kontrolom). Takođe, primenom Spirmanove korelacije utvrđena je uzajamna povezanost veličine pega sa promenama u metabolitima, kao i povezanost u promenama koncentracija metabolita u određenom vremenskom intervalu, što će doprineti boljem razumevanju odgovora ploda jabuke na infekciju. Ova statistička analiza podataka je urađena na nivou značajnosti $\alpha=0,05$ i $\alpha=0,01$.

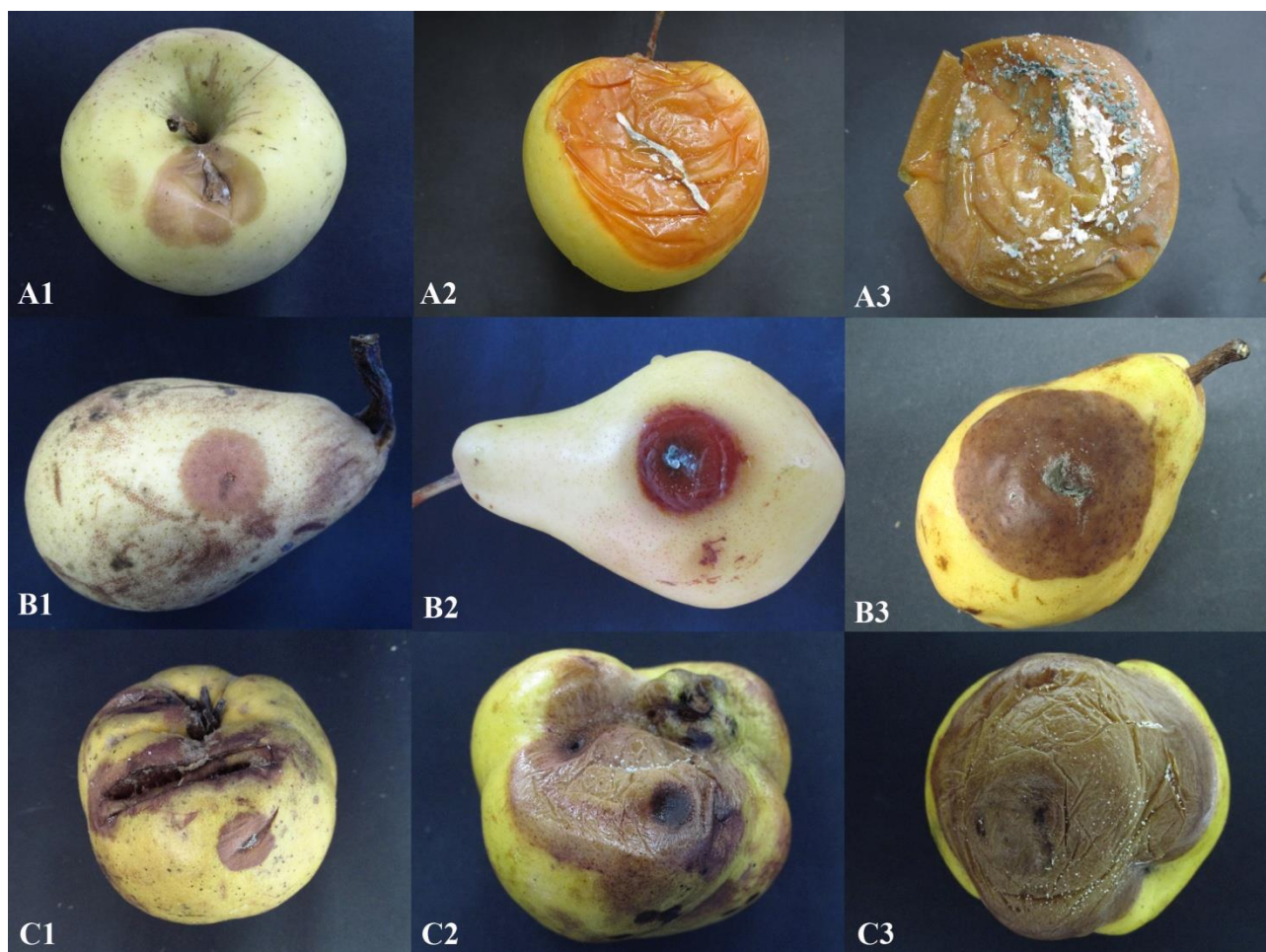
Analiza grupisanja (Klaster analiza). Hijerarhijska klaster analiza je primenjena kako bi grupisala međusobno slične izolate *P. expansum*, odnosno *P. crustosum* na osnovu odabranih morfoloških karakteristika. Podaci su prethodno standardizovani, kako bi se različite merne jedinice iz skale svele na bezdimenzionalne vrednosti koje su pogodne za dalje poređenja. Standardizacija je rađena prema sledećoj formuli: $z = (x - \mu)\sigma^{-1}$. Grupisanje je izvršeno primenom Ward-ove metode i euklidske razdaljine kao mere bliskosti između posmatranih morfoloških parametara izolata.

Analiza glavnih komponenti (Principal Component Analysis, PCA). Cilj PCA analize je da se smanji veliki broj ulaznih podataka na osnovu odabira ključnih parametara kojima se objašnjava ukupna varijansa sistema. PCA linearno kombinuje dve ili više korelisane promenljive u jednu tzv. glavnu komponentu. Ove transformacije koordinata izvode se tako da prva i druga faktorska koordinata pokriju najveći deo varijanse sistema. Na ovaj način se prepoznaju sličnosti i odnos između velikog broja podataka i predviđaju i objašnjavaju mogući ishodi posmatranog procesa (Thielemans and Massart, 1985; Jolliffe, 2002). Pre početka PCA analize urađena je standardizacija podataka, kako bi se različite merne jedinice iz skale svele na bezdimenzionalne vrednosti, koje su pogodne za dalje poređenja. Standardizacija je rađena prema sledećoj formuli: $z = (x - \mu)\sigma^{-1}$. Rezultati PCA analize su tumačeni na osnovu doprinosa (engl. score) promenljivih u komponentama, a vizuelizacija je predstavljena preko PCA grafika (biplot). PCA analiza je rađena u programu PAST 3.17 software (Hammer and Harper, 2001).

5. REZULTATI

5.1. Plava trulež na prikupljenim plodovima jabučastog voća

Na sakupljenim plodovima jabuke, kruške, dunje i mušmule uočavali su se tipični simptomi plave truleži. Promene su se ispoljavale u vidu svetlosmeđih do smeđih, ugnutih pega i zona sa razmekšalim i vodenastim tkivom. Simptomi truleži na plodovima su varirali od sitnih svetlosmeđih pega i zona do potpune zahvaćenosti ploda (Slika 3 i 4). Na zaraženim plodovima uočavala se plavozelena sporulacija (Slika 3) različitog intenziteta: od obilne sporulacije na i oko mesta povrede (Slika 5A), preko formiranja pojedinačnih gromuljica spora (Slika 5B) do grupisanja gromuljica i obrazovanja koremija na površini ploda (Slika 5C). Granica između zdravog i obolelog tkiva je bila jasno izražena i trulo tkivo se lako moglo odvojiti od okolnog zdravog tkiva. Zaraženi plodovi su imali karakterističan miris.



Slika 3. Plava trulež na prikupljenim plodovima jabuke (A1 - A3), kruške (B1 - B3) i dunje (C1 - C3).



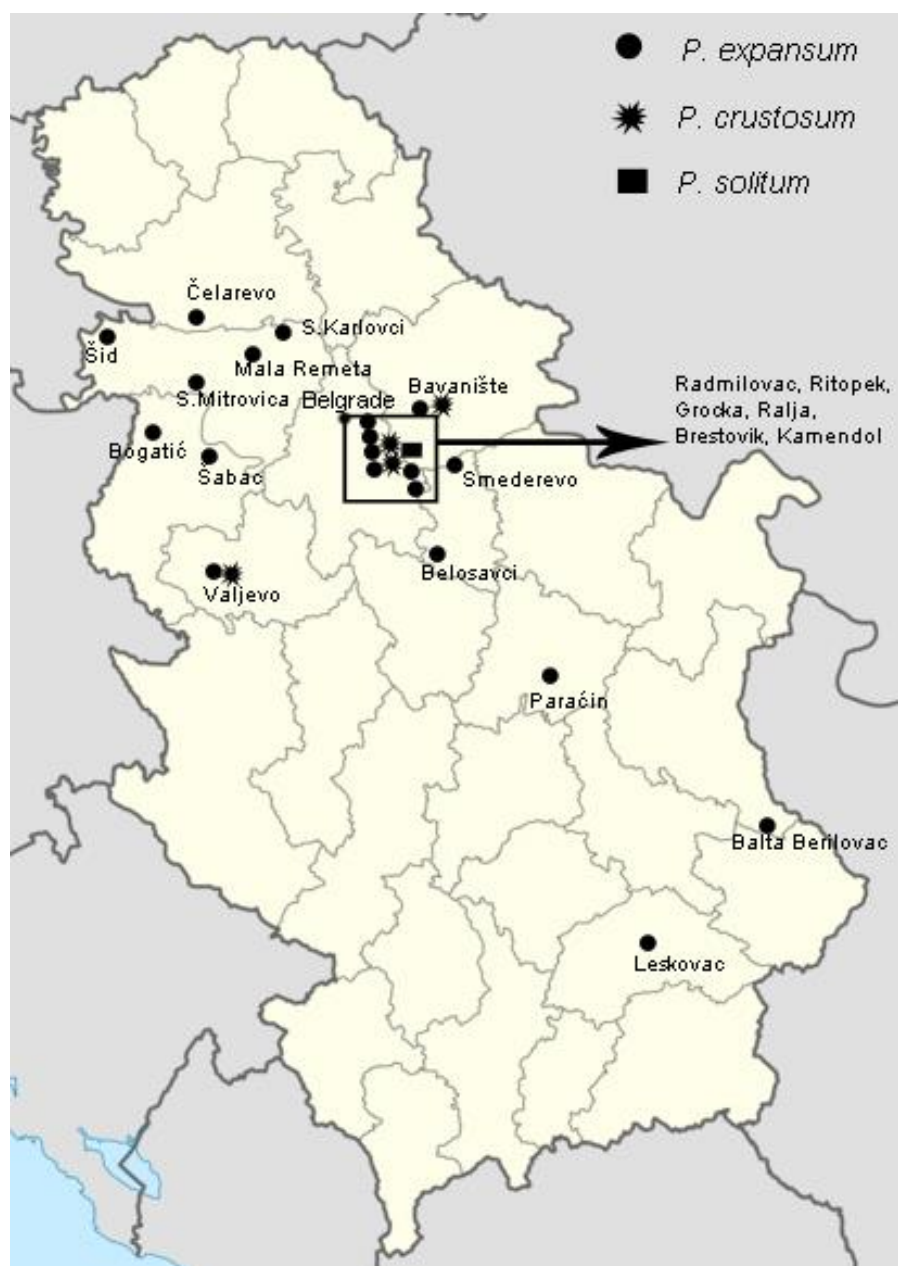
Slika 4. Zaraženi plodovi jabuke u hladenom skladištu.



Slika 5. Sporulacija na zaraženim plodovima jabuke (A), kruške (B) i dunje (C).

5.2. Izolati *Penicillium* spp. iz zaraženih plodova jabučastog voća

Iz plodova jabuke, kruške, dunje i mušmule sa simptomima plave truleži sakupljenih iz skladišta u Srbiji (Slika 6; Tabela 7) izolovane su gljive koje su po morfološkim karakteristikama odgovarale *Penicillium* spp. Iz 112 plodova dobijeno je 96 izolata i to: 71 poreklom iz plodova jabuke, 14 iz plodova kruške, 10 iz plodova dunje i jedan izolat poreklom iz ploda mušmule (Tabela 7).



Slika 6. Mapa lokaliteta iz kojih su sakupljeni uskladišteni plodovi jabučastog voća tokom 2014. i 2015. godine.

Tabela 7. Pregled lokaliteta sa kojih su prikupljeni plodovi jabučastog voća, broj plodova sa simptomima plave truleži i izolata *Penicillium* spp. dobijenih iz tih plodova.

Lokalitet	Domaćin	Sorta	Br. plodova sa simptomima plave truleži/ br. izolata
Balta Berilovac	jabuka	Jonatan	2/1
Bavanište	jabuka	Mucu, Jonagored, Zlatni Delišeš, Ajdared, Šifra	14/11
	dunja	Leskovačka	5/5
Belosavci	kruška	Kaluđerka	1/1
Brestovik	jabuka	Zlatni Delišeš, Jonagold, Mucu	18/18
Bogatić	dunja	Leskovačka	1/1
Valjevo	kruška	Kaluđerka	6/6
Grocka	jabuka	Ajdared, Budimka	2/2
	kruška	Santa Maria	2/1
Kamendol	jabuka	Zlatni Delišeš	2/2
Leskovac	jabuka	Ajdared, Jonagold	4/2
Mala Remeta	jabuka	Zlatni Delišeš, Fudži	2/3
Paraćin	jabuka	Ajdared, Zlatni Delišeš, Jonagold	6/6
	kruška	Kaluđerka	4/4
Ralja	dunja	Leskovačka	2/1
Radmilovac	jabuka	Gloster	9/9
	kruška	Vilijamovka	1/1
Ritopek	dunja	Leskovačka	3/3
	mušmula	ND	7/1
Smederevo	jabuka	Gloster, Crveni Delišeš	5/5
Sremska Mitrovica	jabuka	Jonagored	1/1
Sremski Karlovci	jabuka	Greni Smit	3/2
Čelarevo	jabuka	Breburn, Greni Smit, Modi	8/7
Šabac	kruška	Krasanka	1/1
Šid	jabuka	Crveni Delišeš	3/2
ukupno			112/96
jabuka			79/71
kruška			15/14
dunja			11/10
mušmula			7/1

5.3. Patogenost dobijenih izolata *Penicillium* spp.

Patogenost svih 96 izolata *Penicillium* spp. iz plodova jabučastog voća potvrđena je na plodovima jabuke sorte Ajdared. Patogenost pet odabranih izolata poreklom iz kruške, četiri iz dunje i jednog iz mušmule potvrđena je i na domaćinu iz koga su izolovani. Na svim inokulisanim plodovima nakon sedam dana inkubacije zabeležena je pojava svetlosmeđe do smeđe vodenaste truleži, sa pravilnim ili blago talasastim obodom. U većini slučajeva je uočena sporulacija izolata u vidu gromuljastih tvorevina sačinjenih od mase konidiofora sa plavozelenim konidijama. Sporulacija je najčešće zabeležena oko povrede (Slika 7: A1, C1), dok je na plodovima kruške i pojedinim plodovima jabuke zabeležena obilna sporulacija na pokožici zaraženog dela ploda (Slika 7: A2, C2, C3, C4). Simptomi i znaci prisustva patogena na inokulisanim plodovima su odgovarali simptomima i znacima prisustva gljiva uočenim na prikupljenim plodovima. Na kontrolnim plodovima nije došlo do pojave simptoma (Slika 7: D1, D2, D3 i D4).

Iz inokulisanih plodova reizolovane su gljive koje su po svojim osobinama odgovarale dobijenim izolatima čime je potvrđena patogenost i ispunjeni su Kohovi postulati. Nakon reizolacije dobijeni su monosporijalni izolati, koji su dalje korišćeni u eksperimentima.

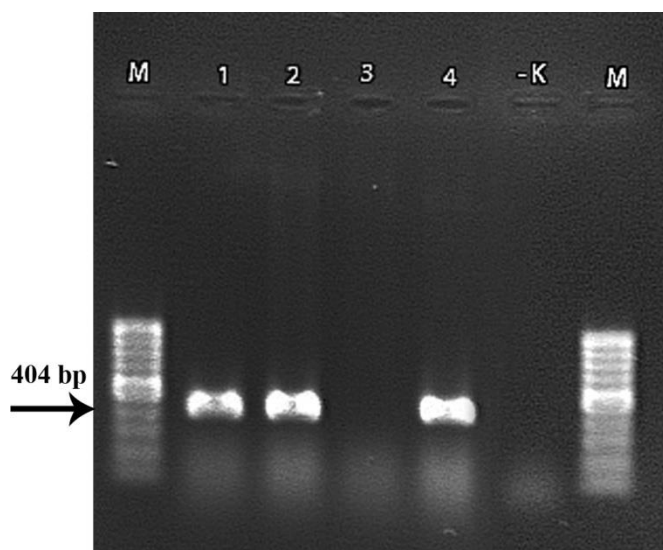


Slika 7. Plava trulež na inokulisanim plodovima jabuke (1), kruške (2), dunje (3) i mušmule (4) prouzrokovana *Penicillium* spp. (*P. expansum* – A; *P. solitum* – B; *P. crustosum* – C) i kontrola (D)

5.4. Molekularna identifikacija i karakterizacija izolata *Penicillium* spp

5.4.1. Molekularna detekcija *Penicillium expansum*

Primenom specifičnih prajmera PEF/PER za *P. expansum*, pojava amplikona očekivane veličine oko 440 bp dobijena je kod 88 ispitivanih izolata, dok kod osam izolata kao i kod negativne kontrole nije došlo do amplifikacije (Slika 8).

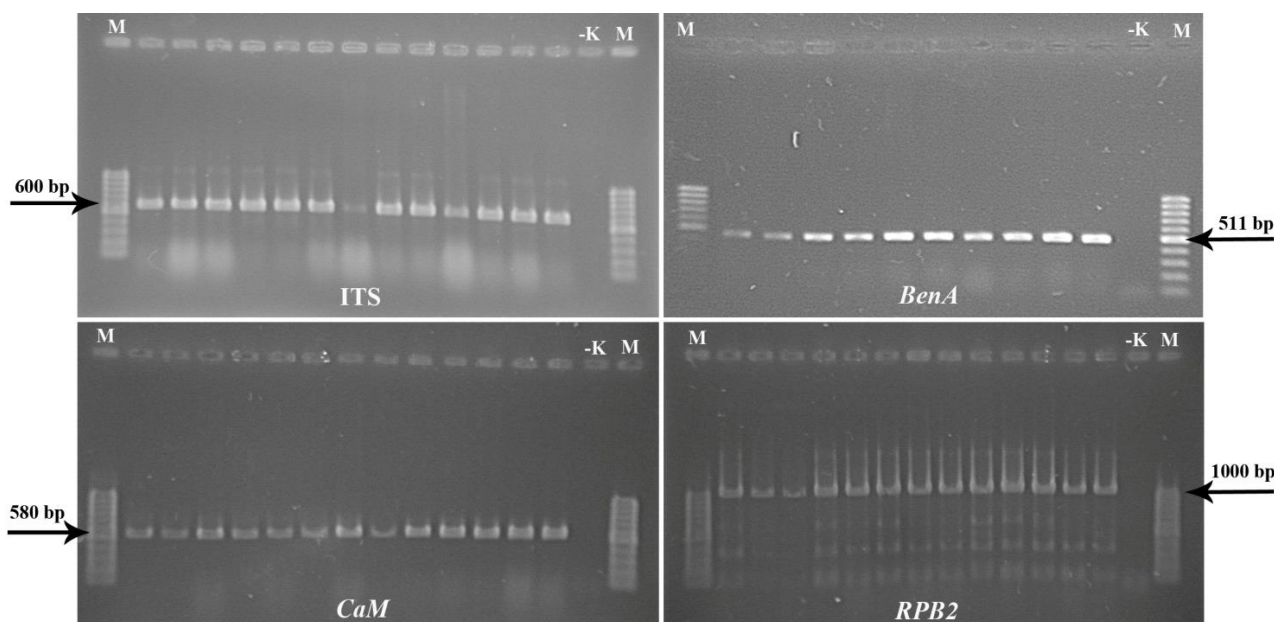


Slika 8. Elektroforetska analiza PCR produkata dobijenih korišćenjem PEF/PER para prajmera, koji umnožavaju deo gena za poligalakturonazu. Kolone: M- Marker 100 bp (MassRuler™ DNA ladder); 1, 2 i 4- *P. expansum* izolati, 3- izolat koji ne pripada vrsti *P. expansum*; -K- negativna kontrola.

Za dalju molekularnu i morfološku karakterizaciju, od ukupno 96 dobijenih izolata, odabrano je 26 izolata *Penicillium* spp. (Tabela 8) i to 18 izolata *P. expansum* i osam izolata kod kojih nije došlo do amplifikacije gena za poligalakturonazu. Odabrani *P. expansum* izolati obuhvatili su 14 izolata poreklom iz različitih lokaliteta, različitih domaćina ili sorti, kao i četiri izolata koji se izdvajaju po žutoj boji naličja kolonije na PDA podlozi.

5.4.2. Molekularna identifikacija i karakterizacija

Kod odabranih *Penicillium* spp. izolata (26 izolata) dobijeni su ampliconi očekivanih veličina od 600 bp za ITS, 511 bp za *BenA*, 580 bp za *CaM* i 1000 bp za *RPB2* (Slika 9). Kod negativne kontrole nije došlo do amplifikacije. Nakon sekvenciranja, dobijeni su konsekuensi nukleotidnih sekvenci genomnog ITS rDNK regiona dužine 559-561 nt, *BenA* genskog regiona dužine 428-432 nt, *CaM* genskog regiona dužine 501-504 nt i *RPB2* genskog regiona dužine 971 nt, koje su deponovane su u GenBank bazu podataka, gde su im dodeljeni odgovarajući pristupni brojevi (Tabela 8).



Slika 9. Elektroforetska analiza PCR produkata dobijenih korišćenjem ITS1/ITS4, Bt2a/Bt2b, CMD5/CMD6 i 5F/7CR prajmera, koji umnožavaju redom: ITSrDNK region, delove gena za β tubulin (*BenA*), kalmodulin (*CaM*) i drugu po veličini podjedinicu RNK polimeraze II (*RPB2*). Kolone: M - Marker 100 bp (MassRuler™ DNA ladder); -K- negativna kontrola. U svim bunarčićima u kojima je došlo do stvaranja amplicona (osim -K), su se nalazile nukleinske kiseline *Penicillium* spp. izolata.

MegaBlast analizom, na osnovu ispoljene sličnosti četiri genska regiona izolata iz jabučastog voća sa sekvencama istih regiona referentnih izolata odgovarajućih vrsta, 18 ispitivanih izolata je identifikovano kao *P. expansum*, sedam kao *P. crustosum* i jedan kao *P. solitum*. Na osnovu ovih analiza potvrđena je identifikacija 18 izolata *P. expansum*, koji su prethodno detektovani primenom specifičnih prajmera za ovu vrstu.

Tabela 8. Izolati *Penicillium* spp. iz Srbije i i sveta korišćeni u ispitivanjima:

Izolat	Geografsko poreklo/ Domaćin, sorta	Datum	GenBank pristupni broj				Reference
			ITS	BenA	CaM	RPB2	
<i>Penicillium expansum</i>							
JRad4	Srbija, Radmilovac/Jabuka Gloster	Decembar 2014	MZ364021	MZ364047	MZ364097	MZ364075	Žebeljan et al. 2021
3JČ6	Srbija, Čelarevo/Jabuka Breburn	Januar 2015	MZ364023	MZ364056	MZ364098	MZ364076	Žebeljan et al. 2021
3JČ11	Srbija, Čelarevo/Jabuka Greni Smit	April 2015	OK432548	MZ364048	MZ364099	MZ364077	Žebeljan et al. 2021
3JČ23	Srbija, Čelarevo/Jabuka Modi	April 2015	MZ364024	MZ364049	MZ364100	MZ364078	Žebeljan et al. 2021
3JB13	Srbija, Brestovik/Jabuka Jonagold	Januar 2015.	MZ364025	MZ364050	MZ364101	MZ364079	Žebeljan et al. 2021
3JB22	Srbija, Brestovik/Jabuka Z. Delišeš	Januar 2015	MZ364026	MZ364061	MZ364102	MZ364080	Žebeljan et al. 2021
3SD3	Srbija, Smederevo/Jabuka C. Delišeš	Januar 2015	MZ364027	MZ364051	MZ364103	MZ364081	Žebeljan et al. 2021
3SD5	Srbija, Smederevo/Jabuka C. Delišeš	Januar 2015	MZ364028	MZ364052	MZ364110	MZ364082	Žebeljan et al. 2021
3Š1	Srbija, Šid/Jabuka C. Delišeš	Januar 2015	MZ364029	MZ364057	MZ364104	MZ364083	Žebeljan et al. 2021
3MR1	Srbija, Mala Remeta/Jabuka Z. Delišeš	Januar 2015	MZ364030	MZ364053	MZ364105	MZ364084	Žebeljan et al. 2021
KŠA5	Srbija, Šabac/Kruška Krasanka	Mart 2015	MZ364031	MZ364045	MZ364111	MZ364071	Žebeljan et al. 2021
JMR2o *	Srbija, Mala Remeta/Jabuka Fudži	Novembar 2015	MZ364033	MZ364058	MZ364108	MZ364085	Žebeljan et al. 2021
JMR2ž *	Srbija, Mala Remeta/Jabuka Fudži	Novembar 2015	MZ364034	MZ364059	MZ364109	MZ364086	Žebeljan et al. 2021
JBA8b *	Srbija, Bavanište/Jabuka Jonagored	Decembar 2015	MZ364035	MZ364054	MZ364106	MZ364087	Žebeljan et al. 2021
JPN2 *	Srbija, Paraćin/Jabuka Ajdared	Decembar 2015	MZ364036	MZ364055	MZ364107	MZ364088	Žebeljan et al. 2021
KPN4 *	Srbija, Paraćin/Kruška Kaluđerka	Decembar 2015	MZ364032	MZ364046	MZ364112	MZ364072	Žebeljan et al. 2021
DBA5 *	Srbija, Bavanište/Dunja Leskovačka	Decembar 2015	MZ364022	MZ364062	MZ364114	MZ364073	Žebeljan et al. 2021
DRI4a *	Srbija, Ritopek/Dunja Leskovačka	Decembar 2015	MZ364020	MZ364060	MZ364113	MZ364074	Žebeljan et al. 2021
<i>Penicillium crustosum</i>							
JBA8a *	Srbija, Bavanište/Jabuka Jonagored	Decembar 2015	MZ364037	MZ364067	MZ389067	MZ364089	Žebeljan et al. 2021
JBA11 *	Srbija, Bavanište/Jabuka Šifra	Decembar 2015	MZ364038	MZ364068	MZ389061	MZ364090	Žebeljan et al. 2021
KGR2 *	Srbija, Grocka/Kruška Santa Maria	Octobar 2015	MZ364039	MZ364063	MZ389062	MZ364091	Žebeljan et al. 2021
KRI1P *	Srbija, Ritopek/Kruška Vilijamovka	Decembar 2015	MZ364040	MZ364064	MZ389063	MZ364092	Žebeljan et al. 2021
KVA8 *	Srbija, Valjevo/Kruška Kaluđerka	Decembar 2015	MZ364041	MZ364065	MZ389064	MZ364093	Žebeljan et al. 2021
DRI4b *	Srbija, Ritopek/Dunja Leskovačka	Decembar 2015	MZ364042	MZ364066	MZ389065	MZ364094	Žebeljan et al. 2021
MRI4 *	Srbija, Ritopek/Mušmula, lokalna sorta	Decembar 2015	MZ364043	MZ364069	MZ389066	MZ364095	Žebeljan et al. 2021
<i>Penicillium solitum</i>							
DRI3 *	Srbija, Ritopek/Dunja Leskovačka	Decembar 2015	MZ364044	MZ364070	MZ364115	MZ364096	Žebeljan et al. 2021

* Izolati korišćeni u studijama o virulentnosti

Tabela 8. Izolati *Penicillium* spp. iz Srbije i i sveta korišćeni u ispitivanjima (nastavak)

NCBI izolati							
Izolat	Geografsko poreklo/ Domaćin, sorta	Datum	GenBank pristupni broj				Reference
<i>Penicillium expansum</i>			ITS	<i>BenA</i>	<i>CaM</i>	<i>RPB2</i>	
CBS 325.48	SAD/plod jabuke		AY373912 ¹	AY674400 ²	DQ911134 ²	JF417427 ²	¹ Houbraken et al. 2020; ² Houbraken et al. 2016
F758	SAD, Ajdaho/ Šećerna repa	2014	MG714838	MG714864	MG714821	MG714845	Strausbaugh, 2018
PCAS	Italija/Kesten	2015	MG821365	MF100860	MF100880	/	Prencipe al. 2018
P34	Italija /Sušeno grožđe		/	KU554673	/	/	Lorenzini et al. 2016
4	Grčka/Plod kivija	2017	/	MH040784	/	/	Prodromou et al. 2018
CV 2860	Južna Afrika/Biom finbosa		/	JX091539	JX141580	/	Visagie et al. 2016
CV 2861	Južna Afrika/Biom finbosa		/	JX091540	JX141581	/	Visagie et al. 2016
LUB	Srbija, Ub/lukovica crnog luka	2015	/	KY770971	/	/	Duduk et al. 2017
<i>Penicillium marinum</i>							
CBS 109550 **	Japan/Peskovito zemljište		KJ834512	AY674392	KU896842	KU904357	Houbraken et al. 2020
CBS 109547	Tunis/ Peskovito zemljište		/	AY674390	/	/	Samson et al. 2004
<i>Penicillium crustosum</i>							
CBS 115503 **	Škotska, Aberdin/Plod limuna		MH862985 ₁	AY674353 ²	DQ911132 ³	MN969114 ³	¹ Vu et al. 2019; ² Samson et al. 2004; ³ Houbraken et al. 2020
CV 0241	Južna Afrika/Biom finbosa		JX091403	JX091536	JX141576	MN149972	Visagie et al. 2020
5A	Italja/Kesten	2015	MG821363	MF100874	MF100894	/	Prencipe al. 2018
N2AS	Srbija/Plod nektarine	2021	/	MT799805	/	/	Duduk et al. 2020
<i>Penicillium echinulatum</i>							
CBS 317.48 **	Kanada/iz zagađene kulture		AF033473	AY674341	DQ911133	KU904352	Houbraken et al. 2020
DTO228I4	Nepoznato/Nepoznato		/	MN149925	MN149944	MN149964	Visagie et al. 2020
<i>Penicillium solitum</i>							
CBS 424.89 **	Nemačka/ Nepoznato		AY373932 ₁	AY674354 ²	KU896851 ¹	KU904363	¹ Houbraken et al. 2020; ² [50]
XF	Italija/Kesten	2015	MG82137 ₃	MF100861	MF100881	/	Prencipe al. 2018
<i>Penicillium discolor</i>							
CBS 474.84 **	Izrael/ <i>Raphanus sativus</i>		AJ004816	AY674348	KU896834	KU904351	Houbraken et al. 2020
DTO047A2	Nepoznato/Nepoznato		/	MN149922	MN149941	MN149961	V isagie et al. 2020
<i>Penicillium lanosocoeruleum</i>							
CBS 215.30	SAD/ iz zagađene kulture		NR_16354 ₁ ¹	KU896817 ²	JX996967 ²	JX996712 ³	¹ Vu et al. 2019; ² Houbraken et al. 2020, ³ 2012

** Ex-type referentni izolati

Kod izolata *P. expansum* (ukupno 18 izolata), višestrukim poređenjem dobijenih sekvenci ITS regiona, *BenA*, *CaM* i *RPB2* gena utvrđeno je da:

- 1) Svi ispitivani izolati imaju identične ITS sekvence. Njihovim poređenjem sa sekvencama dostupnim u GenBank bazi podataka, utvrđeno je da su identične sa većim brojem sekvenci istog regiona vrste *P. expansum* kao što su AY373912 (izolat CBS 325.48), MG714838 (izolat F758) i MG821365 (izolat PCAS).
- 2) Poređenjem sekvenci *BenA* gena uočeno je da među izolatima *P. expansum* postoje dve genetičke varijante, koje se međusobno razlikuju u dva nukleotida (Tabela 9). Prva varijanta, prisutna kod 11 izolata (JRad4, 3JČ11, 3JČ23, 3JB13, 3SD3, 3SD5, 3MR1, JBA8b, JPN2, KPN4 i DRI4a) je identična sa više sekvenci istog regiona vrste *P. expansum* deponovanim u GenBank bazi podataka, među kojima su JX091539 (izolat CV 2860) i JX091540 (izolat CV 2861), dok je druga varijanta, prisutna kod sedam ispitivanih izolata (3JČ6, 3JB22, 3Š1, KŠA5, JMR2o, JMR2ž i DBA5) identična sa sekvencom MH040784 (izolat 4).
- 3) Poređenjem sekvenci *CaM* gena utvrđeno je da postoje dve genetičke varijante među izolatima *P. expansum*. Razlika između njih je u tri nukleotida. Na osnovu *CaM* gena, izolati *P. expansum* su se podelili isto kao na osnovu *BenA* gena. Prva varijanta je utvrđena kod 11 izolata, a druga kod sedam izolata (Tabela 9). Sekvence prve varijante *CaM* gena bile su identične sa sekvencama istog regiona vrste *P. expansum* deponovanim u GenBank bazi podataka DQ911134 (izolat CBS 325.48) i MG714821 (izolat F758).
- 4) Poređenjem sekvenci *RPB2* gena, u okviru izolata *P. expansum* uočena je veća genetička varijabilnost, koja se ogleda u postojanju tri genetičke varijante (tri haplotipa). Ove varijante se međusobno razlikuju u 1, 14 ili 15 nukleotida (Tabela 9). Prva genetička varijanta prisutna kod 12 izolata (JRad4, 3JČ11, 3JČ23, 3JB13, 3JB22, 3SD3, 3SD5, 3MR1, JBA8b, JPN2, KPN4 i DRI4a) je bila identična sa sekvencom istog regiona *P. expansum* JF417427 (izolat CBS 325.48) deponovanom u GenBank bazi podataka. Drugoj varijanti (haplotipu) pripadaju četiri izolata: 3JČ6, JMR2o, JMR2ž i DBA5 koji se od prve varijante razlikuju u 14 nt. Trećem haplotipu pripadaju dva izolata: 3Š1 i KŠA5, koja se od prvog haplotipa razlikuju u 1 nukleotidu, a od drugog u 15 nt.

Kod izolata *P. crustosum* (ukupno sedam izolata), višestrukim poređenjem dobijenih sekvenci ITS regiona, *BenA*, *CaM* i *RPB2* gena utvrđeno je da:

- 1) Svih sedam ispitivanih izolata *P. crustosum* imaju identične sekvence ITS regiona i *BenA* gena. Sekvence ITS regiona su identične sa više sekvenci istog regiona vrste *P. crustosum* (npr. JX091403), dok su sekvence *BenA* gena identične sa više sekvenci istog regiona *P. crustosum* (npr. JX091536).
- 2) Šest ispitivanih izolata *P. crustosum* su imali identične *CaM* sekvence, koje su identične sa više sekvenci istog regiona *P. crustosum* (npr. JX141576 i DQ911132) deponovanih u GenBank bazi podataka. *CaM* sekvenca izolata JBA8a, se razlikovala u jednom nukleotidu od ostalih šest izolata *P. crustosum* (Tabela 9).
- 3) Najveća genetička varijabilnost u okviru *P. crustosum* izolata je uočena u *RPB2* genu. Na osnovu sekvenci *RPB2* gena utvrđeno je postojanje četiri haplotipa (koji su se međusobno razlikovali u 1, 1, 1 i 2 nukleotida) (Tabela 9). Prva varijanta, prisutna kod dva ispitivana izolata (KRI1P i KVA8) je identična sa deponovanom sekvencom *P. crustosum* MN969114. Druga varijanta, prisutna kod dva izolata (JBA8a i MRI4) je identična sa sekvencom *P. crustosum* MN149972. Treća varijanta, prisutna kod dva izolata (JBA11 i KGR2) razlikovala se od prve i druge u dva nukleotida. Sekvenca izolata DRI4b koja predstavlja četvrti haplotip se razlikovala u 3, 3 i 1 nukleotidu od sekvenci izolata iz prve, druge odnosno treće varijante (Tabela 9).

Uočena genetička varijabilnost na određenim pozicijama u okviru vrste *P. expansum* u tri genska lokusa (*BenA*, *CaM* i *RPB2*) i *P. crustosum* u dva genska lokusa (*CaM* i *RPB2*), koja pokazuje

postojanje različitih haplotipova kod izolata ove dve vrste prikazana je u Tabeli 9. Kod izolata *P. expansum* u okviru sekvence *BenA*, uočene su promene na pozicijama 232 i 260. U okviru *CaM*, promene su zabeležene na pozicijama 79, 154 i 356, dok su u okviru *RPB2* sekvence uočene promene na 15 pozicija: 139, 151, 325, 340, 373, 454, 520, 760, 841, 854, 889, 943, 958, 979 i 1036. Kod izolata *P. crustosum* u okviru sekvence *CaM*, primećeno je da se jedan izolat razlikuje od svih ispitivanih i referentnih izolata u 1 nukleotidu na poziciji 337, dok na pozicijama 303 i 414 ima manjak nukleotida. U okviru sekvence *RPB2* promene su uočene na četiri pozicije: 175, 724, 940 i 979.

Na osnovu analize sekvenci sva četiri lokusa izolat DRI3 je identifikovan kao *P. solitum*. Sekvence ITS, *CaM* i *RPB2* su bile identične sa sekvencama ovih regiona *P. solitum* izolata CBS 424.89 (AY373932, KU896851 i KU904363). Dobijena *BenA* sekvenca je imala najveću sličnost sa sekvencom *P. solitum* izolata CBS 424.89 (AY674354).

Tabela 9. Genetičke varijante (haplotipovi) ispitivanih izolata *P. expansum* i *P. crustosum*.

Sekvenca	Pozicija															
<i>Penicillium expansum</i>																
<i>BenA</i>	232	260														
I varijanta	T	C														
II varijanta	G	T														
<i>CaM</i>	79	154	356													
I varijanta	T	C	A													
II varijanta	C	T	G													
<i>RPB2</i>	139	151	325	340	373	454	520	760	841	854	889	943	958	979	1036	
I varijanta	C	A	G	T	G	C	T	C	T	C	T	G	A	C	C	
II varijanta	T	G	A	C	A	T	C	T	C	C	C	A	C	T	T	
III varijanta	C	A	G	T	G	C	T	C	T	T	T	G	A	C	C	
<i>Penicillium crustosum</i>																
<i>CaM</i>	303	337	414													
I varijanta	C	A	T													
II varijanta	-	G	-													
<i>RPB2</i>	175	724	940	979												
I varijanta	T	C	A	C												
II varijanta	T	C	C	T												
III varijanta	T	T	C	C												
IV varijanta	C	T	C	C												

Molekularnom identifikacijom utvrđeno je da su prouzrokovaci plave truleži jabučastog voća u Srbiji tri vrste roda *Penicillium*: *P. expansum*, *P. crustosum* i *P. solitum*. *P. expansum* je izolovan iz plodova jabuke, kruške i dunje, *P. crustosum* iz plodova jabuke, kruške, dunje i mušmule, a *P. solitum* iz dunje. Od ukupnog broja izolata *P. expansum* je najčešće izolovan (91,67%), a zatim *P. crustosum* (7,29%), dok je zastupljenost *P. solitum* bila 1,04%.

5.4.3. Filogenetske analize

Višestrukim poravnanjem dobijene su sekvence od 561 nt za ITS, 448 nt za *BenA*, 521 nt za *CaM* i 971 nt za *RPB2* region, od kojih je za MP analizu bilo informativno 9 nt (ITS), 40 nt (*BenA*), 53 nt (*CaM*) i 90 nt (*RPB2*). Svaka MP analiza zasnovana na pojedinačnim sekvencama (single locus analiza - ITS, *BenA*, *CaM* i *RPB2*) proizvela je po 10 stabala jednake MP. Za ML analize pojedinačnih regiona korišćeni su različiti nukleotidni supstitucionni modeli: Tamura troparametarski model (T92) za ITS, Kimura dvoparametarski model (K2) za *BenA* i *CaM*, kao i Kimura dvoparametarski model sa gama distribucijom (K2+G) za *RPB2* (Slika 10). ML i MP analize istog genskog regiona proizvele su stabla sa identičnom topologijom. Poređenjem stabala zasnovanih na pojedinačnim sekvencama

specifičnih genskih regiona, najveću sličnost su pokazala filogenetska stabla zasnovana na *BenA* i *CaM*.

Spajanjem sekvenci tri genska regiona (*BenA*, *CaM* i *RPB2*) za svaki izolat dobijene su sekvence od 1928 karaktera, dok su sekvence sačinjene od četiri regiona (ITS, *BenA*, *CaM* i *RPB2*) sadržale 2498 karaktera. Analizom spojenih sekvenci (multilokus analiza) tri, odnosno četiri regiona DNK ispitivanih izolata utvrđeno je 176, odnosno 169 karaktera informativnih za MP analizu. MP analiza proizvela je 10 stabala jednake MP. Filogenetska stabla zasnovana na sekvencama tri, odnosno četiri regiona konstruisana pomoću ML metode, upotrebom K2+G modela, imala su istu topologiju kao i filogenetska stabla konstruisana MP metodom i njihova topologija je odgovarala filogenetskom stablu zasnovanom na *RPB2* regionu. Filogenetska stabla zasnovana na pojedinačnim sekvencama prikazana su na Slici 10, dok su filogenetska stabla zasnovana na spojenim sekvencama tri, odnosno četiri regiona prikazana na Slikama 11 i 12.

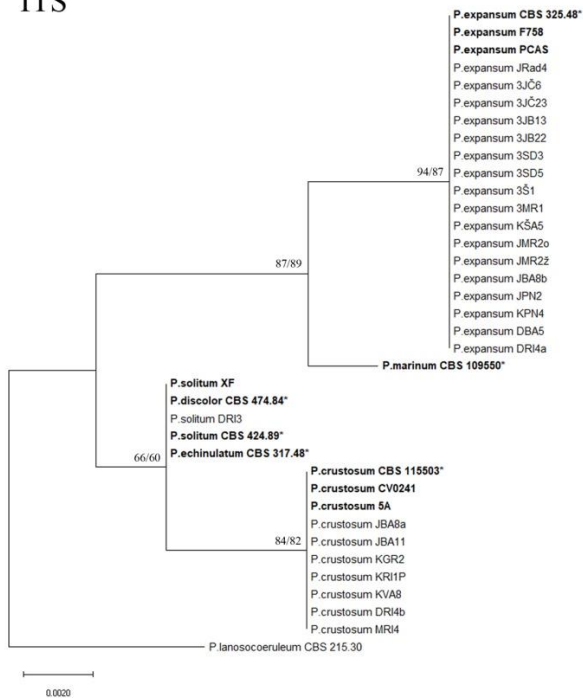
Sve filogenetske analize, kako pojedinačnih, tako i spojenih sekvenci više genskih regiona (multilokus) jasno su razdvojile vrste *P. expansum* i *P. crustosum* u dve klade sa visokom bootstrap podrškom. Identifikacija izolata *Penicillium* spp. iz jabučastog voća potvrđena je njihovim grupisanjem u kladu sa referentnim izolatima odgovarajuće vrste poreklom iz različitih zemalja (Slike 10-12). Na osnovu sekvenci ITS regiona nije uočena varijabilnost između izolata iste vrste.

Kod izolata *P. expansum* uočeno je dobro podržano razdvajanje u dve grupe u filogenetskim stablima zasnovanim na analizi *BenA* i *CaM*. Takođe, razdvajanje izolata *P. expansum* u dve grupe potvrđeno je i filogenetskom analizom sekvenci *RPB2*, kao i multilokus filogenetskim analizama, sa izuzetkom premeštanja tri izolata (3JB22, 3Š1 i KŠA5) iz druge grupe u prvu.

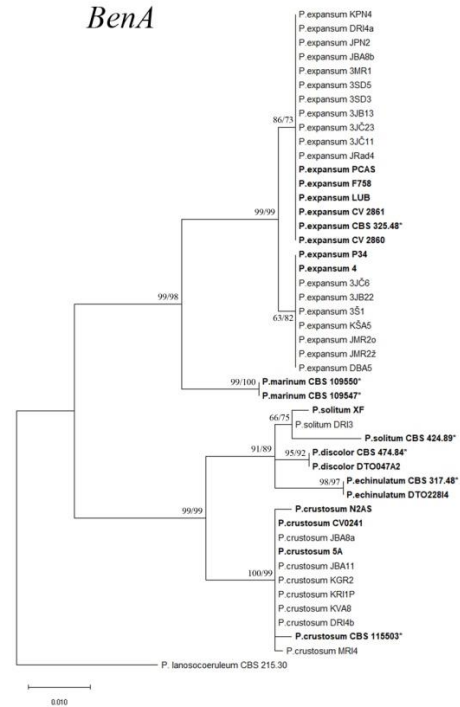
Izolati *P. crustosum* grupisali su se u jednu kladu na osnovu ITS, *BenA* i *CaM* genskih regiona i nije zapažena varijabilnost na osnovu filogenetskih analiza pojedinačnih sekvenci ovih regiona. Međutim, filogenetske analize zasnovane na *RPB2* regionu, kao i analize zasnovane na spojenim sekvencama tri ili četiri regiona razdvojile su izolate *P. crustosum* u tri klade (> 60% bootstrap podrška u ML).

Izolat *P. solitum* se grupisao sa referentnim izolatima *P. solitum* na osnovu svih sprovedenih filogenetskih analiza. Iako filogenetska analiza zasnovana na sekvencama ITS regiona nije pokazala razdvajanje *P. solitum* od srodnih *Penicillium* vrsta (*P. discolor* i *P. echinulatum*), jasno razdvajanje je uočeno filogenijom zasnovana na spojenim sekvencama tri i četiri lokusa (100% bootstrap podrške), kao i *RPB2* filogenijom (99% bootstrap podrške).

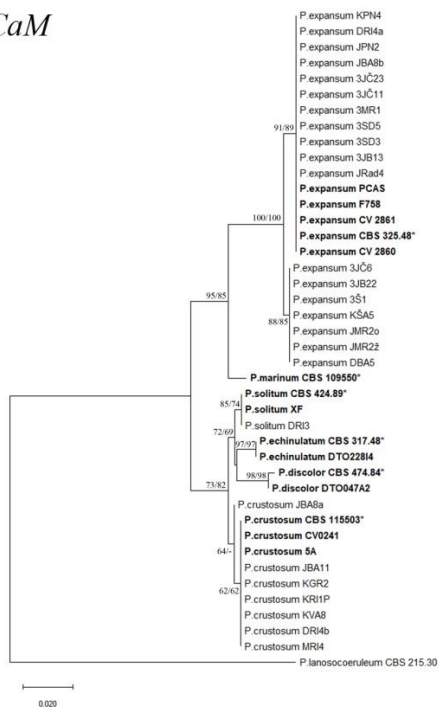
ITS



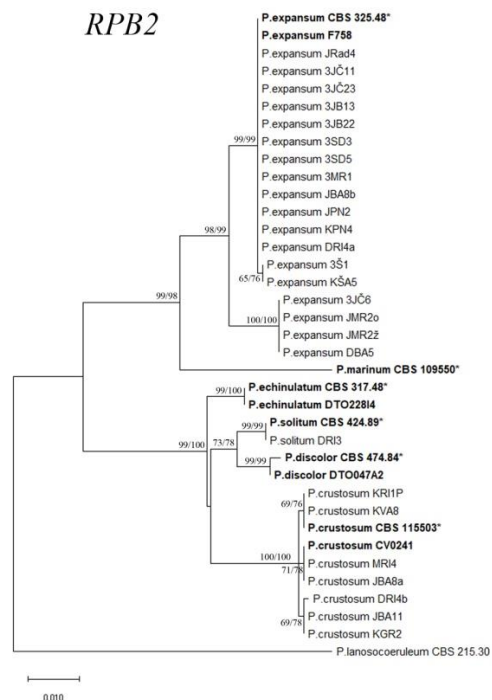
BenA



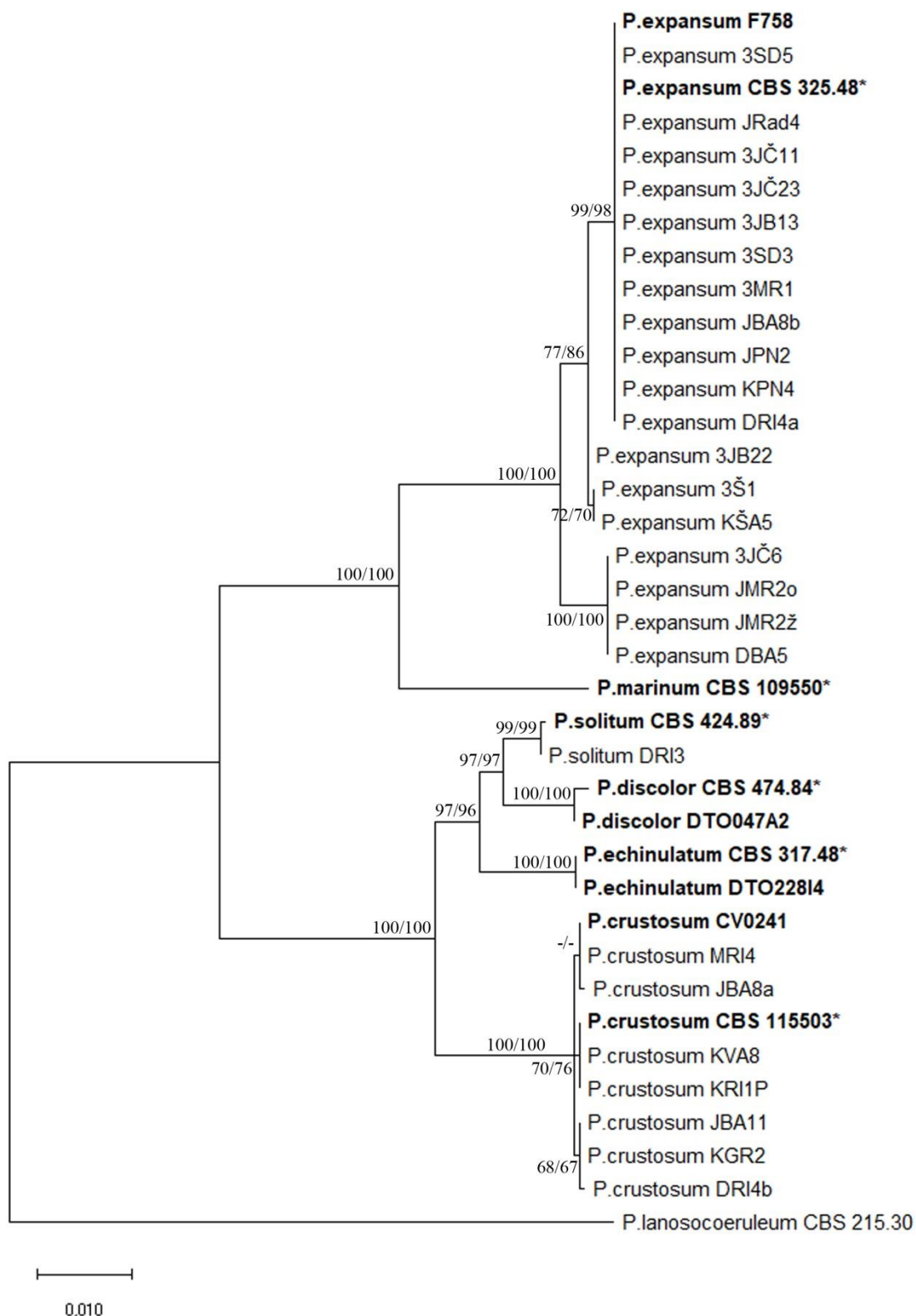
CaM



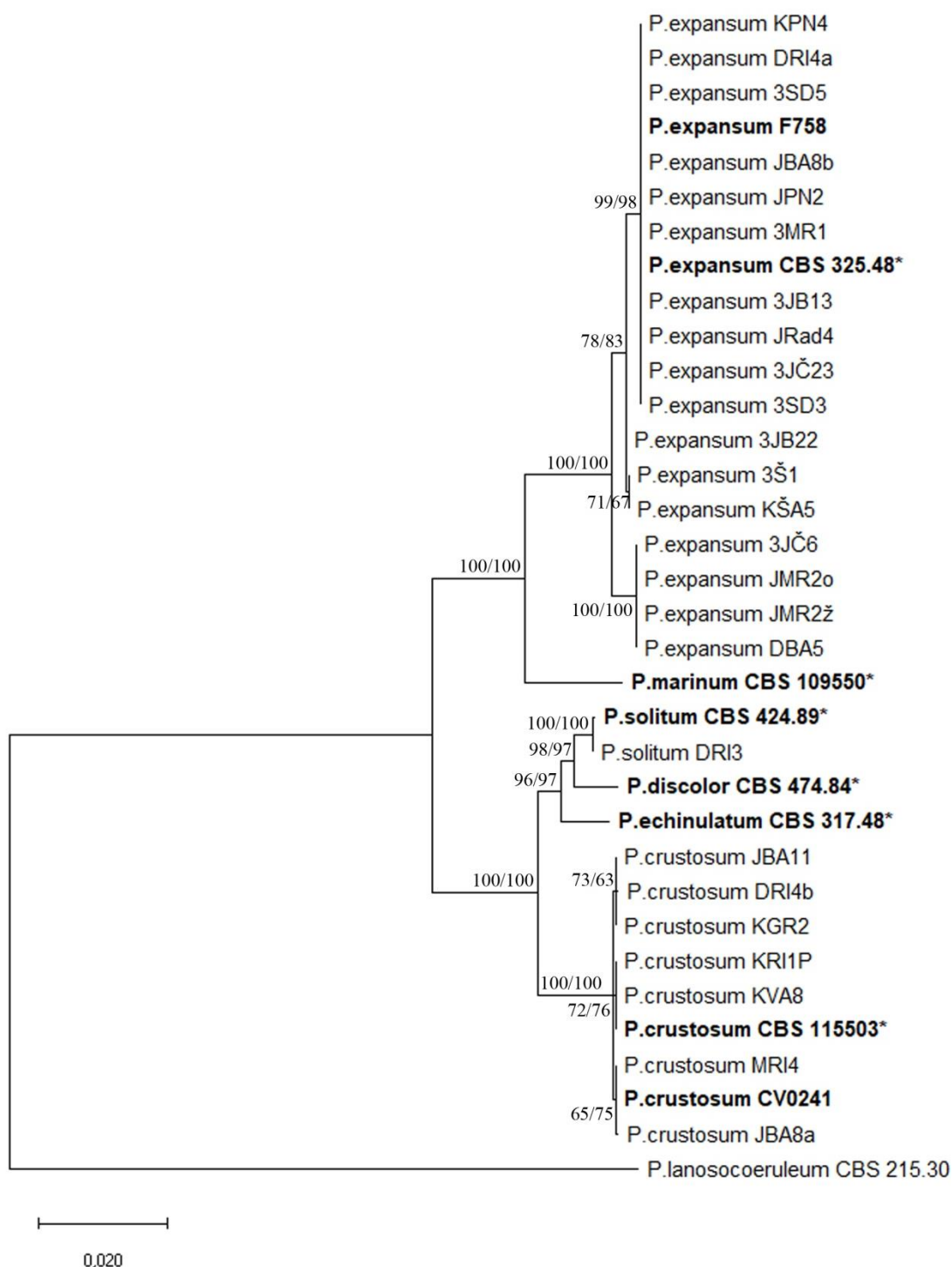
RPB2



Slika 10. Filogenetska stabla zasnovana na pojedinačnim sekvencama ITS rDNK regiona, delova gena za β tubulin (*BenA*), kalmodulin (*CaM*) i gena za drugu najveću podjedinicu RNK polimeraze (*RPB2*), dobijeno metodama Maximum Likelihood (ML) i Maximum Parsimony (MP) sa bootstrap analizom u 1000 ponavljanja (bootstrap vrednosti veće od 60 prikazane su iznad i ispod grana). Kao autgrupa je korišćen izolat *Penicillium lanosocoeruleum* CBS 215.30.



Slika 11. Filogenetsko stablo zasnovano na spojenim sekvencama tri genska regiona (*BenA*, *CaM* i *RPB2*) dobijeno metodama Maximum Likelihood (ML) i Maximum Parsimony (MP) sa bootstrap analizom u 1000 ponavljanja (bootstrap vrednosti veće od 60 prikazane su iznad i ispod grana). Kao autgrupa je korišćen izolat *Penicillium lanosocoeruleum* CBS 215.30.



Slika 12. Filogenetsko stablo zasnovano na spojenim sekvencama četiri regiona DNK (ITS rDNK region, *BenA*, *CaM* i *RPB2*) dobijeno metodama Maximum Likelihood (ML) i Maximum Parsimony (MP) sa bootstrap analizom u 1000 ponavljanja (bootstrap vrednosti veće od 60 prikazane su iznad i ispod grana). Kao autgrupa je korišćen izolat *Penicillium lanosocoeruleum* CBS 215.30.

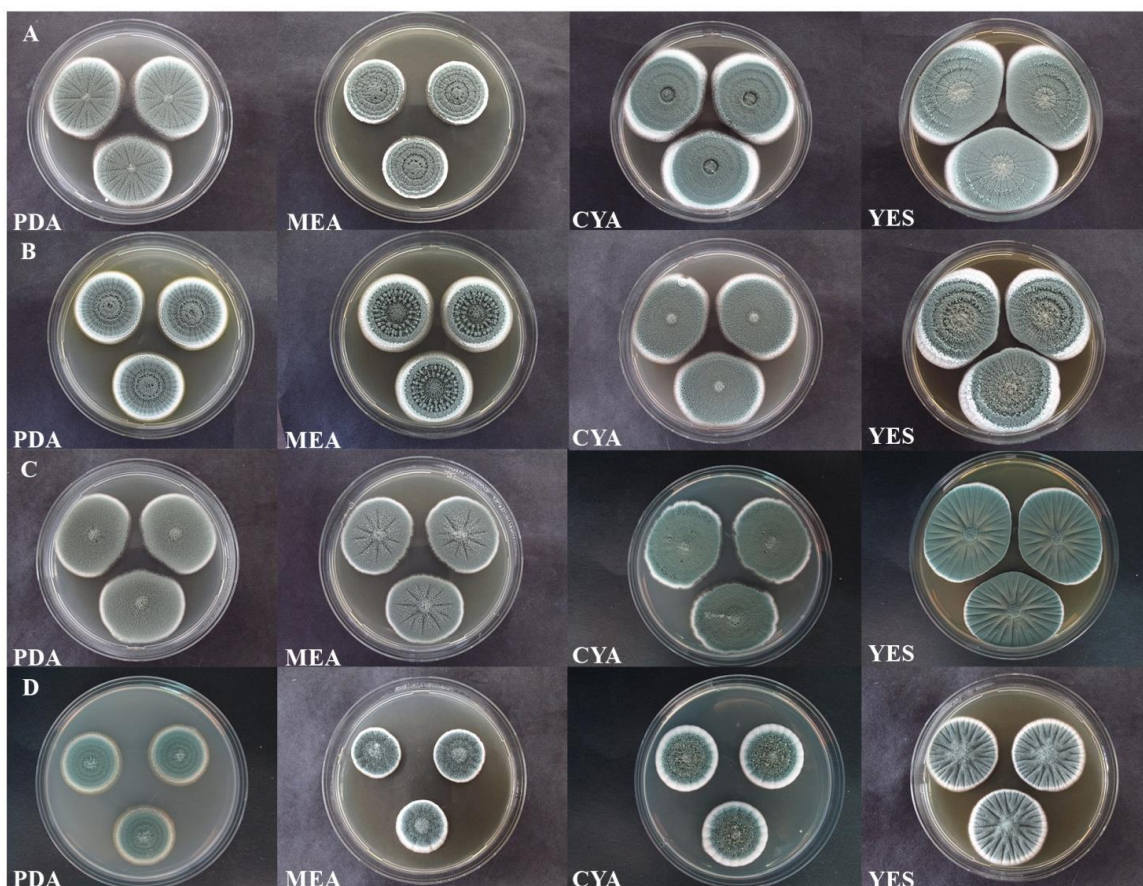
5.5. Morfološka karakterizacija izolata *Penicillium* spp.

5.5.1. Makroskopske odlike *Penicillium* spp.

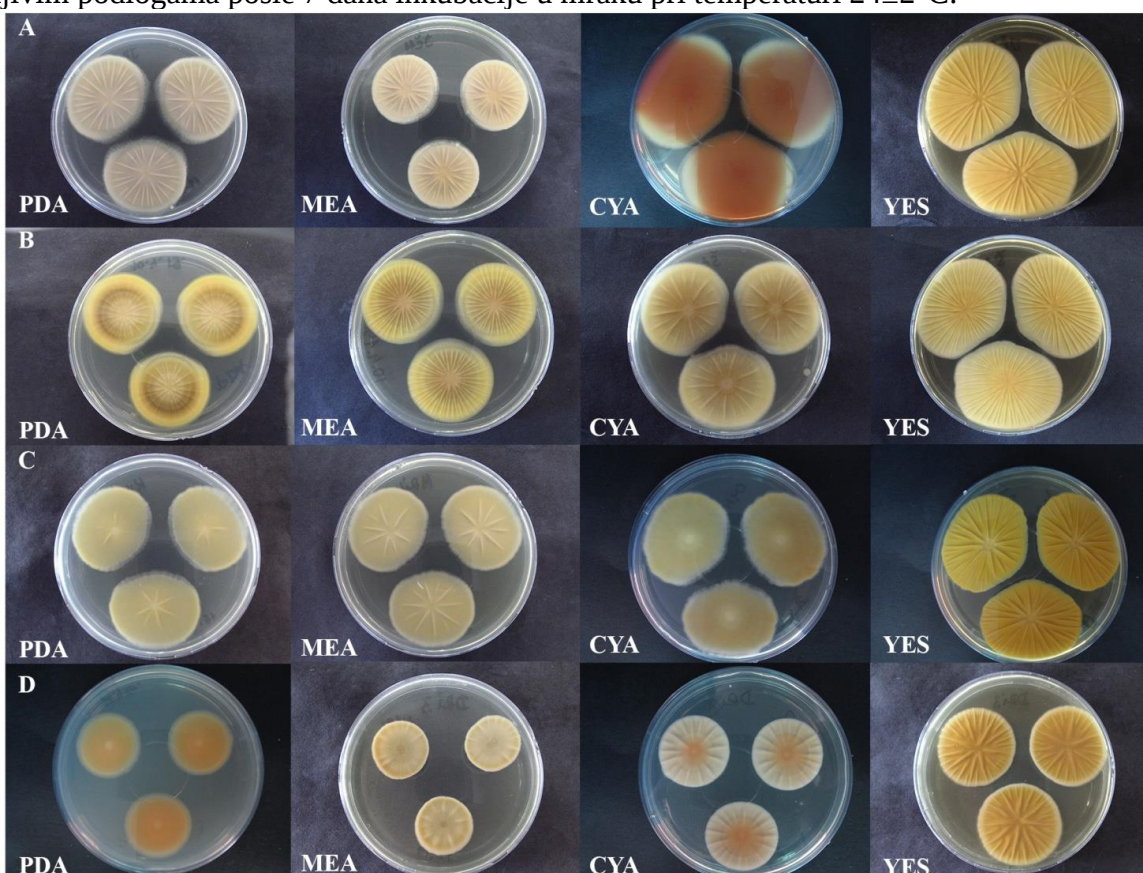
Izgled kolonija. Ispitivani izolati *P. expansum*, *P. crustosum* i *P. solitum* su na PDA, MEA, CYA i YES podlogama formirali kolonije bele boje (boja micelije) koja nakon sporulacije postaje plavozelena. Izgled lica i naličja kolonija nakon sedam dana inkubacije na različitim hranljivim podlogama prikazana je na Slikama 13 i 14.

Izolati *P. expansum* (18 izolata) su na PDA podlozi obrazovali plavozelene, najčešće gromuljičaste kolonije (izuzetak su izolat JBA8b sa somotastim i izolat JMR2o sa somotastim do gromuljičastim kolonijama), radijalno naborane sa ili bez koncentrične zoniranosti. Kolonije su imale ravan beli rub i eksudat nije bio prisutan. Kod većine izolata (14 izolata) nije primećena pigmentacija podloge, pa je naličje bilo belo do krem boje. Naličje kolonija četiri izolata bilo je žute boje: kod izolata 3JČ6 i 3Š1 bilo je jarkožuto sa smeđim prstenom oko centra kolonije, kod izolata KŠA5 bilo je jarkožuto sa krem obojenim centrom, dok je kod izolata JMR2ž bilo tamnožuto. Izolati *P. expansum* su na MEA podlozi formirali plavozelene, gromuljičaste, radijalno naborane kolonije, u većini slučajeva koncentrično zonirane sa ravnim tankim belim rubom. Na rubu kolonije uočeno je prisustvo prozirnih kapljica eksudata. Kao i na PDA, na MEA podlozi je naličje bilo krem boje, osim kod četiri izolata čije naličje je bilo jarko žuto sa krem bojom oko centra kolonije (3JČ6, KŠA5 i JMR2ž), odnosno žuto sa svetlosmeđim prstenom oko centra kolonije (3Š1). Na CYA podlozi kolonije izolata *P. expansum* su bile koncentrično gromuljičaste (osim kod izolata DRI4a – somotasta kolonija) do slabo radijalno naborane. Kolonije su bile bujne, sa ravnim belim rubom, osim kod izolata DBA5 koji je imao blago talasast rub kolonije. Eksudat je u većini slučajeva bio prisutan u vidu sitnih providnih kapljica, osim kod izolata 3SD5 i 3Š1 gde je zabeleženo odsustvo eksudata i izolata KPN4 koji je produkovao obilan eksudat. Izgled naličja kolonija je bio varijabilan: najčešće kremroze do kremcrvene boje (kod 12 izolata), žute boje (3JČ6, 3Š1 i KŠA5) i krem boje (3JB22, JMR2o i DBA5). Na YES podlozi izolati su formirali bujne, plavozelene ili plavosive kolonije, radijalno naborane i bez prisustva eksudata. Kolonije su bile gromuljičaste, sa ili bez koncentrične zoniranosti, osim kod tri izolata (3JČ23, KPN4 i DRI4a) koji su formirali somotaste kolonije. Kolonije su bile sa ravnim belim rubom, osim kod izolata JMR2o, koji je formirao blago neravan rub. Naličje kolonija je bilo od svetlo do jarkožuto, sa ili bez narandžastog centra.

Izolati *P. crustosum* su na PDA i MEA podlozi formirali kolonije sličnog izgleda: maslinastozelene, somotaste, ponekad radijalno naborane, sa ravnim belim rubom i bez prisustva eksudata. Nakon 10 ili više dana delovi kolonija su se odvajali u vidu krasta. Naličje kolonija je bilo svetlo do jarko žute boje. Na CYA podlozi izolati su formirali maslinastozelene somotaste, ređe radijalno naborane kolonije neravnog ruba. Providne kapljice eksudata bile su prisutne na celoj površini kolonije, osim kod izolata JBA8a i MRI4. Izolat KGR2 stvarao obilan eksudat. Naličje kolonija izolata *P. crustosum* na CYA podlozi bilo je krem do žute boje. Izolat DRI4b se izdvojio po tome što je formirao gromuljičastu do vunastu koloniju, koja je bila mestimično bela. Takođe, naličje kolonije se razlikovalo i bilo je narandžaste boje. Na YES podlozi izolati su obrazovali bujne, plavozelene do maslinastozelene somotaste, radijalno naborane kolonije, u kojima se nije obrazovao eksudat. Rub kolonija je bio ravan i beo (osim izolata KRIIP čiji je rub bio blago talasast). Naličja kolonija su bila žute do jarkožute boje. Po izgledu lica kolonije se izdvojio izolat DRI4b koji je formirao gromuljičastu do vunastu koloniju, dok je na PDA, MEA i CYA ovaj izolat obrazovao kolonije sa narandžastom bojom naličja.



Slika 13. Kolonije izolata *P. expansum* (A, B), *P. crustosum* (C) i *P. solitum* (D) na različitim hranljivim podlogama posle 7 dana inkubacije u mraku pri temperaturi $24\pm 2^{\circ}\text{C}$.



Slika 14. Naličje kolonija izolata *P. expansum* (A,B), *P. crustosum* (C) i *P. solitum* (D) na različitim hranljivim podlogama posle 7 dana inkubacije u mraku pri temperaturi $24\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Izolat *P. solitum* je na svim podlogama formirao koloniju plavozelene boje. Na PDA podlozi kolonija je bila somotasta do vunasta sa koncentričnim zonama i ravnim belim rubom, bez prisustva eksudata. Naličje kolonije je bilo narandžasto sa krem rubom i centrom. Na MEA podlozi izolat je obrazovao vunastu, radijalno naboranu koloniju, sa uskim ravnim rubom, bez prisustva eksudata. Naličje je bilo krem sa svetlosmeđom pigmentacijom oko ruba kolonije. Na CYA podlozi izolat je obrazovao vunastu, radijalno naboranu koloniju sa širokim belim rubom i obilnim prozirnim eksudatom. Naličje je bilo krem boje sa svetlonarandžastim centrom. Na YES podlozi kolonija je bila svetloplavosiva, vunasta i radijalno naborana sa ravnim belim rubom, bez prisustva eksudata. Naličje kolonije bilo je jarkožute boje.

Porast kolonija izolata *Penicillium* spp. na diferencijalnim hranljivim podlogama. Porast kolonija ispitivanih izolata *P. expansum*, *P. crustosum* i *P. solitum* na različitim hranljivim podlogama (PDA, MEA, CYA i YES) nakon 7 dana inkubacije u mraku pri temperaturi $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ prikazan je u Tabeli 10, dok je prosečan prečnik kolonije po vrsti prikazan i na Grafikonu 1.

Prosečan prečnik kolonija izolata *P. expansum* nakon 7 dana inkubacije na PDA podlozi kretao se od 32,92 (3Š1) do 47,00 mm (JRad4), sa prosekom za vrstu od 41,45 mm. Na MEA podlozi prečnik kolonija je iznosio od 27,25 (KŠA5) do 39,03 mm (KPN4), dok je prosek za vrstu iznosio 32,94 mm. Prosečan prečnik kolonija ispitivanih izolata na CYA podlozi bio je od 36,28 (DBA5) do 48,72 (JRad4), sa prosekom za vrstu od 43,17 mm. Na YES podlozi prečnik kolonija bio je od 37,53 (JMR2o) do 53,28 mm (3SD5), a prosek za vrstu je bio 48,03 mm.

Prosečan prečnik kolonija izolata *P. crustosum* nakon 7 dana inkubacije na PDA podlozi iznosio je od 36,38 (JBA11) do 39,71 mm (MRI4) sa prosekom za vrstu 38,39 mm. Na MEA podlozi prečnik kolonija izolata iznosio je od 30,39 (JBA11) do 35,26 (MRI4) sa prosekom za vrstu od 32,77 mm. Prosečan prečnik kolonija na CYA podlozi bio je od 35,53 (DRI4b) do 43,81 mm (MRI4), a prosek za vrstu je iznosio 38,90 mm. Na YES podlozi prečnik kolonija je bio od 40,92 (KRI1P) do 48,47 mm (MRI4) sa prosekom za vrstu od 43,51 mm.

Prosečan prečnik kolonije izolata *P. solitum* (DRI3) nakon 7 dana inkubacije na PDA podlozi iznosio je 28,02 mm, na MEA podlozi 24,31 mm, na CYA podlozi 29,75 mm i na YES podlozi 34,53 mm.

Međusobnim poređenjem prečnika kolonija svih ispitivanih izolata na svakoj od podloga, uočene su sličnosti i razlike među njima. Najbrži porast kolonija izolata svih ispitivanih vrsta zabeležen je na YES podlozi, a zatim na CYA i PDA podlozi, dok je porast bio najsporiji na MEA podlozi ($p < 0,01$). U poređenju sa *P. crustosum* i *P. solitum*, izolati *P. expansum* su brže rasli na podlogama YES i CYA ($p < 0,0001$), dok je porast kolonija *P. expansum* i *P. crustosum* bio ujednačen na podlogama PDA i MEA ($p = 0,901$) (Tabela 11, Grafikon 1). Bez obzira na ujednačenost porasta na ovim podlogama kada se uporede svi izolati, uočeno je da je na svim podlogama najbrži porast ispoljio jedan od izolata koji pripada vrsti *P. expansum* (JRad4 na PDA i CYA; KPN4 na MEA; 3SD5 na YES). Kolonije *P. solitum* su najsporije rasle na svim hranljivim podlogama ($p < 0,01$). Varijabilnost u brzini porasta kolonija izolata *P. expansum* uočena je na svim hranljivim podlogama ($p < 0,01$) i izolata *P. crustosum* na podlogama MEA, CYA i YES ($p < 0,01$). Na osnovu brzine porasta kolonija izolati *P. expansum* su se razdvojili u dve grupe, grupu brzorastućih (11 izolata) i grupu spororastućih izolata (7 izolata) (Tabela 10). Najpogodnija podloga za porast sve tri *Penicillium* vrste, na osnovu rezultata ispitivanja brzine porasta kolonija, je YES (Tabela 11, Grafikon 2).

Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je da *Penicillium* vrsta i tip podloge imaju veliki uticaj na porast kolonije. Rezultati su pokazali da je 20,9% ($\eta^2=0,209$) od ukupne varijabilnosti u porastu kolonija uslovljeno razlikom među vrstama, dok je 17,3% ($\eta^2=0,173$) uslovljeno razlikom u hranljivim podlogama. Interakcija oba faktora: vrsta gljive i tip hranljive podloge je imala mali uticaj 2,6% ($\eta^2=0,026$) na veličinu/prečnik kolonija (Tabela 12).

Tabela 10. Porast kolonija izolata *P. expansum*, *P. crustosum* i *P. solitum* na različitim podlogama, nakon 7 dana inkubacije u mraku pri temperaturi 24±2°C.

Izolati	Prosečan prečnik kolonija na različitim podlogama (mm) ± standardna devijacija (SD)			
	PDA	MEA	CYA	YES
<i>Penicillium expansum</i>				
JRad4	47,00 ± 0,97f *	37,22 ± 0,73hi	48,72 ± 1,25h	51,31 ± 1,21d-f
3JČ11	42,69 ± 0,86 d-f	30,67 ± 1,08b-d	44,18 ± 1,59d-g	49,71 ± 1,78c-f
3JČ23	45,81 ± 1,02ef	31,58 ± 0,69c-e	43,09 ± 1,10c-f	52,44 ± 0,63ef
3JB13	40,58 ± 0,81b-e	29,42 ± 1,48a-c	46,13 ± 1,09e-h	50,53 ± 0,85d-f
3SD3	43,85 ± 1,26d-f	31,06 ± 0,97c-e	46,94 ± 1,57f-h	51,69 ± 1,14d-f
3SD5	43,92 ± 0,97d-f	30,72 ± 0,89b-d	46,34 ± 1,66e-h	53,28 ± 1,17f
3MR1	44,83 ± 1,20d-f	32,08 ± 1,03de	47,73 ± 1,02gh	49,10 ± 1,54b-f
JBA8b	43,47 ± 7,05d-f	36,69 ± 2,12gh	44,39 ± 6,26e-h	49,64 ± 9,88c-f
JPN2	43,92 ± 7,85d-f	37,89 ± 1,92hi	42,42 ± 5,53b-e	48,39 ± 8,64b-f
KPN4	44,56 ± 8,03d-f	39,03 ± 3,58i	44,50 ± 5,96e-h	48,89 ± 8,77b-f
DRI4a	44,91 ± 7,60d-f	37,50 ± 2,81-i	45,14 ± 6,31e-h	50,21 ± 8,46d-f
3JČ6	36,77 ± 0,87a-c	27,33 ± 0,49a	46,22 ± 0,86e-h	49,31 ± 1,01b-f
3JB22	39,33 ± 1,42b-d	28,64 ± 1,41ab	38,69 ± 0,67a-c	45,00 ± 2,61b-d
3Š1	32,92 ± 1,62a	36,38 ± 1,50gh	42,47 ± 0,63b-e	48,03 ± 1,47b-f
KŠA5	36,64 ± 0,70ab	27,25 ± 0,46a	38,36 ± 1,12ab	42,50 ± 1,72ab
JMR2o	35,03 ± 4,24ab	32,06 ± 1,03de	38,39 ± 3,21ab	37,53 ± 2,17a
JMR2ž	42,41 ± 6,47c-f	34,75 ± 2,06fg	39,94 ± 2,43a-d	45,72 ± 6,56b-e
DBA5	36,78 ± 4,56a-c	33,17 ± 1,20ef	36,28 ± 2,15a	43,00 ± 5,54a-c
Avg.	41,45 ± 5,76b **	32,94 ± 4,00b	43,17 ± 4,75c	48,03 ± 6,25c
<i>Penicillium crustosum</i>				
JBA8a	39,58 ± 5,18a	35,03 ± 2,27c	43,81 ± 5,99b	47,19 ± 8,38ab
JBA11	36,38 ± 3,09a	30,39 ± 1,12a	36,00 ± 2,54a	41,61 ± 5,13ab
KGR2	38,36 ± 2,84a	32,39 ± 1,36ab	39,13 ± 6,09ab	44,09 ± 6,19ab
KRI1P	38,97 ± 2,61a	31,34 ± 1,57ab	38,69 ± 3,28ab	40,92 ± 4,72a
KVA8	37,91 ± 3,37a	31,64 ± 1,60ab	38,92 ± 3,79ab	41,58 ± 5,12ab
DRI4b	37,71 ± 3,07a	33,25 ± 1,40bc	35,53 ± 1,69a	41,44 ± 4,35ab
MRI4	39,71 ± 4,10a	35,26 ± 2,48c	40,53 ± 5,64ab	48,47 ± 8,46b
Avg.	38,39 ± 3,64b	32,77 ± 2,45b	38,90 ± 5,05b	43,51 ± 6,67b
<i>Penicillium solitum</i>				
DRI3	28,02 ± 0,50a	24,31 ± 0,68a	29,75 ± 0,69a	34,53 ± 1,22a

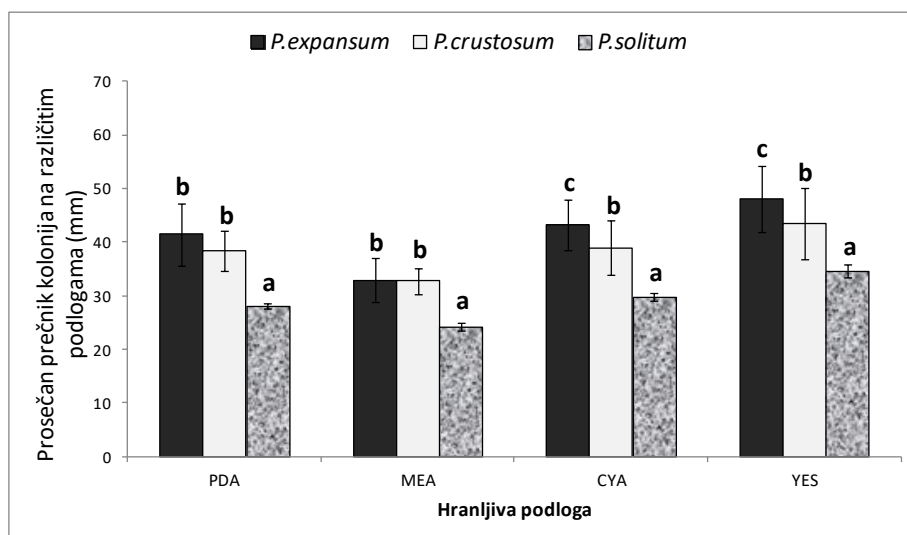
*Vrednosti označene različitim slovima predstavljaju statistički značajnu razliku u prečniku kolonija među izolatima iste vrste po podlozi po Tukey HSD testu (p<0,01).

** Podebljane vrednosti označene različitim slovima predstavljaju statistički značajnu razliku prosečnih prečnika među vrstama po podlozi po Tukey HSD testu (p<0,01).

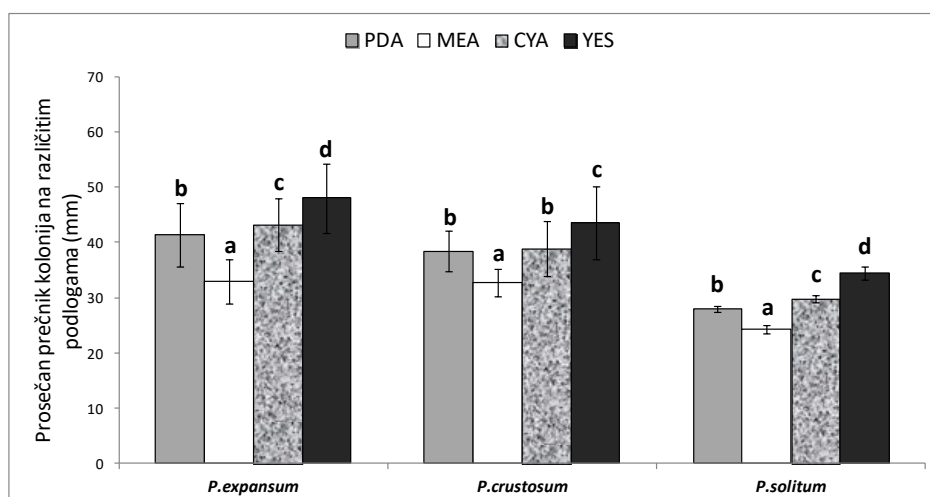
Tabela 11. Uticaj različitih hranljivih podloga na porast kolonija *P. expansum*, *P. crustosum* i *P. solitum*.

Vrsta:	Prosečan prečnik kolonija (mm) ± SD 7 dpi u mraku pri 24±2°C.		
	<i>P. expansum</i>	<i>P. crustosum</i>	<i>P. solitum</i>
podloga:			
PDA	41,45±5,76b	38,39±3,64b	28,02±0,50b
MEA	32,94±4,00a	32,77±2,45a	24,31±0,68a
CYA	43,17±4,75c	38,90±5,05b	29,75±0,69c
YES	48,03±6,25d	43,51±6,67c	34,53±1,22d

*Vrednosti označene različitim slovima predstavljaju statistički značajnu razliku u prosečnom prečniku kolonija iste vrste na ispitivanim podlogama po Tukey HSD testu (p<0,01).



Grafikon 1. Porast kolonija *P. expansum*, *P. crustosum* i *P. solitum* na hranljivim podlogama posle sedam dana inkubacije u mraku pri $24\pm 2^{\circ}\text{C}$. Vertikalni bar označava standardnu devijaciju aritmetičke sredine. Vrednosti označene različitim slovima predstavljaju statistički značajnu razliku u prosečnom prečniku kolonija iste vrste na ispitivanim podlogama po Tukey HSD testu ($p < 0,01$).



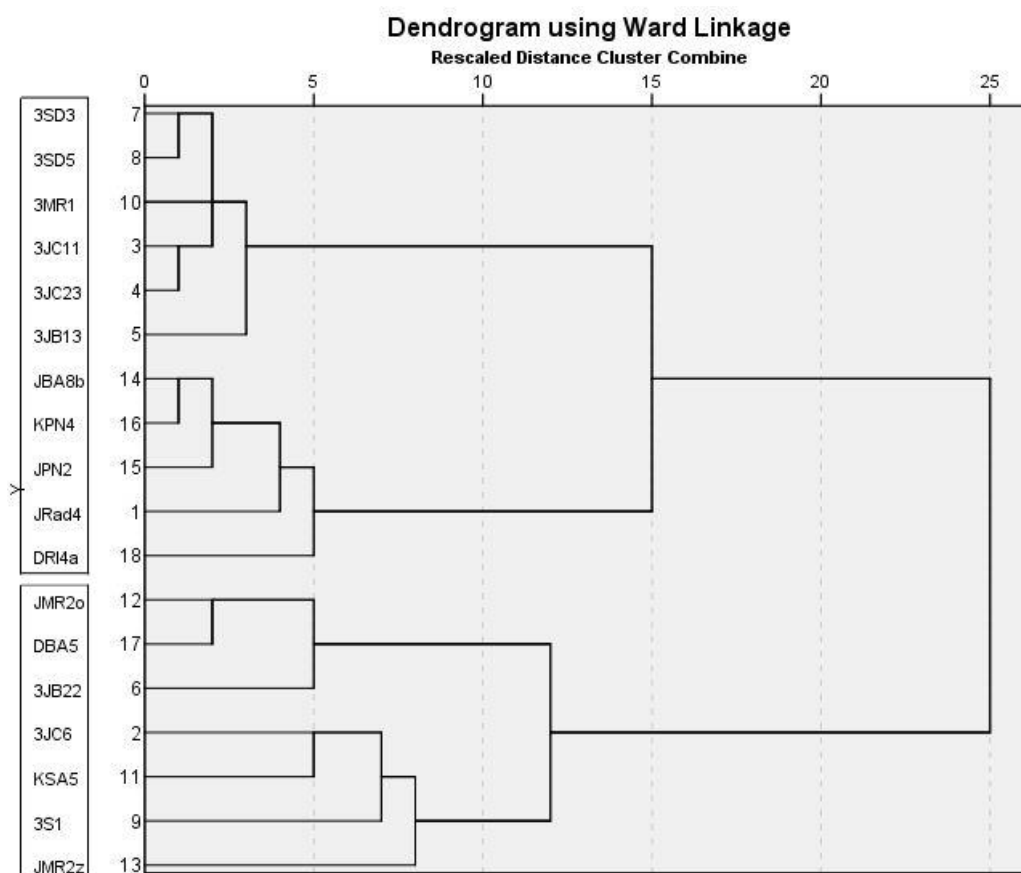
Grafikon 2. Uticaj hranljive podloge na porast kolonije *P. expansum*, *P. crustosum* i *P. solitum*. Vertikalni bar označava standardnu devijaciju aritmetičke sredine. Vrednosti označene različitim slovima predstavljaju statistički značajnu razliku u prosečnom prečniku kolonija iste vrste na ispitivanim podlogama po Tukey HSD testu ($p < 0,01$).

Tabela 12. Statistički parametri uticaja *Penicillium* vrste i hranljive podloge na porast kolonije.

	p vrednost	Parcijalni eta kvadrat (η^2)	Uticaj faktora
Vrsta	$p < 0,0005$	0,209	velik
Podloga	$p < 0,0005$	0,173	velik
Vrsta*Podloga	$p < 0,0005$	0,026	mali

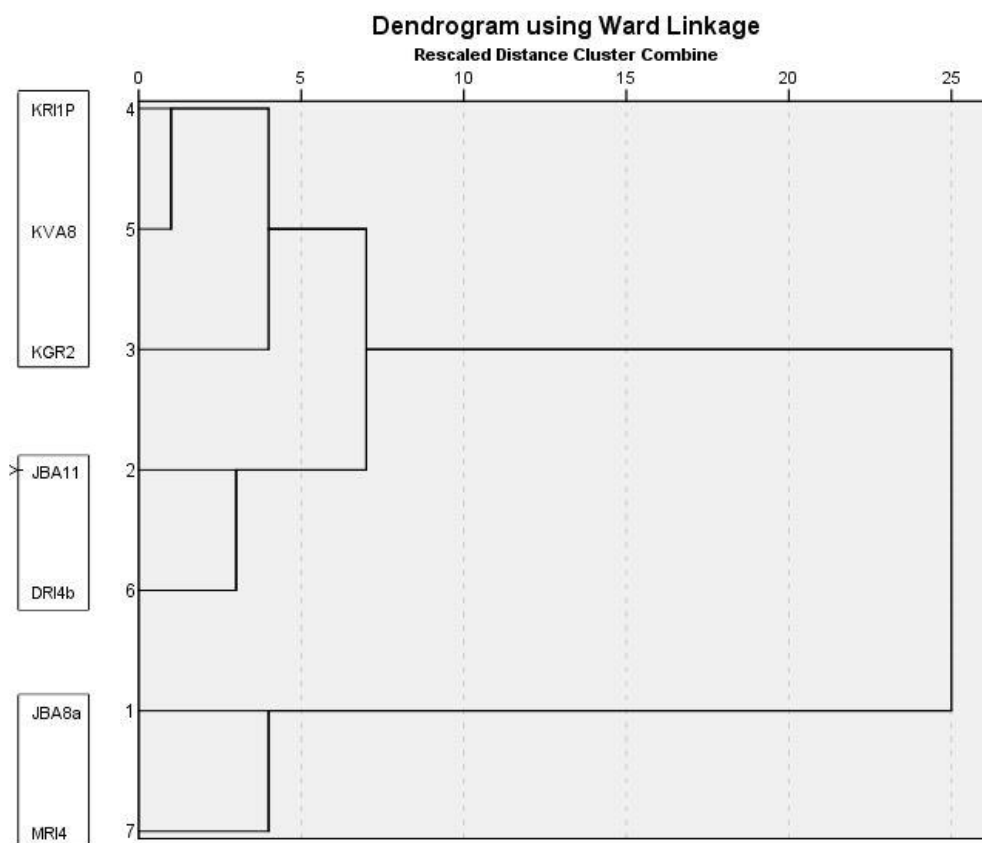
Klaster analiza makroskopskih morfoloških odlika izolata *Penicillium expansum* i *P. crustosum*. Izolati *P. expansum* su se u klaster analizi na osnovu brzine porasta kolonija na različitim podlogama (PDA, CYA i YES), boje naličja (prisustva/odsustva žutog naličja) na PDA i MEA podlogama, kao i izgleda naličja na CYA podlozi, razdvojili u dve grupe (klastera) (Slika 15). Izolate prve grupe (11 od 18 izolata) karakteriše brži porast kolonija, krem naličje na PDA i MEA podlogama (odsustvo žutog pigmenta) i kremroze do kremcrveno naličje na CYA podlozi. Izolate druge grupe (sedam izolata) odlikuje sporiji porast kolonija, prisustvo žutog naličja kolonije na PDA i MEA

podlogama i različita obojenost naličja na CYA podlozi (krem, žuta ili kremcrvena). Filogenetske analize zasnovane na *BenA* i *CaM* genskim regionima razdvojile su izolate *P. expansum* u dve grupe koje u potpunosti odgovaraju grupisanju izolata u klaster analizi na osnovu morfoloških odlika (brzina porasta, žuto naličje na PDA i MEA i boja naličja kolonija na CYA).



Slika 15. Dendrogram grupisanja izolata *Penicillium expansum* na osnovu prečnika kolonija na različitim podlogama (PDA, CYA i YES), prisustva/odsustva žutog pigmenta na PDA i MEA podlogama i izgleda naličja na CYA podlozi, koristeći Ward-ovu metodu i Euklidsku razdaljinu.

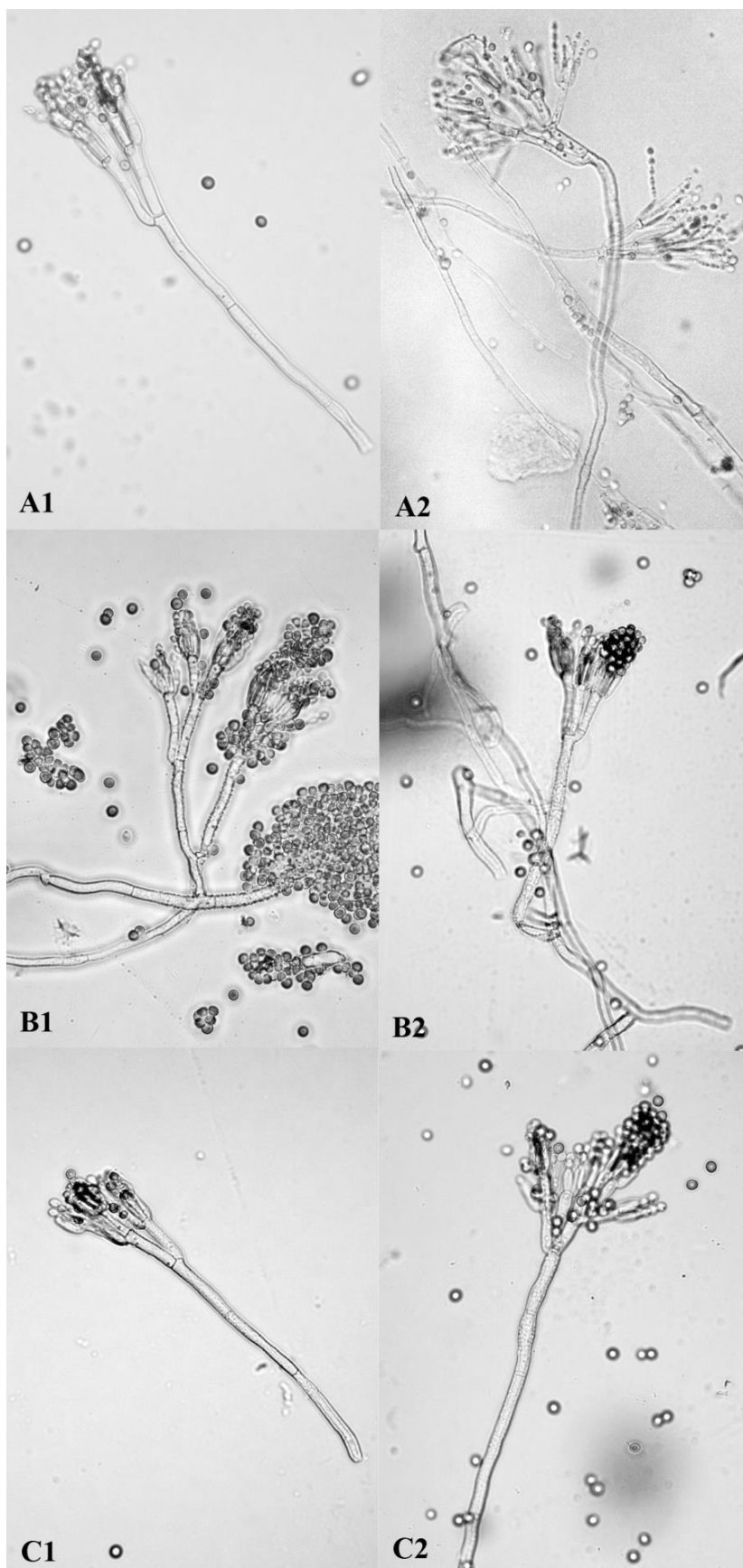
Klaster analiza na osnovu prečnika kolonija na različitim podlogama (MEA, CYA i YES), odnosno brzine porasta, razdvojila je izolate *P. crustosum* u tri grupe (Slika 16). Dva izolata (JBA8a i MRI4) koji pripadaju prvoj grupi su formirala brže rastuće kolonije, dok je u drugoj i trećoj grupi pet izolata sa sporije rastućim kolonijama. Filogenetske analize zasnovane na *RPB2* regionu, kao i analize zasnovane na spojenim sekvencama tri ili četiri regiona razdvojile su izolate *P. crustosum* u tri klade što odgovara grupisanju izolata u klaster analizi na osnovu brzine porasta.



Slika 16. Dendrogram grupisanja izolata *Penicillium crustosum* na osnovu prečnika kolonija na različitim podlogama (MEA, CYA i YES), koristeći Ward-ovu metodu i Euklidsku razdaljinu.

5.5.2. Mikroskopske odlike *Penicillium* spp.

Izgled konidiofora i konidija. Nakon 7 dana inkubacije na MEA podlozi pri temperaturi $24 \pm 2^\circ\text{C}$ izolati *P. expansum* su formirali konidiofore glatkih zidova, najčešće sa *terverticillata* ponekad i sa *biverticillata* tipom grananja. Oblik rama i metula je bio cilindričan, fjalide su većinom bile cilindrične, ponekad ampuliformne. Konidije su kao i konidiofore bile glatkih zidova, okruglastog, ovalnog do eliptičnog oblika (Slika 17 A1, A2). Izolati *P. crustosum* su formirali konidiofore sa izraženo nazubljenim zidovima, uglavnom sa *terverticillata*, ponekad i sa *biverticillata* tipom grananja. Stipe su bile nazubljene, kao i rame, koje su imale cilindričan oblik. Metule su takođe bile cilindrične, a zidovi nazubljeni ili glatki. Fijalide su bile ampuliformne do cilindrične, uglavnom glatkih zidova, ređe nazubljene. Konidije su bile okruglaste i ovalne, glatkih zidova (Slika 17 B1, B2). Izolat *P. solitum* je obrazovao konidiofore sa glatkim ili blago nazubljenim zidovima, uglavnom sa *terverticillata*, ponekad i sa *biverticillata* tipom grananja. Stipe su bile nazubljene. Rame su bile cilindrične, glatkih ili blago nazubljenih zidova, dok su metule bile glatke i takođe cilindrične. Fijalide su bile ampuliformne do cilindrične, glatkih zidova. Konidije su u najvećoj meri bile okruglaste, ponekad i ovalne, glatkih zidova (Slika 17 C1, C2).



Slika 17. Konidiofore i konidije *Penicillium expansum* (A1 i A2), *P. crustosum* (B1 i B2) i *P. solitum* (C1 i C2); *terverticillata* (A1, B1 i C1) i *biverticillata* (A2, B2 i C2) konidiofore.

Veličina konidiofora i konidija. Dimenzije konidija izolata *P. expansum* iznosile su 2,93-3,61 x 2,47-3,22 μm , dok je prosečna vrednost iznosila 3,24 x 2,73 μm . Dužina fijalida ispitivanih izolata je bila 9,09-10,91 x 2,57-3,32 μm , sa prosečnom vrednošću 10,14 x 2,94 μm . Dužina metula bila je 11,29-14,30 x 3,13-4,11 μm . Prosečna veličina metula iznosila je 12,94 x 3,61 μm . Dužina rama je bila 16,67-24,65 x 3,56-4,58 μm . Prosečna veličina rama iznosila je 19,66 x 3,96 μm (Tabela 13). Uočena je varijabilnost u veličini konidiofora i konidija kod *P. expansum* izolata (Tabela 13; Grafikon 3). Izolat DRI4a obrazovao je najkrupnije konidije, 3JČ23 najduže fijalide i rame, a izolat 3JČ6 najšire fijalide i metule (Tabela 13; Grafikon 3 i 4).

Veličina konidija izolata *P. crustosum* (DRI3) iznosila je 3,10-3,61 x 2,76-3,34 μm , dok je prosečna veličina iznosila 3,33 x 3,06 μm . Najsitnije konidije je formirao izolat JBA8a, a najkrupnije izolat KGR2. Dužina fijalida iznosila je 9,36-10,67 x 2,99-3,23 μm , dok je prosek bio 10,05 x 3,10 μm . Dužina metula bila je 13,30-15,04 x 3,71-4,10 μm , a prosek je iznosio 14,02 x 3,86 μm . Dužina rama je bila 19,87-23,37 x 3,78-4,31 μm , a prosek je iznosio 21,23 x 4,11 μm (Tabela 13). Izolati *P. crustosum* su bili varijabilni u pogledu dimenzija konidija i dužine fijalida, dok se na osnovu širine fijalida nisu razlikovali. Na osnovu ostalih parametara dva izolata su se međusobno značajno razlikovala (Tabela 13; Grafikon 3 i 4).

Veličina konidija izolata *P. solitum* iznosila je 3,67 x 3,42 μm , fijalida 10,13 x 3,11 μm , metula 12,20 x 4,21 μm i rama 18,17 x 4,41 μm (Tabela 13).

Uparednom analizom mikroskopskih morfoloških karakteristika ispitivanih izolata *P. expansum* i *P. crustosum* (Tabela 14) utvrđeno je da:

- 1) Između *P. expansum* i *P. crustosum* nema razlike u dužini konidija ($p = 0,09$), dok su konidije *P. expansum* uže od konidija *P. crustosum* ($p < 0,0001$);
- 2) Između *P. expansum* i *P. crustosum* nema razlike u dužini ($p = 0,75$) i širini ($p = 0,011$) fijalida;
- 3) *P. crustosum* ima šire i duže metule nego *P. expansum* ($p < 0,0001$);
- 4) Nema razlike u dimenziji rama ($p = 0,368$ za dužinu, $p = 0,177$ za širinu) između *P. expansum* i *P. crustosum*;
- 5) Između izolata *P. expansum* postoji varijabilnost u veličini konidija, fijalida, metula i rama, a između izolata *P. crustosum* u veličini konidija i dužini fijalida ($p < 0,01$).

U odnosu na *P. expansum* i *P. crustosum* izolat *P. solitum* je formirao veće konidije ($p < 0,0001$), šire metule (Tabela 12; Grafikon 3 i 4).

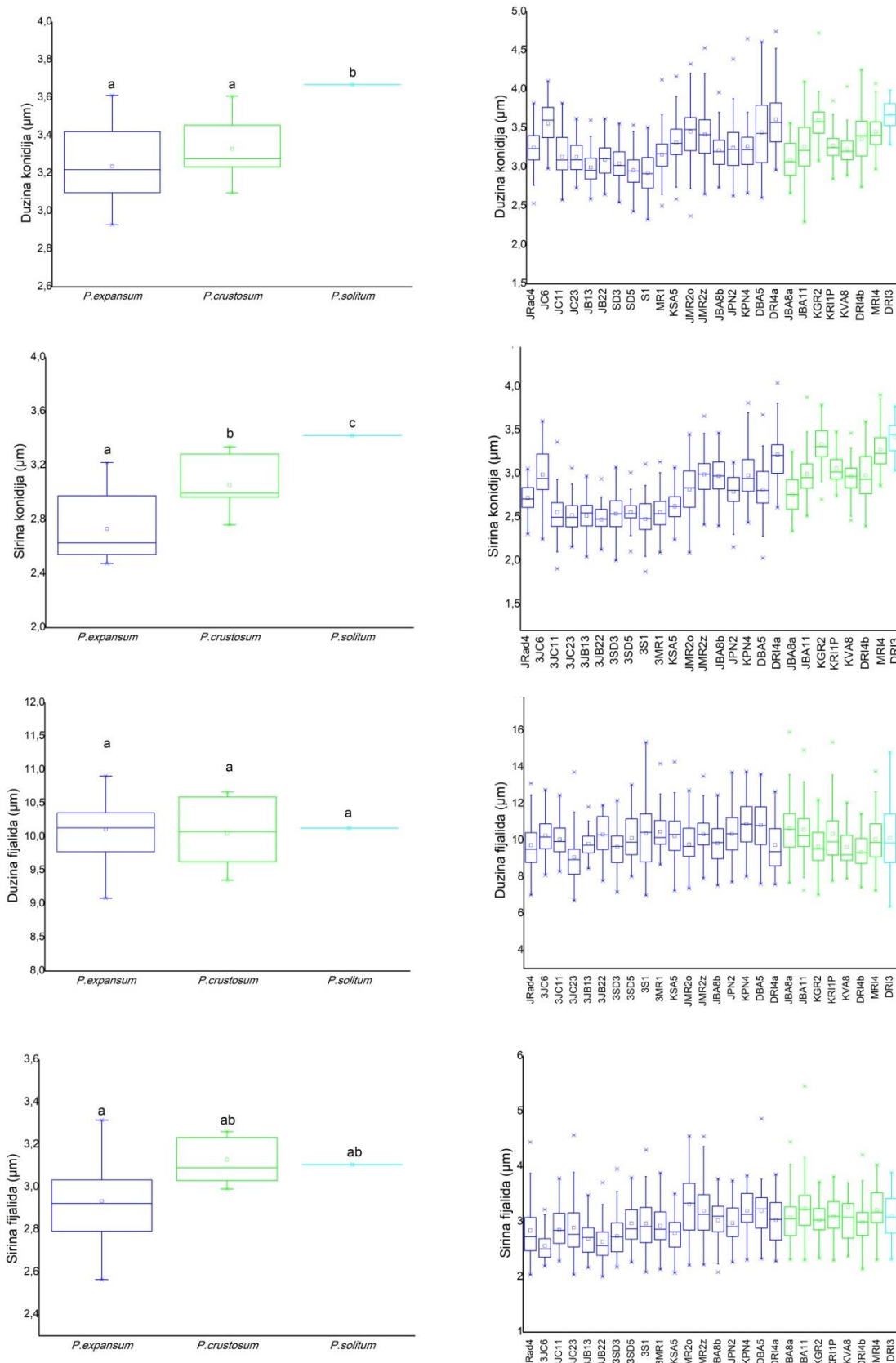
Razlika između tri ispitivane vrste je bila velika u širini konidija ($\eta^2 = 0,175$), umerena u dužini konidija ($\eta^2 = 0,061$) i mala u dužini i širini metula ($\eta^2 = 0,047$; $\eta^2 = 0,055$) i rama ($\eta^2 = 0,03$; $\eta^2 = 0,023$),

Tabela 13. Veličina konidija i delova konidiofora *P. expansum*, *P. crustosum* i *P. solitum* izolata na MEA podlozi, nakon 7-10 dana inkubacije pri temperaturi 24±2°C.

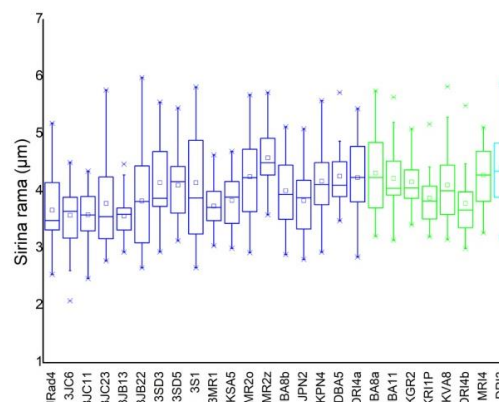
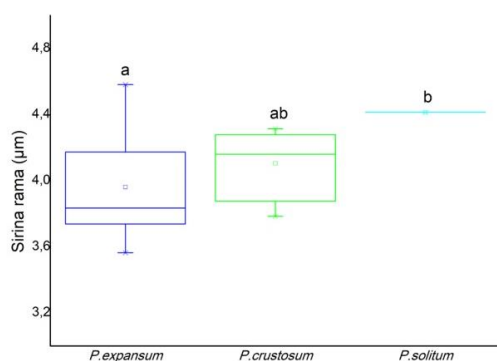
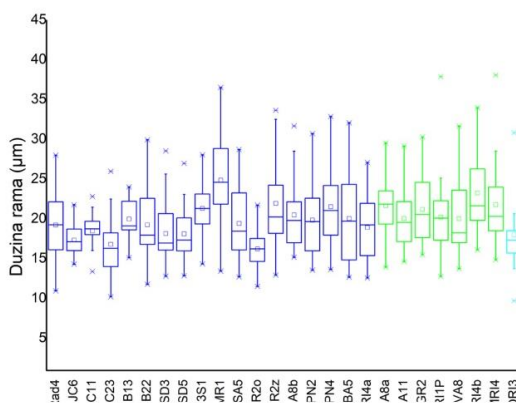
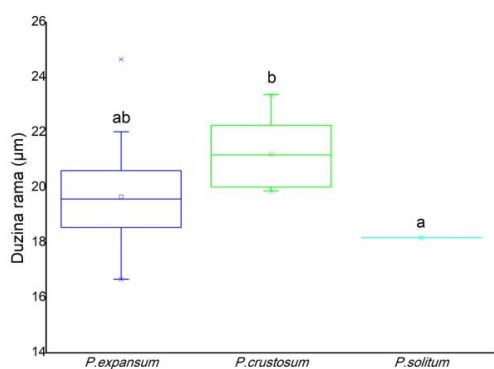
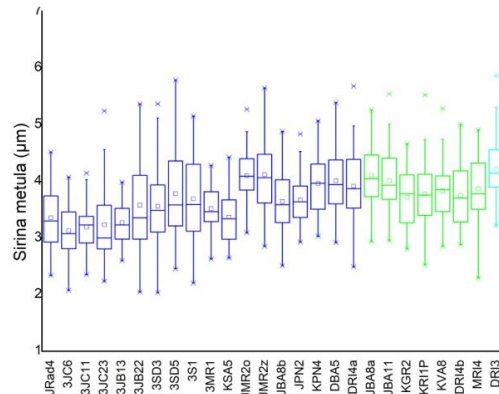
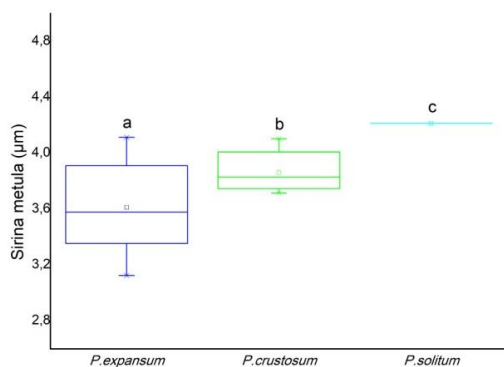
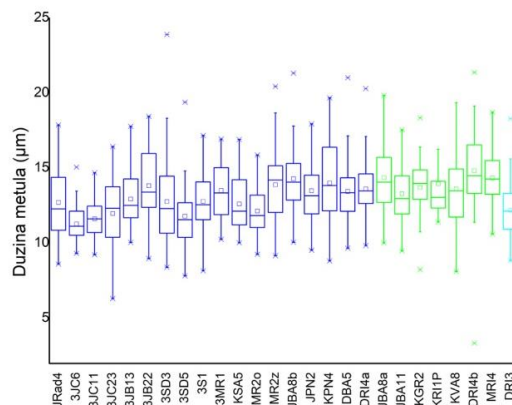
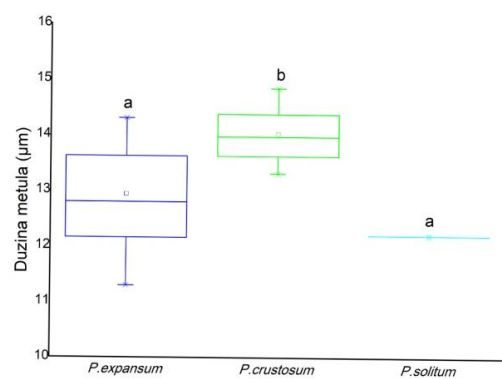
Izolat	Prosečna veličina (μm) ± SD							
	Veličina konidija		Veličina fialida		Veličina metula		Veličina rama	
	Dužina	Širina	Dužina	Širina	Dužina	Širina	Dužina	Širina
<i>Penicillium expansum</i>								
JRad4	3,25 ± 0,25c-e *	2,72 ± 0,19bc	9,74 ± 1,38ab	2,84 ± 0,55a-d	12,72 ± 2,41a-e	3,35 ± 0,59a-e	19,64 ± 4,20a-c	3,67 ± 0,63ab
3JČ11	3,13 ± 0,30a-d	2,56 ± 0,26ab	10,06 ± 0,91a-d	2,85 ± 0,34a-d	11,63 ± 1,46a	3,19 ± 0,38ab	18,61 ± 2,10a-c	3,58 ± 0,43a
3JČ23	3,13 ± 0,24a-d	2,52 ± 0,18a	9,09 ± 1,35a	2,89 ± 0,53a-e	11,99 ± 2,65a-c	3,23 ± 0,68a-c	16,67 ± 3,51a	3,78 ± 0,77ab
3JB13	3,00 ± 0,22ab	2,52 ± 0,19a	9,82 ± 0,77ab	2,69 ± 0,28a-c	12,94 ± 1,83a-e	3,27 ± 0,36a-d	19,58 ± 2,77a-c	3,56 ± 0,39a
3SD3	3,05 ± 0,22a-c	2,54 ± 0,21ab	9,65 ± 1,05ab	2,74 ± 0,39a-d	12,77 ± 3,19a-e	3,56 ± 0,72a-g	18,55 ± 4,15a-c	4,15 ± 0,68a-c
3SD5	2,96 ± 0,23a	2,56 ± 0,20ab	10,13 ± 1,21b-d	2,97 ± 0,40b-e	11,81 ± 2,09ab	3,78 ± 0,76e-h	17,83 ± 3,16a-c	4,10 ± 0,64a-c
3MR1	3,16 ± 0,29a-d	2,56 ± 0,21ab	10,48 ± 1,11b-d	2,92 ± 0,37b-e	13,51 ± 1,76c-e	3,51 ± 0,37a-f	24,65 ± 5,84d	3,74 ± 0,39ab
JBA8b	3,22 ± 0,24b-e	2,98 ± 0,24de	9,86 ± 1,11a-c	3,03 ± 0,39d-f	14,30 ± 2,26e	3,64 ± 0,54b-g	20,45 ± 4,33a-d	4,01 ± 0,64a-c
JPN2	3,25 ± 0,31c-e	2,80 ± 0,22cd	10,36 ± 1,35b-d	2,98 ± 0,36c-e	13,50 ± 1,96b-e	3,67 ± 0,43c-h	19,39 ± 4,75a-c	3,83 ± 0,63ab
KPN4	3,27 ± 0,37c-e	2,98 ± 0,30de	10,91 ± 1,46d	3,20 ± 0,35ef	14,01 ± 2,51e	3,96 ± 0,53fgh	22,02 ± 4,64cd	4,17 ± 0,56a-c
DRI4a	3,61 ± 0,39f	3,22 ± 0,30f	9,75 ± 1,38ab	3,03 ± 0,44d-f	13,62 ± 2,06c-e	3,91 ± 0,65fgh	18,91 ± 3,56a-c	4,23 ± 0,45bc
3JČ6	3,56 ± 0,27f	2,99 ± 0,29e	10,27 ± 1,05b-d	2,57 ± 0,27a	11,29 ± 1,18a	3,13 ± 0,47a	17,89 ± 2,26a-c	3,58 ± 0,54a
3JB22	3,10 ± 0,24a-d	2,47 ± 0,17a	10,33 ± 1,02b-d	2,64 ± 0,38ab	13,84 ± 2,38de	3,58 ± 0,77a-g	19,91 ± 4,39a-c	3,83 ± 0,81ab
3Š1	2,93 ± 0,29a	2,48 ± 0,23a	10,39 ± 1,79b-d	2,97 ± 0,44b-e	12,79 ± 2,09a-e	3,69 ± 0,77d-h	20,92 ± 3,60b-d	4,15 ± 0,94a-c
KŠA5	3,32 ± 0,29de	2,63 ± 0,19ab	10,24 ± 1,32b-d	2,79 ± 0,32a-d	12,63 ± 1,76a-e	3,36 ± 0,44a-e	19,75 ± 4,11a-c	3,83 ± 0,48ab
JMR2o	3,46 ± 0,39ef	2,82 ± 0,31c-e	9,78 ± 1,10ab	3,32 ± 0,55f	12,15 ± 1,45a-d	4,10 ± 0,47h	16,79 ± 3,22ab	4,25 ± 0,65bc
JMR2ž	3,42 ± 0,36ef	2,99 ± 0,25e	10,34 ± 1,11b-d	3,20 ± 0,53ef	13,90 ± 2,45e	4,11 ± 0,60h	21,75 ± 5,48cd	4,58 ± 0,53c
DBA5	3,45 ± 0,47ef	2,81 ± 0,31c-e	10,83 ± 1,47cd	3,20 ± 0,52ef	13,46 ± 2,28b-e	4,01 ± 0,53gh	20,61 ± 5,60a-d	4,26 ± 0,53bc
Prosek	3,24 ± 0,30a **	2,73 ± 0,24a	10,14 ± 1,32a	2,94 ± 0,47a	12,94 ± 2,30a	3,61 ± 0,65a	19,66 ± 4,47ab	3,96 ± 0,97a
<i>Penicillium crustosum</i>								
JBA8a	3,10 ± 0,24a	2,76 ± 0,23a	10,67 ± 1,56d	3,08 ± 0,49a	14,37 ± 2,30ab	4,10 ± 0,53b	21,52 ± 4,38ab	4,31 ± 0,69b
JBA11	3,27 ± 0,38a-c	3,00 ± 0,27b	10,59 ± 1,52cd	3,23 ± 0,51a	13,30 ± 11,86a	4,01 ± 0,56ab	20,37 ± 3,65ab	4,22 ± 0,57ab
KGR2	3,61 ± 0,27d	3,34 ± 0,22c	9,67 ± 1,05a-c	3,03 ± 0,32a	13,71 ± 1,88ab	3,71 ± 0,46a	21,18 ± 3,87ab	4,16 ± 0,44ab
KRI1P	3,28 ± 0,23a-c	3,06 ± 0,18b	10,36 ± 1,57b-d	3,09 ± 0,34a	13,97 ± 2,79ab	3,77 ± 0,53a	20,01 ± 4,73a	3,88 ± 0,48ab
KVA8	3,23 ± 0,21ab	2,97 ± 0,20b	9,63 ± 1,10ab	3,06 ± 0,38a	13,62 ± 3,05a	3,83 ± 0,48ab	19,87 ± 4,55a	4,10 ± 0,66ab
DRI4b	3,36 ± 0,33bc	2,98 ± 0,27b	9,36 ± 0,96a	2,99 ± 0,39a	15,04 ± 2,24b	3,75 ± 0,54a	23,37 ± 4,33b	3,78 ± 0,59a
MRI4	3,45 ± 0,23c	3,28 ± 0,23c	10,07 ± 1,41a-d	3,21 ± 0,45a	14,34 ± 1,79ab	3,86 ± 0,58ab	22,26 ± 4,82ab	4,28 ± 0,55b
Prosek	3,33 ± 0,27a	3,06 ± 0,23b	10,05 ± 1,35a	3,10 ± 0,41a	14,02 ± 2,43b	3,86 ± 0,54b	21,23 ± 4,45b	4,11 ± 0,60ab
<i>Penicillium solitum</i>								
DRI3	3,67 ± 0,17b	3,42 ± 0,18c	10,13 ± 1,92a	3,11 ± 0,41a	12,20 ± 2,03a	4,21 ± 0,56c	18,17 ± 4,09a	4,41 ± 0,69b

*Vrednosti označene različitim slovima predstavljaju statistički značajnu razliku u veličini konidija, fialida, metula i rama među izolatima iste vrste po Tukey HSD testu ($p < 0,01$).

**Podebljane vrednosti označene različitim slovima predstavljaju statistički značajnu razliku u veličini konidija, fialida, metula i rama među vrstama po Tukey HSD testu ($p < 0,01$).



Grafikon 3. Prosečne vrednosti dužine i širine konidija i fialida po vrsti (levo) i izolatima (desno). Vertikalni bar predstavlja standardnu devijaciju aritmetičke sredine. Vrednosti označene različitim slovima predstavljaju statistički značajnu razliku u veličini konidija i fialida, među *Penicillium* vrstama (levo) i među svim ispitivanim izolatima (desno) po Tukey HSD testu ($p < 0,01$).



Grafikon 4. Prosečne vrednosti dužine i širine metula i rama po vrsti (levo) i izolatima (desno). Vertikalni bar predstavlja standardnu devijaciju aritmetičke sredine. Vrednosti označene različitim slovima predstavljaju statistički značajnu razliku u veličini metula i rama među *Penicillium* vrstama (levo) i među svim ispitivanim izolatima (desno) po Tukey HSD testu ($p < 0,01$).

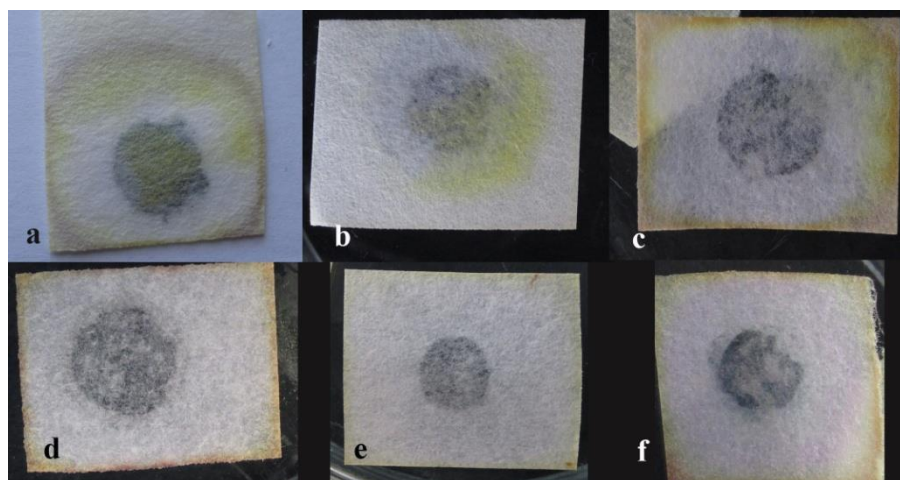
Tabela 14. Dimenzije konidija, fialida, metula i rama *Penicillium* spp. i značajnost razlika.

Mikromorfologija	<i>P. expansum</i>	<i>P. crustosum</i>	<i>P. solitum</i>	ANOVA (p value)	Uticaj Eta kvadrat (η^2)	Razlika između vrsta
Prosek (μm) $\pm$ SD						
Dužina konidija	3,24 $\pm$ 0,30a*	3,33 $\pm$ 0,27a	3,67 $\pm$ 0,17b	p<0,0005	0,061	srednja
Širina konidija	2,73 $\pm$ 0,24a	3,06 $\pm$ 0,23b	3,42 $\pm$ 0,18c	p<0,0005	0,256	velika
Dužina fialida	10,14 $\pm$ 1,32a	10,05 $\pm$ 1,35a	10,13 $\pm$ 1,92a	p=0,758	/	Nema
Širina fialida	2,94 $\pm$ 0,47a	3,10 $\pm$ 0,41a	3,11 $\pm$ 0,41a	p=0,0635	/	Nema
Dužina metula	12,94 $\pm$ 2,30a	14,02 $\pm$ 2,43b	12,20 $\pm$ 2,03a	p<0,0005	0,047	mala
Širina metula	3,61 $\pm$ 0,65a	3,86 $\pm$ 0,54b	4,21 $\pm$ 0,56c	p<0,0005	0,055	mala
Dužina rama	19,66 $\pm$ 4,47ab	21,23 $\pm$ 4,45b	18,17 $\pm$ 4,09a	p<0,0005	0,030	mala
Širina rama	3,96 $\pm$ 0,97a	4,11 $\pm$ 0,60ab	4,41 $\pm$ 0,69b	p<0,0005	0,023	mala

*Vrednosti označene različitim slovima predstavljaju statistički značajnu razliku u veličini konidija, fialida, metula i rama između vrsta po Tukey HSD testu (p<0,01). Vrednosti se porede u okviru istog reda, ne kolone.

5.6. Biohemijske karakteristike izolata *Penicillium* spp.

U reakciji sa Ehrlich-ovim reagensom šest izolata *P. expansum* (3JČ6, 3JČ11, 3JB13, 3SD3, 3MR1, KŠA5) formiralo je svetloljubičasti prsten, dok je 12 izolata formiralo samo žuti prsten. Svi izolati *P. crustosum* formirali su svetložute do žute prstenove u reakciji sa Ehrlich-ovim reagensom, dok je izolat *P. solitum* formirao žuti prsten. Uočene reakcije izolata upućuju na to da šest izolata *P. expansum* stvara ciklopiazonsku kiselinu; 12 izolata *P. expansum*, svi izolati *P. crustosum* i *P. solitum* izolat stvaraju druge alkaloidne (Slika 18; Tabela 15).



Slika 18. Reakcija izolata *P. expansum* (a,b,c), *P. crustosum* (d,e) i *P. solitum* (f) u Ehrlich-ovom testu

Tabela 15. Biohemijske karakteristike izolata *Penicillium* spp.: reakcija sa sa Ehrlich-ovim reagensom.

Izolati	Boja prstena u reakciji sa Ehrlich-ovim reagensom	
	ljubičasta	žuta
<i>P. expansum</i>		
JRad4	-	++
3JČ6	+	+
3JČ11	+	+
3JČ23	-	++
3JB13	+	++
3JB22	-	++
3SD3	+	++
3SD5	-	+++
3Š1	-	+++
3MR1	+	++
KŠA5	+	++
JMR2o	-	++
JMR2ž	-	++
JBA8b	-	++
JPN2	-	++
KPN4	-	+++
DBA5	-	++
DRI4a	-	+++
<i>P. crustosum</i>		
JBA8a	-	+/-
JBA11	-	+/-
KGR2	-	+
KRI1P	-	+
KVA8	-	+
DRI4b	-	+/-
MRI4	-	+
<i>P. solitum</i>		
DRI3	-	+

Legenda: – nema reakcije; +/- jedva vidljiva reakcija; + slaba reakcija; ++ umerena reakcija; +++ snažna reakcija

5.7. Virulentnost izolata *Penicillium* spp. na plodovima jabuka

Odabrani izolati *Penicillium* spp. (ukupno 15 izolata: sedam izolata *P. expansum*, sedam izolata *P. crustosum* i jedan izolat *P. solitum*) su nakon inokulacije prouzrokovali simptome plave truleži na plodovima tri sorte jabuke; Zlatni Delišeš, Crveni Delišeš i Greni Smit (Slika 19). Na inokulisanim plodovima jabuke oko mesta inokulacije formirale su se meke, svetlosmeđe do smeđe pege, pravilnog ili nepravilnog ruba. U nekim slučajevima pege su bile koncentrično zonirane. Plavozelena sporulacija je na plodovima bila prisutna samo oko povrede. U nekim slučajevima (kao na primer nakon inokulacije plodova jabuke sorte Greni Smit izolatima *P. crustosum* (JBA8a i MRI4) oko trulog tkiva uočen je žuti prsten. Izolati *P. crustosum* su prouzrokovali trulež tamnije boje od izolata *P. expansum* (Slika 19A i B), a izolat *P. solitum* je prouzrokovao promenu boje tkiva samo oko povrede. Ova blaga nekroza je bila najuočljivija na plodovima jabuke sorte Crveni Delišeš, dok je na plodovima jabuke ostale dve sorte uočena pojava žutog prstena oko mesta inokulacije (Slika 19C). Na poprečnom preseku plodova jabuke, jasno se uočavala razlika u boji tkiva ploda jabuke zaraženog *P. expansum* i *P. crustosum*, kao i razlika u prisustvu sporulacije: *P. crustosum* je na sve tri sorte prouzrokovao pojavu truleži tamnije boje i sporulacija je bila prisutna u unutrašnjosti plodova, duž povrede (posebno izražena na inokulisanim plodovima jabuke sorte Crveni Delišeš), dok je *P. expansum* prouzrokovao svetliju trulež tkiva, a sporulacija je uočena samo na mestu inokulacije, a ne i u unutrašnjosti ploda jabuke (Slika 19).



Slika 19. Simptomi plave truleži na plodovima jabuke sorti Zlatni Delišeš, Crveni Delišeš i Greni Smit inokulisanim *P. expansum* (A), *P. crustosum* (B) i *P. solitum* (C) nakon devet dana od inokulacije.

Virulentnost izolata *P. expansum* i *P. crustosum*, određena na osnovu prečnika pega na inokulisanim plodovima tri sorte jabuke sedam i devet dana nakon inokulacije pri temperaturi $24\pm 2^{\circ}\text{C}$, prikazana je u Tabeli 16 i Grafikonima 5 i 6. Izolat *P. solitum* (DRI3) je bio patogen, ali je ispoljio slabu virulentnost (prečnici pega nisu prikazani). Prosečan prečnik pega prouzrokovan izolatima *P. expansum* na inokulisanim plodovima jabuke sorte Zlatni Delišeš nakon sedam dana iznosio je od 17,00 do 21,31 mm (prosek 19,83 mm), dok je nakon devet dana iznosio od 24,25 do 29,75 mm (prosek 26,52 mm). Prosečno dnevno povećanje pege iznosilo je 3,35 mm. Na plodovima jabuke sorte Crveni Delišeš prosečan prečnik pega nakon sedam dana od inokulacije bio je od 17,81 do 29,63 mm (prosek 23,42 mm), a nakon devet dana je bio od 21,88 do 37,25 (prosek 29,70 mm). Prosečan dnevni porast pega iznosio je 3,14 mm. Na plodovima jabuke sorte Greni Smit nakon sedam dana prosečan prečnik pege bio je od 13,50 do 15,94 mm (prosek 14,60 mm), a nakon devet dana od 13,88 do 19,94 mm (prosek 17,14 mm). Prosečno dnevno povećanje pege iznosio je 1,08 mm. Statistički značajna razlika u virulentnosti između *P. expansum* izolata utvrđena je na plodovima jabuke sorte Crveni Delišeš nakon sedam dana ($p < 0,0001$).

Prosečan prečnik pega prouzrokovanih izolatima *P. crustosum* na inokulisanim plodovima jabuke sorte Zlatni Delišeš iznosio je od 16,44 do 20,25 mm (prosek 18,08 mm) nakon sedam i od 19,50 do 28,69 mm (23,05 mm) nakon devet dana (prosečni dnevni porast 2,48 mm). Na inokulisanim plodovima jabuke sorte Crveni Delišeš prečnik pega nakon sedam dana bio je od 14,56 do 18,44 mm (prosek 16,31 mm), a nakon devet dana 18,31 do 22,63 mm (prosek 20,18 mm). Prosečno dnevno povećanje pege bilo je 1,93 mm. Na plodovima jabuke sorte Greni Smit nakon sedam dana prečnik pege je bio od 6,94 do 16,94 mm (12,52 mm), a nakon devet dana od 7,25 do 18,25 mm (14,67 mm). Statistički značajna razlika u virulentnosti između izolata zabeležena je na plodovima sorte Greni Smit nakon sedam dana ($p < 0,0001$). Klaster analiza na osnovu prečnika pega koje su prouzrokovali izolati *P. crustosum*, grupisala je izolate u tri grupe na isti način kao i klaster analiza na osnovu porasta kolonija na diferencijalnim podlogama (Slika 16), što odgovara i filogenetskom razdvajanju izolata na osnovu multilokus analize i analize *RPB2* genskog regiona.

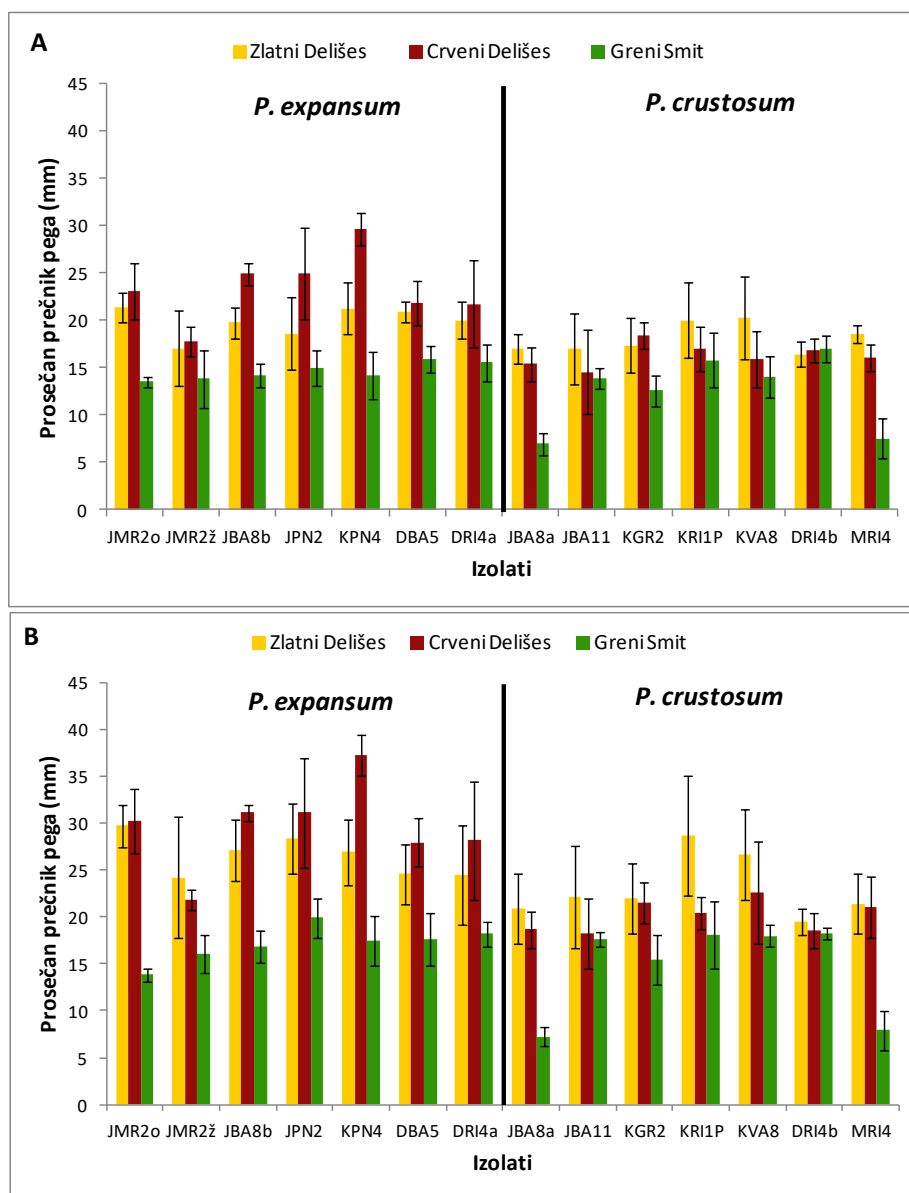
Na osnovu veličine pega prouzrokovanih izolatima *Penicillium* spp. na inokulisanim plodovima jabuke, utvrđeno je da je *P. expansum* bio virulentniji od *P. crustosum* posle sedam (Zlatni Delišeš $p = 0,003$, Crveni Delišeš $p < 0,0001$, Greni Smit $p = 0,001$) i devet dana od inokulacije (Zlatni Delišeš $p < 0,0001$, Crveni $p = 0,001$, Greni Smit $p = 0,002$). Virulentnost vrsta zavisila je i od sorte jabuke pa je tako, *P. expansum* je bio najvirulentniji na plodovima jabuke sorte Crveni Delišeš, ($p < 0,0001$), dok je *P. crustosum* bio podjednako virulentan na plodovima jabuke sorti Zlatni Delišeš i Crveni Delišeš posle sedam dana inkubacije ($p = 0,015$). Obe vrste su najslabiju virulentnost ispoljile na plodovima jabuke sorte Greni Smit, a najveća razlika u virulentnosti između *P. expansum* i *P. crustosum* ispoljila se na plodovima jabuke sorte Crveni Delišeš.

Tabela 16. Virulentnost izolata *Penicillium* spp. na plodovima jabuke različitih sorti nakon sedam (7 dpi) i devet (9 dpi) dana posle inokulacije.

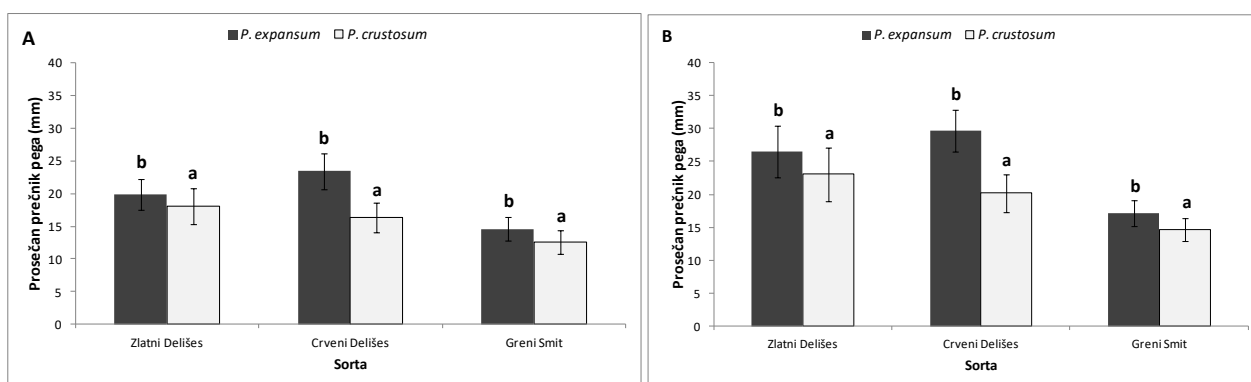
Izolati	Prosečan prečnik pege (mm) ± SD					
	7 dpi			9 dpi		
<i>P. expansum</i>						
	Zlatni Delišeš	Crveni Delišeš	Grani Smit	Zlatni Delišeš	Crveni Delišeš	Grani Smit
JMR2o	21,31±1,56a*	23,00±2,96ab	13,50±0,60a	29,75±2,30a	30,31±3,40bc	13,88±0,69a
JMR2ž	17,00±3,99a	17,81±1,56a	13,81±3,01a	24,25±6,50a	21,88±1,09a	16,06±2,03ab
JBA8b	19,75±1,65a	24,94±1,18bc	14,19±1,22a	27,19±3,25a	31,13±0,83bc	16,81±1,75abc
JPN2	18,63±3,81a	25,00±4,83bc	15,00±1,91a	28,38±3,72a	31,13±5,79bc	19,94±2,09c
KPN4	21,25±2,70a	29,63±1,77c	14,19±2,43a	26,94±3,53a	37,25±2,19c	17,50±2,63abc
DBA5	20,88±1,13a	21,89±2,36ab	15,94±1,43a	24,63±3,17a	28,00±2,55ab	17,75±2,86bc
DRI4a	20,00±1,95a	21,69±4,59ab	15,56±1,94a	24,50±5,28a	28,19±6,31ab	18,19±1,33bc
Prosek	19,83±2,40b**	23,42±2,75b	14,60±1,79b	26,52±3,96b	29,70 ± 3,17b	17,14±1,91b
<i>P. crustosum</i>						
JBA8a	17,00±1,63a	15,38±1,77a	6,94±1,12a	20,88±3,73ab	18,69±1,98a	7,25±1,00a
JBA11	16,94±3,74a	14,56±4,46a	13,88±1,16bc	22,13±5,44ab	18,31±3,76a	17,69±0,80b
KGR2	17,38±2,84a	18,44±1,37a	12,56±1,66b	22,00±3,68ab	21,56±2,23a	15,50±2,63b
KRI1P	20,00±3,94a	16,94±2,34a	15,81±2,83cd	28,69±6,45b	20,44±1,76a	18,06±3,57b
KVA8	20,25±4,42a	15,94±2,98a	14,00±2,19bc	26,69±4,89ab	22,63±5,42a	18,00±1,18b
DRI4b	16,44±1,29a	16,88±1,25a	16,94±1,43d	19,50±1,39a	18,56±1,94a	18,25±0,60b
MRI4	18,56±0,98a	16,06±1,40a	7,50±2,12a	21,44±3,23ab	21,06±3,27a	7,94±2,09a
Prosek	18,08 ± 2,69a	16,31±2,22a	12,52±1,79a	23,05±4,12a	20,18±2,91a	14,67±1,70a

*Vrednosti označene različitim slovima predstavljaju statistički značajnu razliku u prečniku pega između izolata iste vrste po Tukey HSD testu ($p < 0,01$).

** Vrednosti u boldu označene različitim slovima predstavljaju statistički značajnu razliku u prosečnoj veličini prečnika između vrsta po Tukey HSD testu ($p < 0,01$).



Grafikon 5. Virulentnost izolata *Penicillium* spp. na plodovima jabuke sorti Zlatni Delišeš, Crveni Delišeš i Greni Smit, sedam (A) i devet dana (B) od inokulacije. Vertikalni bar označava standardnu devijaciju aritmetičke sredine.



Grafikon 6. Virulentnost *P. expansum* i *P. crustosum* na plodovima jabuke sorti Zlatni Delišeš, Crveni Delišeš i Greni Smit, sedam (A) i devet dana (B) od inokulacije. Vertikalni bar označava standardnu devijaciju aritmetičke sredine. Vrednosti označene različitim slovima predstavljaju statistički značajnu razliku u prečniku pega između vrsta *P. expansum* i *P. crustosum* po Tukey HSD testu ($p < 0,01$).

Dvofaktorskom analizom varijanse utvrđeno je da veličina pege u velikoj meri zavisi kako od sorte jabuke ($\eta^2 = 0,42$ nakon sedam dana; $\eta^2 = 0,48$ nakon devet dana od inokulacije), tako i od *Penicillium* vrste ($\eta^2 = 0,24$ nakon sedam dana; $\eta^2 = 0,25$ nakon devet dana od inokulacije) (Tabela 17). Zajednički efekat oba faktora imao je srednji uticaj na veličinu pege ($\eta^2 = 0,12$ nakon sedam dana; $\eta^2 = 0,11$ nakon devet dana), što znači da kombinacija najvirulentnijeg patogena i najosetljive sorte (*P. expansum* + Crveni Delišeš) pogoduje bržem razvoju bolesti, dok je razvoj bolesti sporiji u slučaju slabije virulentnog patogena i otpornije sorte (*P. crustosum* + Grani Smit).

Tabela 17. Uticaj vrste patogena i sorte jabuke na veličinu pege na plodovima sedam (7 dpi) i devet (9 dpi) dana posle inokulacije izolatima *Penicillium* spp.

Faktor	p vrednost	7 dpi			9 dpi		
		Veličina uticaja (η^2)			Veličina uticaja (η^2)		
Vrsta patogena	p<0,0001	0,237 velik			p<0,0005	0,252 velik	
Sorta jabuke	p<0,0001	0,419 velik			p<0,0005	0,475 velik	
Vrsta*Sorta	p<0,0001	0,123 srednji			p<0,0005	0,110 srednji	

5.8. Uporedna analiza izolata *Penicillium* spp.

Klaster analiza. Poređenjem dobijenih rezultata uočeno je grupisanje izolata u okviru vrste *P. expansum* na osnovu morfoloških i molekularnih karakteristika (Tabela 18). Na osnovu klaster analize morfoloških odlika ustanovljeno je razdvajanje izolata *P. expansum* u dve grupe (Slika 15). Izolate prve grupe (11 od 18 izolata) karakteriše brži porast kolonija, bež boja (odsustvo žutog pigmenta) naličja kolonija na PDA i MEA, kao i kremroze do kremcrveno naličje kolonija na CYA podlozi. Izolate druge grupe (sedam izolata) odlikuje sporiji porast kolonija, žuta boja naličja (prisustvo žutog pigmenta) kolonija na PDA i MEA podlogama i različita obojenost naličja kolonija na CYA podlozi (krem, žuta ili kremcrvena). Ovakvo grupisanje izolata je potvrđeno i analizom sekvenci *BenA* i *CaM* gena, što je jasno uočljivo i na filogenetskim stablima (Slika 10). Razdvajanje u dve grupe potvrđeno je i filogenetskom analizom *RPB2* genskog regiona (Slika 10), kao i multigenskim filogenetskim analizama, sa izuzetkom premeštanja 3 izolata iz jedne u drugu grupu (Slika 11 i 12). Na osnovu drugih morfoloških karakteristika, kao i virulentnosti nije uočeno grupisanje i razdvajanje izolata *P. expansum*.

Kod izolata *P. crustosum* (sedam izolata) klaster analiza na osnovu brzine porasta kolonija na diferencijalnim podlogama (MEA, CYA i YES) (Slika 16) razdvojila je tri grupe izolata. Ovakvo razdvajanje podržano je razlikama u virulentnosti, molekularnim karakteristikama *RPB2* genskog regiona i multilokus filogenetskom analizom (Tabela 19; Slika 10, 11 i 12).

Tabela 18. Grupisanje izolata *P. expansum* na osnovu makromorfologije i filogenije.

	Makromorfologija (Klaster analiza: Prečnik kolonije, naličje na PDA, MEA, CYA)	Filogenija	
		<i>BenA</i> <i>CaM</i>	<i>RPB2</i> Multilokus
I grupa	JRad4 *	JRad4	JRad4
	3JČ11	3JČ11	3JČ11
	3JČ23	3JČ23	3JČ23
	KPN4	3JB13	3JB13
	DRI4a	3SD3	3SD3
	3SD5	3SD5	3SD5
	3MR1	3MR1	3MR1
	JBA8b	JBA8b	JBA8b
	JPN2	JPN2	JPN2
		KPN4	KPN4
		DRI4a	DRI4a
			3JB22
			3Š1
II grupa			KŠA5
	3JB22	3JB22	
	3Š1	3Š1	
	KŠA5	KŠA5	
	3JČ6	3JČ6	3JČ6
	JMR2o	JMR2o	JMR2o
	JMR2ž	JMR2ž	JMR2ž
	DBA5	DBA5	DBA5

* Izolati u boldu su se stabilno pozicionirali u grupi na osnovu navedenih karakteristika.

Tabela 19. Grupisanje izolata *P. crustosum* na osnovu brzine porasta kolonija, virulentnosti i filogenije.

	Prečnik kolonije na MEA, CYA i YES, Virulentnost	Filogenija <i>RPB2</i> , Multilokus
I grupa	KRI1P*	KRI1P
	KVA8	KVA8
	KGR2	
II grupa		KGR2
	JBA11	JBA11
	DRI4b	DRI4b
III grupa	JBA8a	JBA8a
	MRI4	MRI4

* Izolati u boldu su se stabilno pozicionirali u grupi na osnovu svih navedenih karakteristika.

Analiza glavnih komponenti (PCA). Sličnosti, razlike i moguće korelacije među ispitivanim izolatima (26) na osnovu makro- i mikromorfoloških parametara posmatrane su i primenom PCA analize (Grafikon 7). Od ukupne zabeležene varijanse u datom setu podataka 58,31% varijanse je objašnjeno putem prve i druge komponente. Komponenta 1 (PC1) objašnjava 37,93% varijanse i negativno je korelisana sa prečnikom kolonija na PDA, CYA i YES podlogama, a pozitivno korelisana sa širinom metula i konidija (Tabela 20). Komponenta 1 je jasno izdvojila izolate sa brže rastućim kolonijama i užim konidijama i metulama, koji su grupisani na levoj strani grafikona 7 i izolate sa sporije rastućim kolonijama i širim konidijama i metulama, koje su pozicionirani na desnoj strani grafikona 7. Komponenta 2 (PC2) koja objašnjava 20,38% varijanse je pozitivno korelisana sa prečnikom kolonija na MEA i PDA podlogama i širinom metula i rama, dok je negativno korelisana sa obojenošću naličja kolonije na CYA podlozi (crvena i roze boja naličja je označena nižim vrednostima od žute i krem boje) (Tabela 20). Komponenta 2 razdvaja izolate sa brže rastućim

kolonijama na MEA i PDA podlogama, sa kolonijama čije je naličje na CYA obojeno u crvenu ili roze nijansu i sa širim metulama i ramama (Grafikon 7, gore) od izolata sa sporije rastućim kolonijama na MEA i PDA, sa kolonijama čije je naličje na CYA obojeno u žuto ili krem i užim metulama i ramama (Grafikon 7, dole).

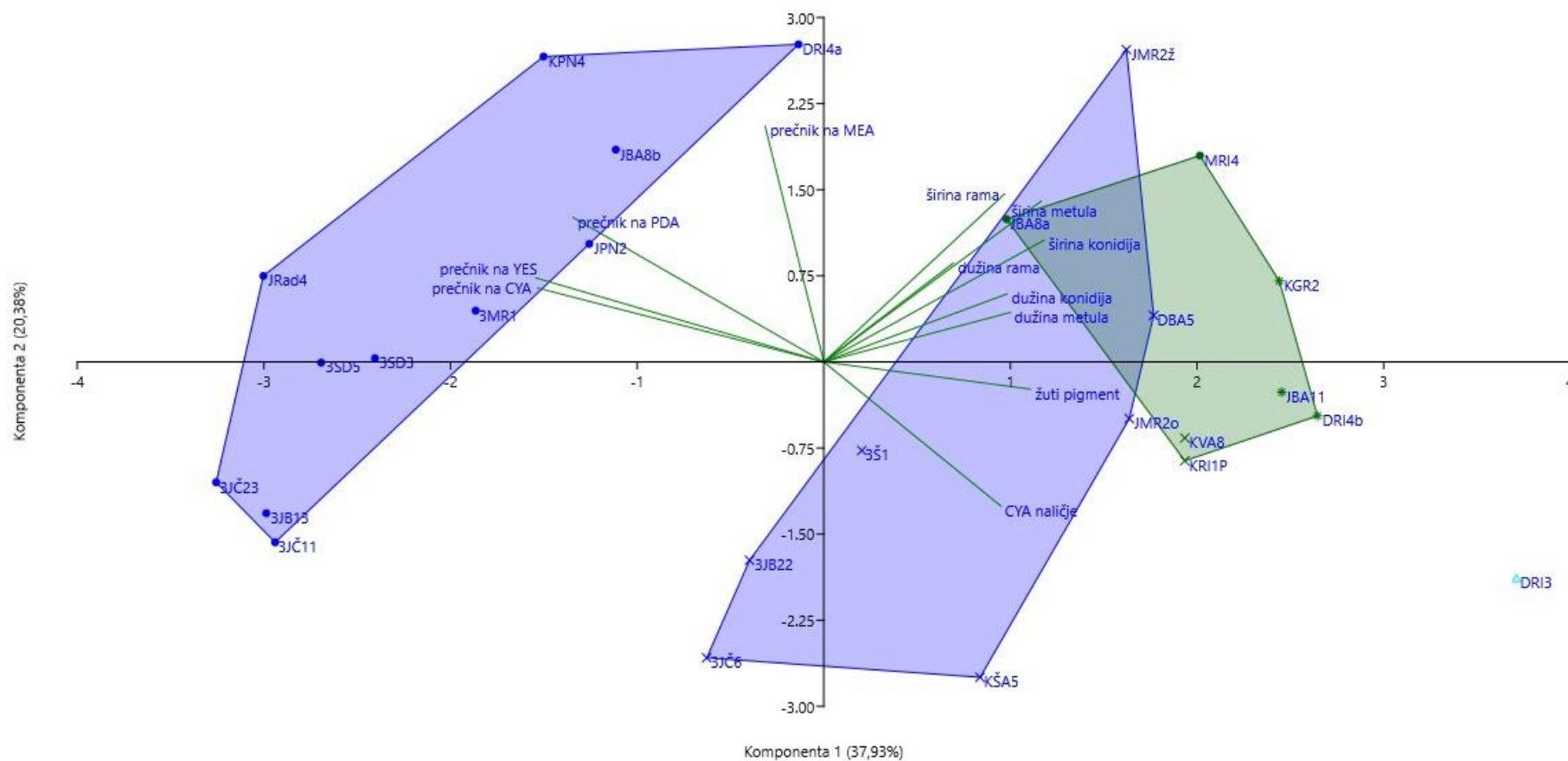
Rezultati PCA analize jasno pokazuju dve grupe u okviru vrste *P. expansum*, što odgovara rezultatima filogenetske analize *BenA* i *CaM* sekvenci i klaster analizi na osnovu makromorfoloških parametara (Slika 10 i 15). Takođe, na Grafikonu 7 se može uočiti i bliskost druge grupe izolata *P. expansum* sa izolatima *P. crustosum* u navedenim parametrima.

Tabela 20. Opterećenje varijabli (morfološke karakteristike izolata *Penicillium* spp.) dobijenih analizom glavnih komponenti.

Parametri	Komponenta 1 (PC1)	Komponenta 2 (PC2)
Prečnik na PDA*	-0,348	0,326
Prečnik na MEA	-0,082	0,533
Prečnik na CYA	-0,397	0,167
Prečnik na YES	-0,400	0,190
Dužina konidija	0,254	0,154
Širina konidija	0,306	0,275
Dužina metula	0,259	0,112
Širina metula	0,302	0,363
Dužina rama	0,180	0,223
Širina rama	0,251	0,379
Prisustvo/odsustvo žutog pigmenta	0,287	-0,061
Naličje na CYA	0,246	-0,325

* Vrednosti u boldu u najvećoj meri objašnjavaju varijansu i sačinjavaju prvi ili drugu komponentu.

Grafikon 7. Grupisanje ispitivanih izolata *Penicillium* spp. (26 izolata) na osnovu morfoloških karakteristika primenom PCA analize.



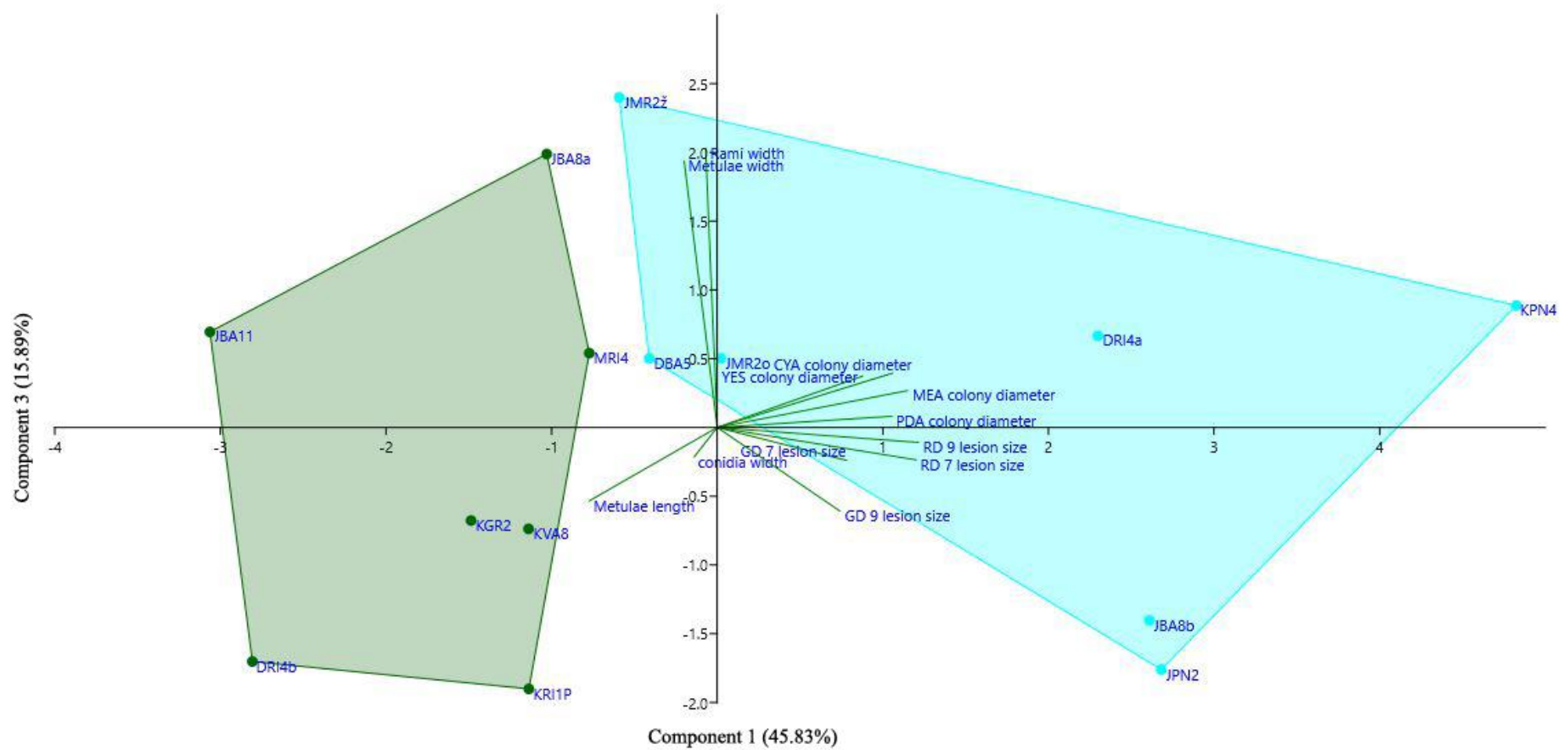
PCA analiza zasnovana na virulentnosti, makroskopskim i mikroskopskim morfološkim karakteristikama odabranim na osnovu korelacione analize 14 ispitivanih izolata (sedam *P. expansum* i sedam *P. crustosum*) prikazana je na Grafikonu 8. Od ukupne varijanse, 61,72% je objašnjeno putem prve i treće komponente. Komponenta 1 (PC1) objašnjava 45,83% varijanse i pozitivno je korelisana sa prečnikom kolonija na sve četiri ispitivane podloge i prečnikom pega na plodovima jabuke sorte Crveni Delišeš nakon sedam i devet dana od inokulacije (Tabela 21). Komponenta 1 jasno razdvaja izolate koji su virulentniji i imaju brži porast (Grafikon 8, desno) od slabije virulentnih izolata sa sporijerastućim kolonijama (Grafikon 8, levo). Komponenta 3 koja objašnjava 15,89% varijanse je jako pozitivno korelisana sa širinom metula i rama (Tabela 18), te razdvaja izolate koji formiraju šire metule i rame (Grafikon 8, gore) od izolata sa užim metulama i ramama (Grafikon 8, dole).

Rezultati PCA analize jasno razdvajaju *P. expansum* od *P. crustosum* izolata: izolati *P. expansum* su virulentniji i formiraju kolonije bržeg porasta od izolata *P. crustosum*. Međutim, uočava se i da dva izolata *P. expansum* (DBA5 i JMR2ž) imaju veliku sličnost (veoma su bliska) sa izolatima *P. crustosum*.

Tabela 21. Opterećenje varijabli (morfološke karakteristike i virulentnost *P. expansum* i *P. crustosum*) dobijenih analizom glavnih komponenti.

Parametri	Komponenta 1	Komponenta 3
Prečnik na PDA*	0,351	0,027
Prečnik na MEA	0,381	0,089
Prečnik na CYA	0,351	0,1311
Prečnik na YES	0,292	0,124
Širina konidija	-0,046	-0,071
Dužina metula	-0,257	-0,177
Širina metula	-0,066	0,643
Širina rama	-0,023	0,674
Prečnik pega na sorti Z. Delišeš 7 dpi	0,259	-0,080
Prečnik pega na sorti C. Delišeš 7	0,400	-0,078
Prečnik pega na sorti Z. Delišeš 9 dpi	0,246	-0,202
Prečnik pega na sorti C. Delišeš 9	0,404	-0,036

* Vrednosti u boldu u najvećoj meri objašnjavaju varijansu i sačinjavaju prvu ili treću komponentu.



Grafikon 8. Grupisanje ispitivanih izolata *Penicillium expansum* i *P. crustosum* (14 izolata) na osnovu morfoloških karakteristika i virulentnosti primenom PCA analize

5.9. Fiziološke promene u plodovima jabuke inokulisanim *Penicillium expansum* i *P. crustosum*

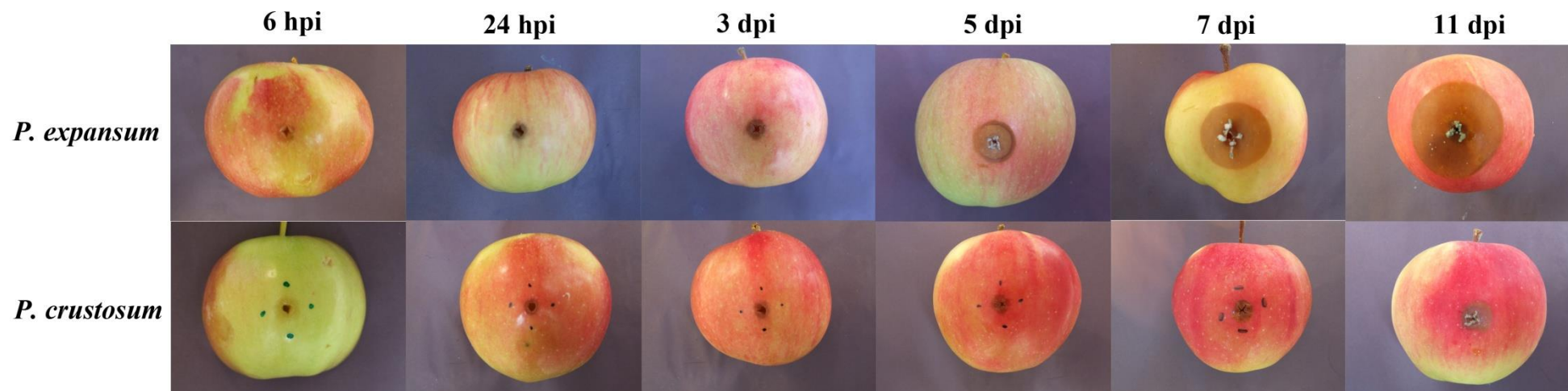
5.9.1. Razvoj simptoma na inokulisanim plodovima

Na plodovima jabuke sorte Ajdared, inokulisanim izolatima *P. expansum* i *P. crustosum*, u kojima su ispitivane patofiziološke promene tokom kolonizacije, praćen je i razvoj simptoma. Nakon 24 h posle inokulacije (24 hpi) uočena je promena boje tkiva na mestu povrede na plodovima jabuke inokulisanim izolatima *P. expansum* i *P. crustosum*, ali se dalji razvoj simptoma razlikovao: simptomi truleži nakon inokulacije *P. expansum* su uočeni ranije i bili su jačeg intenziteta, odnosno pege su bile većeg prečnika (Slika 20).

Prvi simptomi plave truleži prouzrokovani vrstom *P. expansum* uočeni su trećeg dana od inokulacije (3dpi), u vidu svetlo smeđih, vodenastih pega prosečnog prečnika 6,1 mm. Petog dana nakon inokulacije *P. expansum* prosečan prečnik pega je iznosio 12,48 mm i uočena je sporulacija oko povrede, a sedmog dana nakon inokulacije prečnik pega je u proseku iznosio 23,17 mm. Nakon 11 dana od inokulacije prosečan prečnik pege je iznosio 37,92 mm, a na mestu povrede i na pokožici ploda oko povrede uočena je plavozelena sporulacija gljive.

Simptomi plave truleži prouzrokovani vrstom *P. crustosum* su uočeni petog dana nakon inokulacije u vidu svetlo smeđe truleži oko povrede. Prosečni prečnik pega pet dana nakon inokulacije je iznosio je 6,88 mm, nakon sedam dana 7,86 mm, a nakon 11 dana 10,41 mm. Nakon 11 dana od inokulacije uočena je sporulacija oko mesta povrede na plodu.

Simptomi na inokulisanim plodovima jabuke manifestovali su se na sličan način, ali je *P. expansum* prouzrokovao formiranje pega većeg prečnika od *P. crustosum* pri svim ispitivanim terminima. Sporulacija na plodu jabuke inokulisanom *P. expansum* uočena je ranije i bila je većeg intenziteta u odnosu na sporulaciju *P. crustosum* (Slika 20). Na povređenom plodu *mock* (M) promena boje tkiva na mestu povrede uočena je nakon 24 h, koja se nije dalje menjala 11 dana posle povređivanja. Na nepovređenom plodu - kontrola (K) nije bilo promena.



Slika 20. Razvoj simptoma na plodovima jabuke sorte Ajdared zaraženim *P. expansum* i *P. crustosum* 6 i 24 h posle inokulacije (hpi) i 3, 5, 7 i 11 dana posle inokulacije (dpi). Oznake oko pega predstavljaju mesta odakle je uzorkovano tkivo ploda za analizu.

5.9.2. Promene u sadržaju šećera (saharoza, glukoza i fruktoza)

Plodovi jabuke inokulisani *P. expansum*. U plodovima jabuke inokulisanim izolatom *P. expansum*, početna reakcija (6 h posle inokulacije; 6 hpi) ogledala se u povećanju sadržaja saharoze, koje u poređenju sa neinokulisanom kontrolom nije bilo statistički značajno. Razvojem bolesti, 24 hpi i 3 dana posle inokulacije (3 dpi) koncentracija saharoze se smanjivala i 5 dpi je uočen dinamičan odgovor ploda jabuke u vidu značajnog povećanja sadržaja saharoze (za 57%). U kasnijim fazama infekcije 7 i 11 dpi sadržaj saharoze se smanjivao (Grafikon 9A i B, Tabela 22).

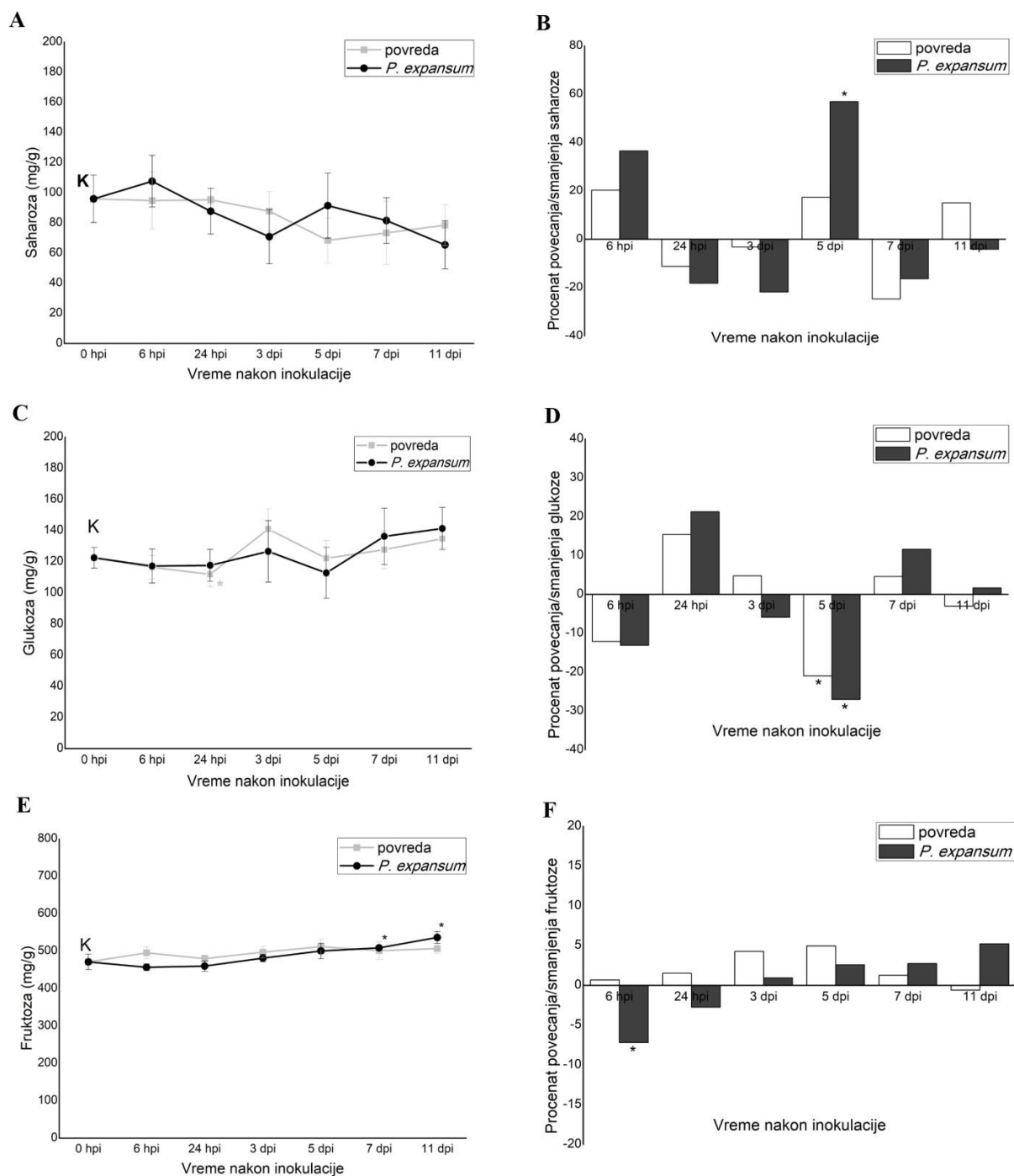
Sadržaj glukoze se u početnoj fazi bolesti (6 hpi) smanjio, a 24 hpi povećao u odnosu na kontrolu datog termina. U toku razvoja bolesti (5dpi) sadržaj glukoze značajno smanjio za 27%. U kasnijim fazama bolesti (7 i 11 dpi) koncentracija se povećala i bila je viša u odnosu na kontrolu. Sličan odgovor, odnosno smanjenje koncentracije glukoze (-21 %) uočeno je u povređenom plodu (*mock*) 5dpi (Grafikon 9C i D, Tabela 22).

Sadržaj fruktoze u inokulisanom plodu jabuke u početnoj fazi bolesti 6 hpi se značajno smanjio (za 7%) u odnosu na kontrolu. Nakon naglog smanjenja 6 hpi sadržaj fruktoze se postepeno povećavao, tako da su se koncentracije u kasnoj fazi infekcije (7 i 11 dpi) značajno povećale u odnosu na početnu kontrolu (Grafikon 9E i F). Promene u povređenim plodovima pratile su promene u plodovima zaraženim *P. expansum*, ali su bile manjeg intenziteta (Grafikon 9, Tabela 22).

Plodovi jabuke inokulisani *P. crustosum*. U plodovima jabuke inokulisanim izolatom *P. crustosum*, početna reakcija (6 hpi) bila je u vidu blagog povećanja koncentracije saharoze. Nakon (24 hpi i 3 dpi). Sadržaj saharoze se povećavao u inokulisanom plodu i *mock* kontroli. U kasnijim fazama bolesti (7 dpi) uočeno je naglo povećanje saharoze u inokulisanom plodu i 11 dpi sadržaj saharoze se smanjio što je bilo suprotno od uočenih promena u *mock* kontroli (Grafikon 10A i B, Tabela 22).

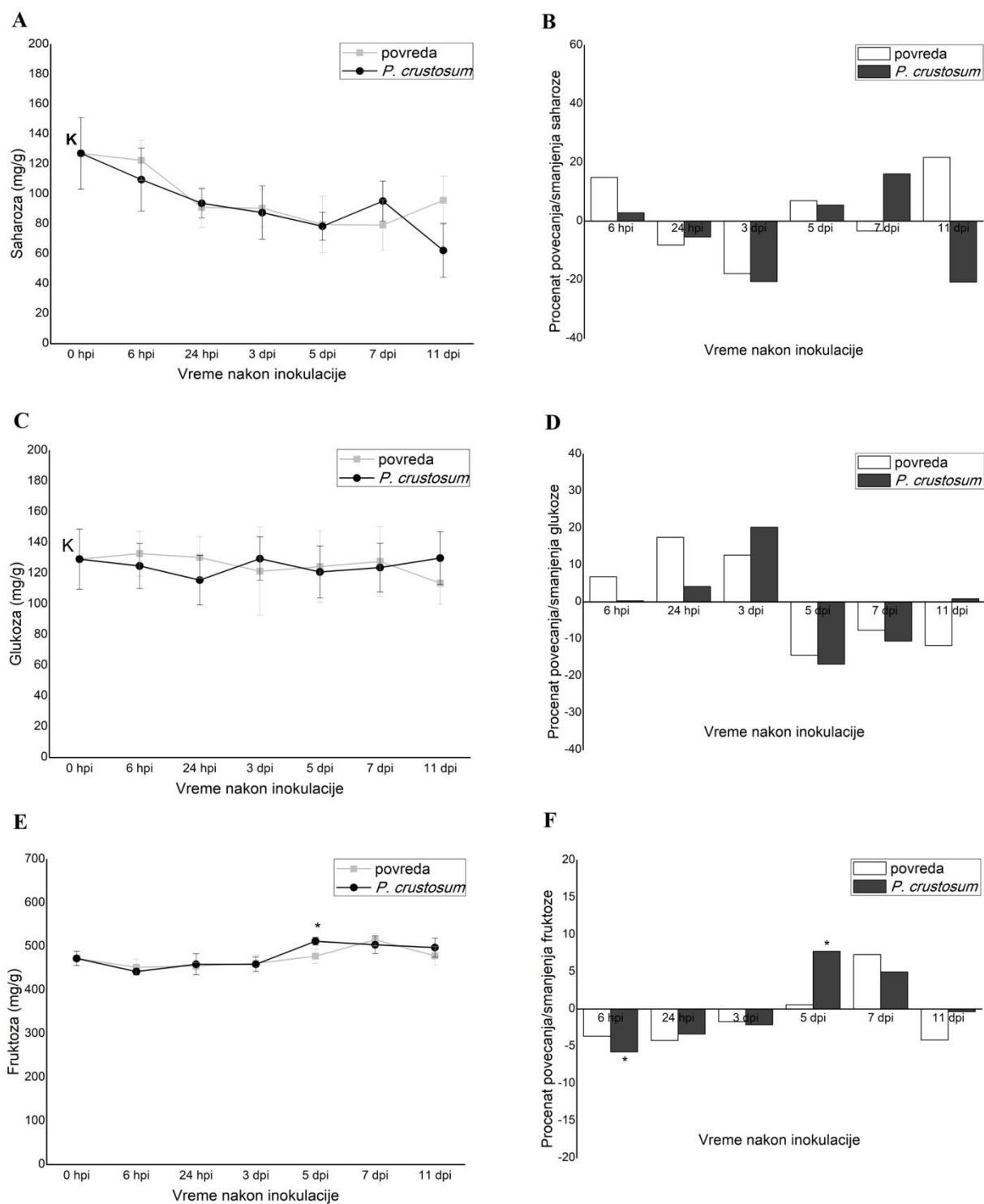
Koncentracija glukoze se povećala 3 dpi, a 5 i 7 dpi se naglo smanjila i 11 dpi bila slična sadržaju glukoze u kontroli. U povređenom plodu (*mock* kontroli) koncentracija glukoze nakon povređivanja (6hpi-3dpi) je naglo porasla (Grafikon 10C i D, Tabela 22).

Značajano smanjenje sadržaja fruktoze (-6%) u odnosu na kontrolu istog termina bilo je početna reakcija (6 hpi) ploda jabuke inokulisanog *P. crustosum*. Sadržaj fruktoze se zatim postepen povećavao (24 hpi i 3 dpi), a 5 dpi sadržaj fruktoze se značajno povećao (8%). Sadržaj fruktoze se nakon naglog povećanja 5 dpi smanjivao i 11 dpi dostigao približnu vrednost kao i kontrola istog termina (Grafikon 10E i F, Tabela 22). U povređenim plodovima jabuke promene u sadržaju šećera su se poklapale sa promenama u plodovima zaraženim izolatom *P. crustosum*. Intezivnije razlike u sadržaju šećera između povređenog i inokulisanog uočene su 6 hpi i 5 dpi kada je došlo do smanjenja pa naglog povećanja koncentracije fruktoze kod zaraženih plodova i 7 i 11 dpi kada je došlo do naglog povećanja i odmah zatim naglog smanjenja koncentracije saharoze (Grafikon 10, Tabela 22).



Grafikon 9. Koncentracija šećera u *P. expansum* inokulisanim plodovima jabuke i povređenim plodovima u poređenju sa početnom kontrolom ($p < 0,00833$) (A saharoza, C glukoza i E fruktoza) i promene u koncentraciji šećera u inokulisanim i povređenim plodovima jabuke u odnosu na kontrolu istog termina ($p < 0,025$) (B saharoza, D glukoza i F fruktoza).

*označava statistički značajno povećanje ili smanjenje šećera u odnosu na kontrolu



Grafikon 10. Koncentracija šećera u *P. crustosum* inokulisanim plodovima jabuke i povređenim plodovima u poređenju sa početnom kontrolom ($p < 0,00833$) (A saharoza, C glukoza i E fruktoza) i promene u koncentraciji šećera u inokulisanim i povređenim plodovima jabuke u odnosu na kontrolu istog termina ($p < 0,025$) (B saharoza, D glukoza i F fruktoza).

*označava statistički značajno povećanje ili smanjenje sadržaja šećera u odnosu na kontrolu

5.9.3. Promene u sadržaju organskih kiselina

Plodovi jabuke inokulisani *P. expansum*. U plodovima jabuke inokulisanim *P. expansum*, 6 hpi značajno se smanjila koncentracija jabučne kiseline (- 20%), nakon čega je usledilo značajno povećanje od 18% 24 hpi, u poređenju sa kontrolom istog termina. U kasnijim fazama bolesti (3dpi, 5 dpi, 7 dpi) koncentracije jabučne kiseline bile su uporedive sa neinokulisanim kontrolama. Blago smanjenje sadržaja jabučne kiseline uočeno je 11 dpi (Grafikon 11A i B, Tabela 22A). Povređeni plodovi (*mock*) nisu pokazali početno smanjenje kao reakciju na povređivanje. Međutim, 24 hpi povećanje kod *mock* bilo je značajno u odnosu na kontrolu.

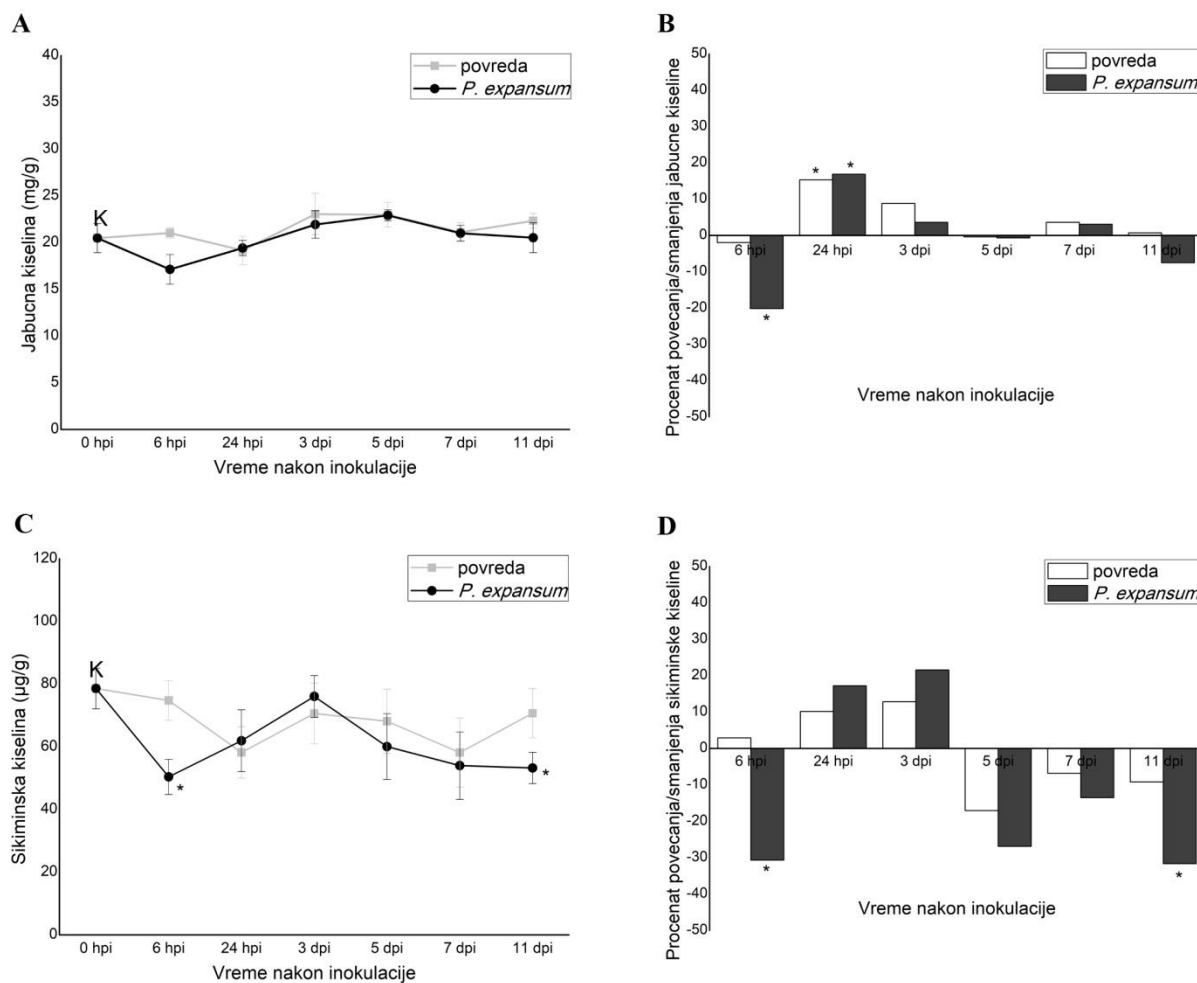
Sadržaj šikiminske kiseline u plodovima jabuke inokulisanim *P. expansum*, 6 hpi značajno se smanjio (-31%), dok se sledećeg termina analize (24 hpi) sadržaj povećao. Kasnije, tokom kolonizacije tkiva i razvoja simptoma na plodu sadržaj šikiminske kiseline je počeo znatno da se smanjuje (od 5 dpi), a 11 dpi je zabeležen značajan pad koncentracije za 32% u odnosu na kontrolu istog termina, kao i početnu kontrolu (Grafikon 11C i D, Tabela 22A).

Inicijalno smanjenje koncentracije jabučne i šikiminske kiseline (6 hpi), kao i značajno smanjenje u sadržaju šikiminske kiseline na kraju eksperimenta (11 dpi) nije zabeleženo kod povređenih plodova jabuke (Grafikon 11E i F). Međutim, 24 hpi značajno povećanje koncentracije jabučne kiseline je zabeleženo i kod zaraženih i kod povređenih plodova (Grafikon 11, Tabela 20).

Plodovi jabuke inokulisani *P. crustosum*. U plodovima jabuke inokulisanim izolatom *P. crustosum*, 6 hpi koncentracija jabučne kiseline se smanjila, a 24 hpi povećala u poređenju sa kontrolom istog termina. Kasnije u toku napredovanja bolesti nisu uočene značajne promene u koncentraciji jabučne kiseline (Grafikon 12A i B, Tabela 22B).

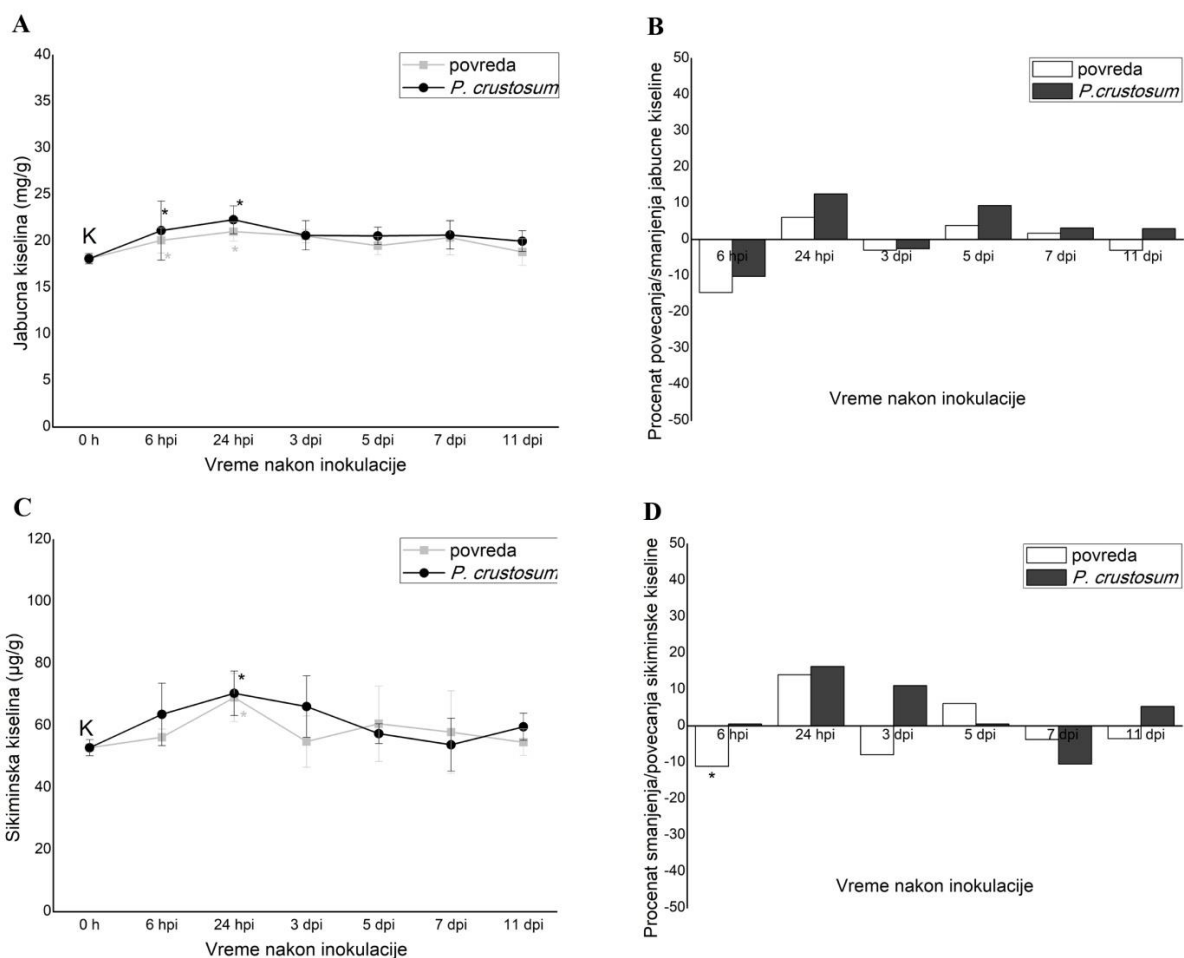
Povećanje sadržaja šikiminske kiseline je zabeleženo 24 hpi i 3 dpi, što je doprinelo da koncentracija šikiminske kiseline 3 dpi bude značajno viša nego u početnoj kontroli, dok se 7 dpi smanjila koncentracija šikiminske kiseline (Grafikon 12C i D, Tabela 22B).

Promene koncentracije i dinamika promena jabučne i šikiminske kiseline u povređenim plodovima se podudarala sa promenama u inokulisanim plodovima, osim 24 hpi i 5 dpi kada je koncentracija jabučne kiseline bila viša, dok je koncentracija šikiminske kiseline bila viša 3 dpi, a manja 7 dpi u zaraženim plodovima. Ove promene, iako ne toliko izražene, su posledica dejstva *P. crustosum*. Osim toga, 6 hpi povređeni plodovi jabuka su sadržale značajno manje koncentracije šikiminske kiseline u poređenju sa kontrolom i povređenim plodovima (Grafikon 12, Tabela 22B).



Grafikon 11. Koncentracija organskih kiselina u *P. expansum* inokulisanim i povređenim plodovima jabuke u poređenju sa početnom kontrolom ($p < 0,00833$) (A jabučna kiselina i C šikiminska kiselina) i promene u koncentraciji organskih kiselina u inokulisanim i povređenim plodovima jabuke u odnosu na kontrolu istog termina ($p < 0,025$) (B jabučna kiselina i D šikiminska kiselina).

*označava statistički značajno povećanje ili smanjenje sadržaja organskih kiselina u odnosu na kontrolu



Grafikon 12. . Koncentracija organskih kiselina u *P. crustosum* inokulisanim i povređenim plodovima jabuke u poređenju sa početnom kontrolom ($p < 0,00833$) (A jabučna kiselina i C šikiminska kiselina) i promene u koncentraciji organskih kiselina u inokulisanim i povređenim plodovima jabuke u odnosu na kontrolu istog termina ($p < 0,025$) (B jabučna kiselina i D šikiminska kiselina).

*označava statistički značajno povećanje ili smanjenje sadržaja organskih kiselina u odnosu na kontrolu

5.9.4. Promene u sadržaju antioksidanata

Plodovi jabuke inokulisani *P. expansum*. Sadržaj ukupnog glutathiona (tGSH) u plodovima jabuke inokulisanim *P. expansum*, u početnim fazama nakon inokulacije (6 hpi), se blago povećao, dok se 3 dpi sadržaj tGSH u zaraženim jabukama naglo i značajno povećao (34%) u poređenju sa neinokulisanom kontrolom. U kasnijoj fazi razvoja bolesti, 7 i 11 dpi, sadržaj tGSH se naglo smanjio (- 37% i - 50%) (Grafikon 13A i B). U povređenim plodovima početni odgovor (6 hpi) karakterisalo je značajno povećanje ukupnog glutathiona (37%) u poređenju sa neinokulisanim jabukama, što ukazuje na reakciju na povredu. Kasnije je sadržaj tGSH bio sličan kao u kontroli, dok se 7 dpi koncentracija ukupnog glutathiona značajno smanjila za 18% (Grafikon 13B).

Koncentracija ukupnog askorbata (tAA) se značajno smanjila (-14%) 6 hpi, nakon čega se povećala 24 dpi i 3 dpi. Pet dpi, koncentracija tAA se značajno smanjila (-8%) u odnosu na kontrolu, dok se 7 dpi ponovo značajno povećala za 13%. Nakon 11 dpi koncentracija tAA se smanjila (Grafikon 13C i D). Početni odgovor (6 hpi) povređenih plodova jabuka (*mock*) se karakterisao

akumulacijom ukupnog askorbata, što je suprotno odgovoru inokulisanih jabuka. Dalje su promene koncentracije bile slične, ali je interesantno značajno povećanje tAA u *mock* kontroli od 9% i 13%, 3 i 7 dpi (Grafikon 13D).

Koncentracija ukupnih fenola (tPH) nakon inokulacije plodova (6 hpi) se smanjila, a sledećih termina (24 hpi i 3 dpi) se blago povećavala, ali je bila slična kao u neinokulisanoj kontroli. Nakon 5 dpi utvrđeno je smanjenje koncentracije, 7 dpi blago povećanje i na kraju 11 dpi značajno smanjenje koncentracije tPH (–14%) (Grafikon 13E i F). Razlike u koncentraciji ukupnih fenola između *mock* kontrole i zaraženih jabuka uočene su na početku i na kraju eksperimenta, dok se u drugim datumima uzorkovanja koncentracije nisu znatno razlikovale. Šest dana posle povređivanja primećen je blagi porast koncentracije tPH kao reakcija na povredu. Nakon 11 dana koncentracija ukupnih fenola bila je slična kod povređenih i nepovređenih plodova, ali u poređenju sa početnom kontrolom koncentracija tPH je bila značajno veća posle 11 dana (Grafikon 13 F).

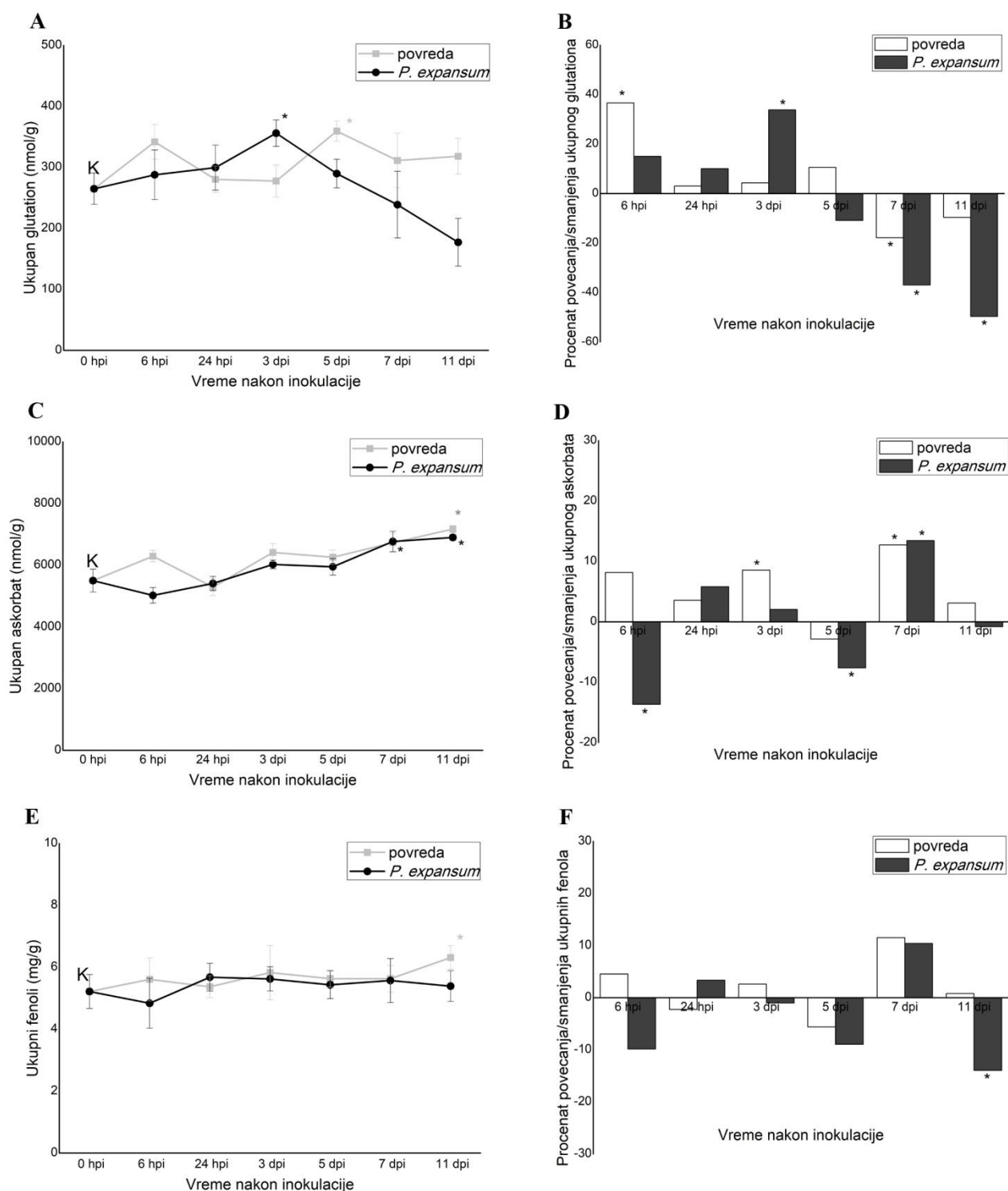
U poređenju sa povređenim plodovima, promene detektovane samo u zaraženim plodovima bile su: 6 hpi smanjenje nivoa tAA i tPH, 3 dpi povećanje tGSH, 5 dpi smanjenje tAA, 7 dpi smanjenje tGSH, a 11 dpi smanjenje tGSH i tPH. Međutim, u povređenim plodovima je primećeno znatno povećanje tGSH (6 hpi) i tAA (3 dpi) koje nije zapaženo u zaraženim plodovima (Grafikon 13, Tabela 20).

Plodovi jabuke inokulisani *P. crustosum*. U početnim fazama nakon inokulacije *P. crustosum* i povređivanja plodova jabuke (6, 24 hpi i 3 dpi) zaraženi i povređeni plodovi jabuke (*mock* kontrola) reagovali su akumulacijom ukupnog glutaciona, koji je bio manje izražen kod *mock* kontrole. Značajno povećanje koncentracije tGSH je uočeno 24 hpi i to za 47% kod zaraženih i 37% kod povređenih plodova jabuka, u poređenju sa nepovređenom kontrolom. U zaraženim plodovima jabuka sadržaj tGSH se 5 dpi neznatno se smanjio, 7 dpi ponovo povećao i 11 dpi bio je u nivou sa kontrolom (Grafikon 14A i B).

Povišena koncentracija tGSH uticala je na povećanje koncentracije ukupnog askorbata (tAA) koji se akumulirao 24 hpi, ali zatim i značajno smanjila 3 dpi kada se uporedi sa kontrolom (–4,6%). Koncentracija tAA u povređenim plodovima bila je značajno povećana (16%) u poređenju sa kontrolom (Grafikon 14C i D), dok je 7 i 11 dpi u plodovima inokulisanim *P. crustosum* i povređenim plodovima jabuke količina ukupnog askorbata bila su značajno veća u poređenju sa početnom kontrolom (Grafikon 14C), ali nešto niža 11 dpi u poređenju sa koncentracijama kontrola istog datuma uzorkovanja (Grafikon 14D).

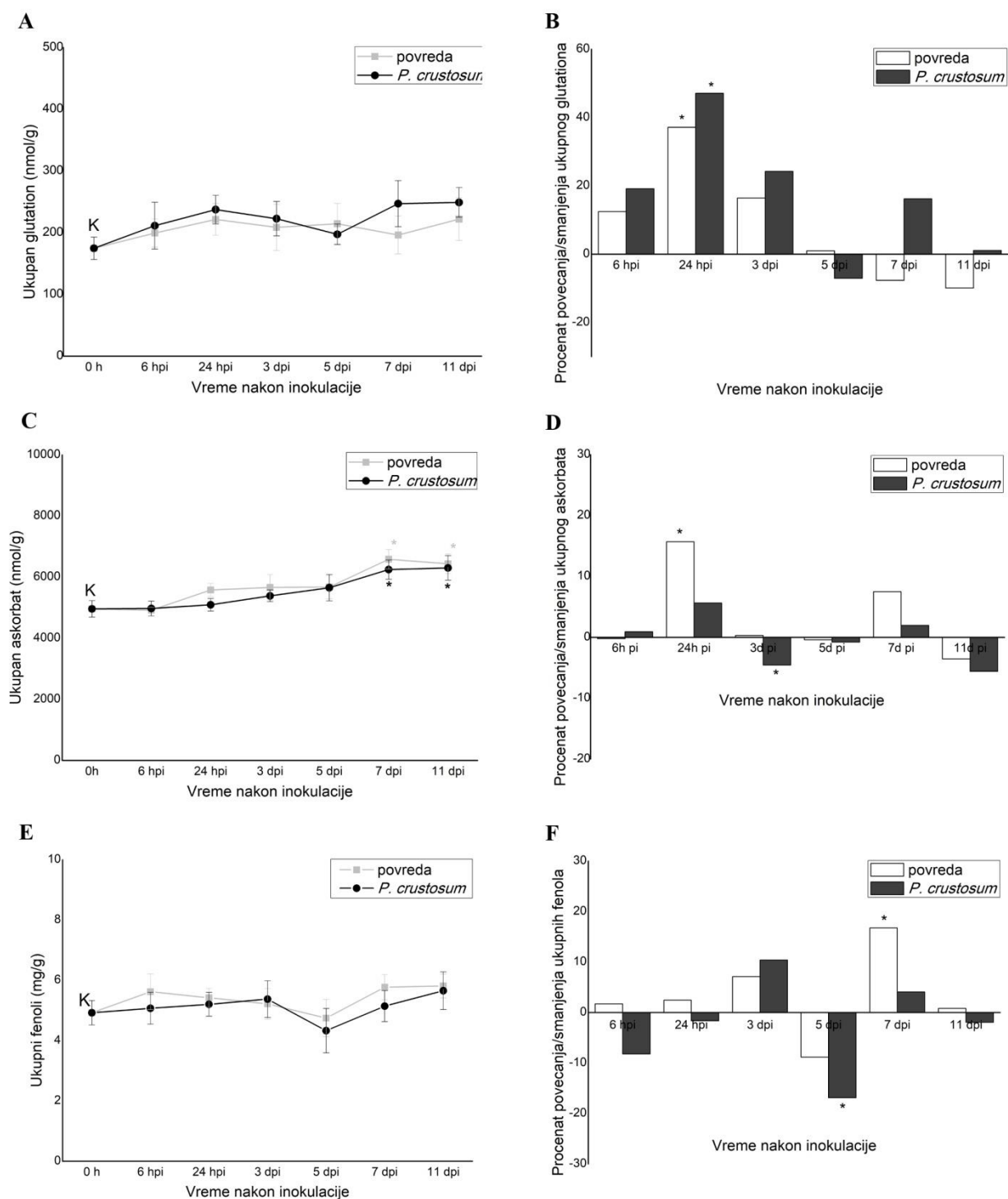
U plodovima jabuke inokulisanim *P. crustosum*, 6 hpi je došlo do smanjenja koncentracije ukupnih fenola (tPH), a zatim 3dpi koncentracija tPH je bila u porastu (Grafikon 14E i F). Petog dana od inokulacije (5 dpi) kad su primećeni prvi simptomi, koncentracija tPH se značajno smanjila (–17%), a zatim se sadržaj tPH 7 dpi povećao (Grafikon 14, Tabela 20). Sličan trend je primećen i kod povređenih plodova, iako manje izražen. Značajna razlika u koncentraciji tPH uočena je između povređenih i nepovređenih plodova 7 dpi kada je izmereno značajno povećanje tPH (17%) u povređenim plodovima (Grafikon 14F).

Promene u koncentraciji antioksidanata povređenih plodova su se u većini slučajeva podudarale sa promenama u zaraženim plodovima jabuka. Promene koje su bile većeg intenziteta u zaraženim plodovima u odnosu na povređene plodove su smanjenje koncentracije tPH 6 hpi i 5 dpi, povećanje koncentracije tGSH 24 hpi i 7 dpi i smanjenje koncentracije tAA 3 dpi. U povređenim plodovima (M) je zabeleženo značajno povećanje koncentracija tAA 24 hpi i povećanje tPH 7 dpi (Grafikoni 13 i 14).



Grafikon 13. Koncentracija antioksidanata u *P. expansum* inokulisanim i povređenim plodovima jabuke u poređenju sa početnom kontrolom ($p < 0,00833$) (A glutation, C askorbat i E fenol) i promene u koncentraciji antioksidanata u inokulisanim i povređenim plodovima jabuke u odnosu na kontrolu datog termina ($p < 0,025$) (B glutation, D askorbat i F fenol).

*označava statistički značajno povećanje ili smanjenje sadržaja antioksidanata u odnosu na kontrolu



Grafikon 14. Koncentracija antioksidanata u *P. crustosum* inokulisanim i povređenim plodovima jabuke u poređenju sa početnom kontrolom ($p < 0,00833$) (A glutation, C askorbat i E fenol) i promene u koncentraciji antioksidanata u tkivu inokulisanih i povređenih plodova jabuke u odnosu na kontrolu datog termina ($p < 0,025$) (B glutaciona, D askorbata i F fenola).

*označava statistički značajno povećanje ili smanjenje sadržaja antioksidanata u odnosu na kontrolu

Tabela 22A. Prosečna koncentracija ispitivanih metabolita inokulisanih (*P. expansum* i *P. crustosum*) i kontrolnih plodova tokom razvoja bolesti.

	Koncentracija metabolita					
	6 hpi	24 hpi	3 dpi	5 dpi	7 dpi	11 dpi
<i>P. expansum</i>						
kontrola						
Saharoza (mg/g)	107,63 ± 17,10* 78,82 ± 9,55**	87,75 ± 15,15 107,33 ± 17,79	70,88 ± 17,97 90,65 ± 17,25	91,45 ± 21,64 58,28 ± 22,27	81,56 ± 15,14 97,48 ± 15,92	65,42 ± 15,97 68,24 ± 14,53
Glukoza (mg/g)	117,21 ± 10,96 132,47 ± 5,93	117,67 ± 10,29 97,02 ± 10,21	126,60 ± 19,67 134,52 ± 6,10	112,82 ± 16,41 154,61 ± 6,47	136,30 ± 18,12 122,12 ± 12,18	141,31 ± 13,60 139,02 ± 10,88
Fruktoza (mg/g)	456,84 ± 8,74 492,25 ± 10,07	459,80 ± 13,93 472,85 ± 3,83	481,23 ± 9,96 476,79 ± 14,36	500,22 ± 20,84 487,61 ± 22,73	508,40 ± 3,26 494,91 ± 7,49	536,33 ± 15,50 509,75 ± 13,85
Jabučna kiselina (mg/g)	17,12 ± 1,58 21,44 ± 0,81	19,41 ± 0,81 16,61 ± 2,39	21,92 ± 1,47 21,17 ± 1,59	22,91 ± 0,58 23,06 ± 1,31	20,99 ± 0,81 20,37 ± 0,87	20,51 ± 1,58 22,18 ± 1,49
Šikiminska kiselina (µg/g)	50,40 ± 5,59 72,71 ± 8,37	61,93 ± 9,87 52,84 ± 6,94	76,07 ± 6,65 62,60 ± 9,50	60,07 ± 10,49 82,16 ± 6,66	53,99 ± 10,76 62,46 ± 10,36	53,25 ± 4,99 77,91 ± 11,74
Ukupan glutation (nmol/g)	287,88 ± 40,67 250,27 ± 26,48	299,58 ± 36,82 272,15 ± 42,67	356,08 ± 21,71 266,14 ± 13,06	289,81 ± 23,47 325,12 ± 27,30	238,88 ± 54,52 378,96 ± 12,37	177,21 ± 39,17 352,17 ± 36,58
Ukupan askorbat (nmol/g)	5024,77 ± 249,95 5820,41 ± 159,72	5409,44 ± 229,52 5112,60 ± 329,50	6027,48 ± 141,42 5907,78 ± 150,22	5952,18 ± 269,20 6444,49 ± 91,52	6770,48 ± 327,94 5969,02 ± 201,34	6898,05 ± 6953,97 6953,97 ± 179,81
Ukupni fenoli (mg/g)	4,84 ± 0,81 5,37 ± 0,64	5,68 ± 0,45 5,50 ± 0,42	5,62 ± 0,39 5,68 ± 0,27	5,43 ± 0,45 5,97 ± 0,45	5,57 ± 0,71 5,05 ± 0,85	5,39 ± 0,50 6,27 ± 0,33

*Medijana i srednje apsolutno odstupanje oko medijne koncentracija ispitivanih metabolita u zaraženim plodovima (boldirane vrednosti).

** Medijana i srednje apsolutno odstupanje oko medijne koncentracija ispitivanih metabolita u kontrolnim plodovima.

Tabela 22B. Prosečna koncentracija ispitivanih metabolita inokulisanih (*P. expansum* i *P. crustosum*) i kontrolnih plodova tokom razvoja bolesti.
Koncentracija metabolita

	6 hpi	24 hpi	3 dpi	5 dpi	7 dpi	11 dpi
<i>P. crustosum</i>						
kontrola						
Saharoza (mg/g)	109,61 ± 20,98 106,60 ± 18,53	93,80 ± 9,80 99,15 ± 18,70	87,58 ± 17,88 110,36 ± 20,52	78,483 ± 9,38 74,43 ± 33,56	95,27 ± 13,44 82,05 ± 11,44	62,33 ± 16,36 78,72 ± 18,18
Glukoza (mg/g)	124,77 ± 14,74 124,41 ± 7,24	115,60 ± 16,14 110,96 ± 15,74	129,53 ± 14,18 107,77 ± 17,02	120,88 ± 16,89 145,32 ± 23,06	123,73 ± 15,88 138,38 ± 13,73	129,91 ± 17,16 128,78 ± 8,12
Fruktoza (mg/g)	442,74 ± 7,53 469,81 ± 17,64	459,44 ± 24,16 475,42 ± 14,09	459,52 ± 16,71 469,42 ± 19,65	512,36 ± 8,77 475,46 ± 20,93	504,25 ± 20,19 480,37 ± 9,13	497,77 ± 21,94 499,49 ± 6,05
Jabučna kiselina (mg/g)	21,13 ± 3,17 23,53 ± 1,76	22,30 ± 1,51 19,81 ± 1,44	20,62 ± 1,58 21,17 ± 2,32	20,56 ± 0,93 18,79 ± 1,28	20,66 ± 1,52 20,03 ± 1,91	20,00 ± 1,12 19,42 ± 0,65
Šikiminska kiselina (µg/g)	63,62 ± 10,074 63,28 ± 3,38	70,43 ± 7,19 60,56 ± 10,28	66,16 ± 9,90 59,57 ± 12,79	57,41 ± 3,19 57,11 ± 9,056	53,85 ± 8,51 60,15 ± 13,12	59,64 ± 4,36 56,63 ± 3,65
Ukupan glutation (nmol/g)	211,34 ± 37,88 177,41 ± 17,73	237,43 ± 22,99 161,44 ± 24,80	222,70 ± 27,84 179,24 ± 45,37	197,43 ± 16,71 212,38 ± 41,67	247,00 ± 37,31 212,60 ± 47,64	249,09 ± 24,08 246,40 ± 36,78
Ukupan askorbat (nmol/g)	4975,06 ± 243,42 4930,57 ± 266,22	5093,85 ± 205,83 4822,42 ± 54,41	5389,06 ± 192,87 5647,13 ± 220,69	5652,99 ± 430,13 5698,47 ± 265,23	6246,95 ± 316,29 6126,71 ± 644,12	6299,53 ± 402,59 6672,76 ± 402,50
Ukupni fenoli (mg/g)	5,07 ± 0,53 5,53 ± 0,44	5,21 ± 0,40 5,29 ± 0,39	5,38 ± 0,61 4,87 ± 0,48	4,33 ± 0,73 5,21 ± 0,54	5,15 ± 0,52 4,94 ± 0,45	5,66 ± 0,62 5,77 ± 0,95

*Medijana i srednje apsolutno odstupanje oko medijane koncentracija ispitivanih metabolita u zaraženim plodovima (boldirane vrednosti).

** Medijana i srednje apsolutno odstupanje oko medijane koncentracija ispitivanih metabolita u kontrolnim plodovima.

5.9.5. Korelacija između veličine pega i koncentracije ispitivanih šećera, organskih kiselina i antioksidanata u zaraženim plodovima jabuke

Analizom promena u plodovima jabuke inokulisanim *P. expansum*, upotrebom Spirmanove korelacije, utvrđeno je da je veličina pega u jakoj pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom fruktoze ($\rho = 0,74^{**}$) i tAA ($\rho = 0,63^{**}$), jakoj negativnoj korelaciji sa sadržajem tGSH ($\rho = -0,79^{**}$) i srednje jakoj negativnoj korelaciji sa koncentracijom jabučne i šikiminske kiseline ($\rho = -0,45^*$, $-0,58^*$). Poređenjem odnosa koncentracija između ispitivanih šećera utvrđeno je da postoji jaka negativna korelacija između sadržaja saharoze i glukoze ($\rho = -0,69^{**}$) i pozitivna korelacija između sadržaja glukoze i fruktoze ($\rho = 0,37^*$). U odnosu koncentracije šećera sa koncentracijama drugih metabolita utvrđena je negativna korelacija između koncentracija saharoze i šikiminske kiseline ($\rho = -0,47^*$), tGSH ($\rho = -0,44^*$), tAA ($\rho = -0,43^*$) i tPH ($\rho = -0,46^*$), dok je pozitivna korelacija uočena između koncentracija glukoze i tAA ($\rho = 0,47^*$) i tPH ($\rho = 0,39^*$). Sadržaj fruktoze i tAA su u jakoj pozitivnoj korelaciji ($\rho = 0,74^{**}$), a fruktoze i tGSH u negativnoj korelaciji ($\rho = -0,48^*$). Između jabučne i šikiminske kiseline nije uočena značajna korelacija, dok je između šikiminske i tGSH utvrđena jaka pozitivna korelacija ($\rho = 0,59^{**}$). Među antioksidantima nije uočena značajna korelacija (Tabela 23).

Tabela 23. Vrednosti Spearman-ove korelacije između prečnika pege, koncentracije ispitivanih metabolita i antioksidanata u *P. expansum* zaraženim plodovima jabuka.

Koeficijent korelacije (ρ)	Prečnik pege (mm)	Saharoza (mg/g)	Glukoza (mg/g)	Fruktoza (mg/g)	Jabučna kiselina (mg/g)	Šikiminska kiselina (μ g/g)	tGSH (nmol/g)	tAA (nmol/g)	tPH (mg/g)
Prečnik pege (mm)	1,000	0,061	0,302	0,744 ^{**}	-0,454 [*]	-0,576 [*]	-0,785 ^{**}	0,631 ^{**}	0,000
Saharoza (mg/g)		1,000	-0,685 ^{**}	-0,089	-0,303	-0,467 [*]	-0,435 [*]	-0,432 [*]	-0,458 [*]
Glukoza (mg/g)			1,000	0,370 [*]	0,126	0,133	0,070	0,473 ^{**}	0,392 [*]
Fruktoza (mg/g)				1,000	0,299	-0,122	-0,476 [*]	0,737 ^{**}	-0,087
Jabučna kiselina (mg/g)					1,000	0,366	0,150	0,361	0,159
Šikiminska kiselina (μ g/g)						1,000	0,592 ^{**}	0,126	0,131
tGSH (nmol/g)							1,000	-0,241	-0,082
tAA (nmol/g)								1,000	0,230
tPH (mg/g)									1,000

*Korelacija je značajna pri $p < 0,05$

** Korelacija je značajna pri $p < 0,01$

Analizom promena u plodovima jabuke inokulisanim *P. crustosum*, korišćenjem Spearmanove korelacije, nije utvrđena značajna povezanost veličine pega sa koncentracijom ispitivanih metabolita i antioksidanata. Poređenjem koncentracije šećera po terminima utvrđena je jaka negativna korelacija između saharoze i glukoze ($\rho = -0,66^{**}$), dok je u poređenju sa koncentracijom ostalih metabolita utvrđena negativna korelacija koncentracija saharoze i šikiminske kiseline ($\rho = -0,36^{**}$) i pozitivna korelacija između koncentracija glukoze i šikiminske kiseline ($\rho = 0,37^{**}$). U odnosu na sadržaj antioksidanata, koncentracija saharoze je negativno korelaisana sa sadržajem tAA ($\rho = -0,38^{**}$) i tPH ($\rho = -0,40^{**}$), dok je pozitivna korelacija utvrđena između koncentracije glukoze i tPH ($\rho = 0,35^{**}$) i između koncentracije fruktoze i tAA ($\rho = 0,47^{**}$). Jaka pozitivna korelacija je uočena između koncentracija jabučne i šikiminske kiseline ($\rho = 0,61^{**}$), dok

su koncentracije obe organske kiseline bile u pozitivnoj korelaciji sa tGSH ($\rho = 0,24^*$; $0,38^{**}$). Među antioksidantima je slaba pozitivna korelacija između koncentracije tGSH i tAA ($\rho = 0,269^*$) (Tabela 24).

Tabela 24. Vrednosti Spearman-ove korelacije između prečnika pege, koncentracije ispitivanih metabolita i antioksidanata u plodovima jabuka zaraženim *P. crustosum*.

Koeficijent korelacije (ρ)	Prečnik pege (mm)	Saharoza (mg/g)	Glukoza (mg/g)	Fruktoza (mg/g)	Jabučna kiselina (mg/g)	Šikiminska kiselina (μ g/g)	tGSH (nmol/g)	tAA (nmol/g)	tPH (mg/g)
Prečnik pege (mm)	1,000	0,056	0,136	-0,292	-0,027	0,332	0,063	-0,086	0,252
Saharoza (mg/g)		1,000	-0,662**	-0,189	-0,070	-0,361**	-0,132	-0,375**	-0,397**
Glukoza (mg/g)			1,000	-0,069	0,039	0,371**	0,195	0,142	0,351**
Fruktoza (mg/g)				1,000	0,017	-0,128	-0,027	0,471**	0,010
Jabučna kiselina (mg/g)					1,000	0,608**	0,236*	0,072	0,016
Šikiminska kiselina (μ g/g)						1,000	0,375**	0,109	0,196
tGSH (nmol/g)							1,000	0,269*	-0,083
tAA (nmol/g)								1,000	0,177
tPH (mg/g)									1,000

*Korelacija je značajna pri $p < 0,05$

** Korelacija je značajna pri $p < 0,01$

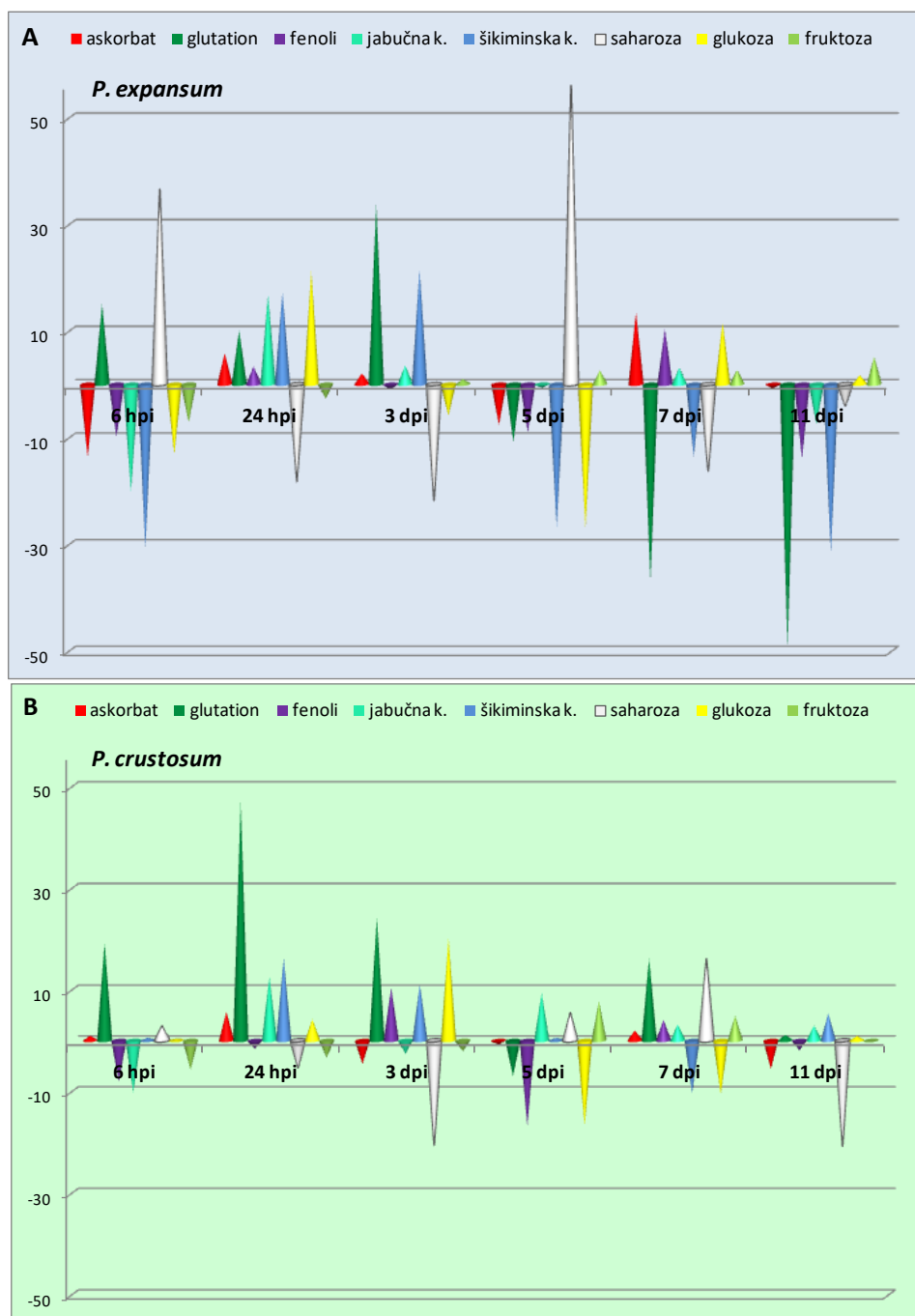
5.9.6. Poređenje promena metabolita u plodovima jabuke inokulisanim *P. expansum* i *P. crustosum*

Poređenjem promena metabolita u plodu jabuke koji su posledica inokulacije, infekcije i kolonizacije *P. expansum* sa promenama koje prouzrokuje *P. crustosum* (Tabela 25, Grafikon 15), uočava se da *P. expansum* izaziva intenzivnije promene nego *P. crustosum* u odnosu na kontrolne plodove. Najuočljivija razlika je veliko povećanje u sadržaju saharoze 6 hpi i 5 dpi (+57%), povećanje koncentracije glutaciona 3 dpi (+33,8%), ali i naglo smanjenje koncentracije ukupnog glutaciona 7 i 11 dpi (-37% i -49,7%) i smanjenje koncentracije šikiminske kiseline 6 hpi, 5 i 11 dpi (-30,7%, -26,9% i -31,7%) u plodovima jabuke zaražene *P. expansum*. Međutim, zabeleženo je da je 24 hpi jabuka burnije reagovala na *P. crustosum* naglim povećanjem koncentracije ukupnog glutaciona (+47,1%).

Tabela 25. Odstupanje koncentracija ispitivanih metabolita u plodovima jabuka inokulisanim *P. expansum* i *P. crustosum* od kontrole

	Odstupanje sadržaja metabolita u zaraženim jabukama u odnosu na kontrolu (%)					
	6 hpi	24 hpi	3 dpi	5 dpi	7 dpi	11 dpi
<i>P. expansum</i>						
Saharoza (mg/g)	36,55	-18,25	-21,80	56,93*	-16,33	-4,14
Glukoza (mg/g)	-11,52	21,29	-5,89	-27,03*	11,61	1,65
Fruktoza (mg/g)	-7,19*	-2,76	0,93	2,59	2,73	5,21
Jabučna kiselina (mg/g)	-20,14*	16,86*	3,57	-0,66	3,07	-7,52
Šikiminska kiselina (μg/g)	-30,68*	17,21	21,52	-26,89	-13,56	-31,65*
Ukupan glutation (nmol/g)	15,02	10,08	33,80*	-10,86	-36,96*	-49,68*
Ukupan askorbat (nmol/g)	-13,67*	5,81	2,03	-7,64*	13,43*	-0,80
Ukupni fenoli (mg/g)	-9,85	3,34	-1,02	-8,95	10,42	-13,96*
<i>P. crustosum</i>						
Saharoza (mg/g)	2,83	-5,40	-20,64	5,45	16,12	-20,82
Glukoza (mg/g)	0,29	4,18	20,19	-16,82	-10,59	0,88
Fruktoza (mg/g)	-5,76	-3,36	-2,11	7,76*	4,97	-0,34
Jabučna kiselina (mg/g)	-10,22	12,55	-2,59	9,36	3,15	2,98
Šikiminska kiselina (μg/g)	0,53	16,30	11,05	0,52	-10,48	5,31
Ukupan glutation (nmol/g)	19,13	47,08*	24,25	-7,04	16,19	1,09
Ukupan askorbat (nmol/g)	0,90	5,63	-4,57*	-0,80	1,96	-5,59
Ukupni fenoli (mg/g)	-8,20	-1,63	10,38	-16,87*	4,08	-1,95

*označava statistički značajno povećanje ili smanjenje sadržaja antioksidanata



Grafikon 15. Odstupanje koncentracije metabolita u plodovima jabuka inokulisanih *P. expansum* (A) i *P. crustosum* (B) od kontrole istog termina (izraženo u procentima).

6. DISKUSIJA

6.1. Plava trulež jabučastog voća i prouzrokovaci

Plava trulež prouzrokovana vrstama roda *Penicillium* jedna je od ekonomski najznačajnijih i najzastupljenijih bolesti uskladištenih plodova jabučastog voća (**Rosenberger, 2014**). Gubici koji se mogu javiti kao posledica ove bolesti iznose oko 30%, a nekim slučajevima mogu dostići i 90% (**Kim and Xiao, 2008; Themen, 2014; FAO, 2018**). U toku dvogodišnjih istraživanja etiologije plave truleži u Srbiji, u okviru ove disertacije, prikupljeni su plodovi jabučastog voća sa simptomima plave truleži iz skladišta sa različitim uslovima čuvanja. Bolest se manifestovala razmekšavanjem tkiva, odnosno pojavom truleži, koja je bila praćena obilnom sporulacijom plavozelene boje, što je u skladu sa navodima iz literature (**Turechek, 2004; Amiri, and Bompeix, 2005; Louw and Korsten, 2014; Rosenberger, 2014; Vico i Duduk, 2020**). Simptomi su bili u vidu vodenastih pega, najčešće oko povrede koja je uobičajeno mesto prodora i ostvarivanja infekcije (**Rosenberger, 2014**). Pega su bile različite veličine, svetlo smeđe do mrke boje, a zaraženo tkivo bilo je meko i vodenasto i lako se, na pritisak, odvajalo od zdravog dela ploda formirajući udubljenje glatkih ivica koji ima izgled činije. Pojava „činije” odnosno prisustvo glatkih ivica na prelazu između zaraženog i zdravog tkiva je tipično za plavu trulež i posledica je lučenja velikog broja pektolitičkih enzima koji imaju značajnu ulogu u patogenosti i virulentnosti prouzrokovaca plave truleži (**Jurick et al., 2010**).

Najčešći i ekonomski najznačajniji prouzrokovac plave truleži uskladištenih plodova jabuke i kruške u svetu je *P. expansum* (**Louw and Korsten, 2014; Rosenberger, 2014; Jurick and Cox, 2016**), a osim jabuke i kruške *P. expansum* izaziva i plavu trulež plodova dunje (**Sharma and Sumbali, 1997**). Osim *P. expansum*, plavu trulež plodova jabuke i kruške mogu izazvati i druge vrste roda *Penicillium*, kao što su *P. aurantiogriseum*, *P. brevicompactum*, *P. carneum*, *P. chrisogenum*, *P. commune*, *P. crustosum*, *P. dendriticum*, *P. digitatum*, *P. glabrum*, *P. griseofulvum*, *P. ramulosum*, *P. rugulosum*, *P. solitum* i *P. verrucosum* (**Sanderson and Spotts, 1995; Amiri and Bompeix, 2005; van der Walt et al., 2010; Louw and Korsten, 2014**). U ispitivanju prouzrokovaca plave truleži u okviru ove disertacije, iz plodova jabučastog voća prikupljenog iz različitih skladišta u Srbiji identifikovane su tri vrste roda *Penicillium*: *P. expansum*, *P. crustosum* i *P. solitum*. Najzastupljenija vrsta bio je *P. expansum* (91,66%), a zatim *P. crustosum* (7,29%) i *P. solitum* (1,05%). U Libanu je na uskladištenim plodovima jabuke *P. expansum* takođe bio najzastupljeniji prouzrokovac plave truleži (87,2%), dok je *P. solitum* bio zastupljen u niskom procentu (12,8%) (**Habib et al., 2021**). Među prouzrokovacima plave truleži, *P. expansum* se u literaturi često navodi kao najzastupljenija i najvirulentnija vrsta roda *Penicillium*. Razlog tome mogu biti genetička promenljivost, a time i prilagodljivost uslovima spoljašnje sredine, sposobnost inaktivacije i prevazilaženja odbrambenih mehanizama domaćina ili arsenal različitih faktora virulentnosti kojima raspolaže, među kojima i pektolitičkih enzima kojima razlaže tkivo domaćina (**Luciano-Rosario et al., 2020**).

Rezultati ispitivanja etiologije plave truleži jabučastog voća u okviru ove doktorske disertacije pokazuju da je *P. expansum* prouzrokovao plavu trulež plodova jabuke, kruške i dunje, *P. crustosum* plodova jabuke, kruške, dunje i mušmule, a *P. solitum* plodova dunje. U istraživanjima etiologije plave truleži na uskladištenim plodovima jabuke i kruške u državama Oregon i Vašington (SAD) kao prouzrokovaci plave truleži identifikovani su *P. aurantiogriseum*, *P. commune*, *P. solitum*, *P. verrucosum* i *P. expansum* (**Sanderson and Spotts, 1995**), a u Urugvaju *P. expansum* i *P. solitum* (**Pianzzola, 2004**). U državi Britanska Kolumbija iz zaraženih plodova jabuke sa simptomima plave truleži izolovani su *P. brevicompactum*, *P. crustosum* i *P. expansum* (**Scholberg and Haag, 1996**), a u Danskoj *P. expansum*, *P. solitum*, *P. crustosum*, *P. carneum* i *P. polonicum* (**Andersen and Thrane, 2006**). U Koreji je identifikovano pet vrsta roda *Penicillium* prouzrokovaca plave truleži plodova jabuke tokom čuvanja: *P. expansum*, *P. crustosum*, *P. solitum*, *P. italicum* i nova vrsta označena kao *Penicillium* sp. koja je slična *P. hirsutum* Dierckx (**Sang et al., 2010**). Četiri vrste ovog roda izolovane su iz uskladištenih plodova kruške: *P. expansum*, *P. crustosum*, *P. solitum* i *P. digitatum* a među njima najvirulentniji je bio *P. expansum*, pa zatim *P. crustosum* (**Louw and**

Korsten, 2014). U Srbiji su kao prouzrokovaci plave truleži plodova jabuke do sada identifikovane vrste *P. expansum* i *P. crustosum* (**Perišić, 1972; Babović i sar., 1979; Vico et al., 2014a; Vico et al., 2014b**), a kruške *P. expansum*, *P. crustosum* i *P. italicum* (**Stošić, 2021**). Rezultati istraživanja u okviru ove doktorske disertacije kojima su *P. expansum* i *P. crustosum* identifikovani kao prouzrokovaci plave truleži plodova jabuke i kruške potvrđuju rezultate prethodnih istraživanja u svetu i u Srbiji (**Perišić, 1972; Babović i sar., 1979; Andersen and Thrane, 2006; Louw and Korsten, 2014; Vico et al., 2014a; Vico et al., 2014b; Stošić et al., 2021; Farr and Rossman, 2022**). Novi nalazi u ovoj disertaciji su prvi opis *P. crustosum* i *P. solitum* kao prouzrokovaca plave truleži plodova dunje i *P. crustosum* kao prouzrokovaca plave truleži plodova mušmule u svetu, i prvi opis *P. expansum* kao postžetvenog patogena dunje u Srbiji.

6.2. Molekularne karakteristike *Penicillium* spp. iz jabučastog voća

Iz sakupljenih plodova jabuke sa simptomima plave truleži dobijeno je 96 izolata koji su na osnovu morfologije kolonija odgovarali rodu *Penicillium*. Korišćenjem specifičnih prajmera (PEF/PER), koji su zasnovani na delu gena za poligalakturonazu (*Pepg1*), koji se umnožava samo kod vrste *P. expansum* (**Marek et al., 2003**), od 96 dobijenih izolata, 88 je identifikovano kao *P. expansum*. Korišćenje specifičnih prajmera omogućilo je razlikovanje *P. expansum* od drugih izolovanih vrsta roda *Penicillium* i specifičnu i pouzdanu detekciju *P. expansum* što je u skladu sa rezultatima drugih istraživanja (**Oliveri et al., 2007; Elhariry et al., 2011; Sanzani et al., 2013; Vico et al., 2014**). Pouzdanost specifičnih prajmera u detekciji *P. expansum* potvrdila je identifikacija izolata na osnovu ITS rDNK regiona, dela gena za β -tubulin (*BenA*), kalmodulin (*CaM*) i sintezu druge po veličini podjenice u okviru RNA polimeraze II (*RPB2*). Na osnovu molekularnih karakteristika ovih regiona među izolatima *Penicillium* spp. izolovanim iz jabučastog voća, jasno su se razdvojile i identifikovane su tri vrste: *P. expansum*, *P. crustosum* i *P. solitum*.

Sekvenciranje različitih regiona DNK je od 1990-tih postalo najznačajnija metoda, a molekularne karakteristike važan činilac u identifikaciji i taksonomiji gljiva, gde ITS region predstavlja primarni barkod region za identifikaciju (**Schoch et al., 2012**). U slučaju roda *Penicillium*, na osnovu ITS regiona je moguće odrediti kojoj sekciji određeni izolat pripada, a ponekad i izvršiti identifikaciju (**Visagie et al., 2014**), što je u skladu sa rezultatima dobijenim u ovoj disertaciji gde su se na osnovu ITS regiona razdvojile vrste *P. expansum*, *P. crustosum* i *P. solitum*. U okviru vrsta *P. expansum* i *P. crustosum* nije uočena varijabilnost u ovom region. Međutim, u istraživanjima u okviru ove disertacije ITS region nije razdvojio vrste *P. solitum*, *P. discolor* i *P. echinulatum*. Razlog tome može biti da ITS region nije dovoljno varijabilan da bi omogućio razlikovanje između svih srodnih vrsta (**Skouboe et al., 1999; Seifert et al., 2007; Schoch et al., 2012**). Zbog toga je u identifikaciju izolata *Penicillium* spp. uključena i analiza drugih genskih regiona: *BenA*, *CaM* i *RPB2*, što preporučuju i **Visagie et al. (2014)**. U sprovedenim ispitivanjima, u tri genska lokusa (*BenA*, *CaM* i *RPB2*) u okviru vrste *P. expansum*, kao i u dva genska lokusa (*CaM* i *RPB2*) kod *P. crustosum* uočena je genetička varijabilnost koja pokazuje postojanje različitih haplotipova kod izolata ove dve vrste. **Wilson and Borisy (1997)** su pokazali da iako su geni za tubuline visoko konzervativni i razlikuju se između vrsta, sadrže i varijabile regione koji određuju divergentnost unutar vrste. Slično tome i *CaM* i *RPB2* regioni takođe poseduju sposobnost razlikovanja među vrstama kao i *BenA* (**Visagie et al., 2014**), a *RPB2* region se smatra pogodnim za filogenetska istraživanja jer postoji samo jedna kopija gena koji je sporo evoluirao (**Liu, 1999**).

Filogenetske analize pojedinačnih i spojenih sekvenci ITS, *BenA*, *CaM* i *RPB2* regiona (multilokus analiza) potvrdile su identifikaciju izolata *Penicillium* spp. iz jabučastog voća na osnovu grupisanja izolata sa referentnim izolatima odgovarajuće vrste poreklom iz različitih zemalja, što se slaže sa navodima iz literature (**Samson et al., 2004; Houbraken and Samson (2011); Houbraken et al., 2020; Stošić et al., 2021**). Dobijeni rezultati su takođe u skladu sa literaturnim podacima da je *BenA* među najstabilnijim regionima i od najveće filogenetske vrednosti za identifikaciju vrsta roda *Penicillium* (**Samson et al., 2004**). Osim toga, filogenetska analize su pokazale i intraspecijsku

varijabilnost vrsta *P. expansum* i *P. crustosum*. U filogenetskim analizama zasnovanim na *BenA*, *CaM*, *RPB2* i multilokus analizama izolati *P. expansum* grupisali su se u dve, a izolati *P. crustosum* na osnovu *RPB2* i multilokus analizama u tri klade. **Habib et al. (2021)** su takođe uočili varijabilnost izolata *P. expansum* na osnovu *BenA*, koji su se grupisali u tri klade. Najveći broj izolata su svrstani u grupu sa referentnim izolatom CBS 325.48, što je bio slučaj i u našim ispitivanjima.

6.3. Morfološke i biohemijske karakteristike *Penicillium* spp. iz jabučastog voća

Izgled i brzina porasta kolonija. Vrste roda *Penicillium*, *P. expansum*, *P. crustosum* i *P. solitum*, koje su u ovoj doktorskoj disertaciji identifikovane kao prouzrokovaci plave truleži jabučastog voća, na različitim hranljivim podlogama (MEA, CYA, YES i PDA) formiraju plavozelene kolonije. Ova boja kolonija potiče od obilne sporulacije, odnosno obilnog formiranja konidija plavozelene boje na beloj miceliji što je karakteristika roda (**Frisvad and Samson, 2004; Pitt and Hocking, 2009; Visagie et al., 2014**).

Izolati *P. expansum* su formirali gromuljičaste, radijalno naborane plavozelene kolonije, sa pravilnim belim rubom, svetlo do jarkožutim naličjem kolonije na YES podlozi, a u kolonijama je bio prisutan proziran eksudat na CYA i MEA podlogama, što se slaže sa navodima **Frisvad and Samson (2004)** i **Pitt and Hocking (2009)**. Razlike među izolatima ove vrste bile su najuočljivije na naličju kolonija na PDA, MEA i CYA podlogama, kao i u brzini porasta kolonija. Na osnovu brzine porasta kolonije, boje naličja kolonija na PDA i MEA (krem ili žuto naličje), kao i razlike u obojenosti naličja na CYA, izolati *P. expansum* razdvojili u dve grupe. Prva grupa izolata (11 izolata) odlikovala se brzorastućim kolonijama, krem naličjem na PDA i MEA i kremroze do kremcrvenim naličjem na CYA. Druga grupa izolata (sedam izolata) se odlikovala sporijim porastom na hranljivim podlogama, žutom bojom naličja kolonije na PDA i MEA podlozi i žutim, krem ili crvenim naličjem na CYA podlozi. Ovakva makromorfološka varijabilnost među izolatima *P. expansum* nije zabeležena u prethodnim istraživanjima u svetu i Srbiji (**Frisvad and Samson, 2004; Vico et al., 2014a; Habib et al., 2021; Stošić et al., 2021**). Međutim, kod vrste *P. glabrum*, poreklom iz plute, primećena je visoka intraspecijska varijabilnost u makroskopskim i mikroskopskim morfološkim ispitivanjima, ekstraćelijskim metabolitima, kao i u sekvencama *BenA* i *CaM* regiona (**Barreto et al., 2011**). Slično je uočeno i među izolatima *P. glabrum* poreklom iz lukovica crnog luka iz Srbije, gde je utvrđena varijabilnost u makroskopskim morfološkim i patogenim osobinama, kao i *BenA* sekvenci (**Duduk et al., 2017**).

Izolati *P. crustosum* su na hranljivim podlogama formirali somotaste, najčešće radijalno naborane kolonije, sa naličjem krem do jarko žute boje i prozirnim eksudatom prisutnim na CYA podlozi. Izolat DRI4b se izdvojio po gromuljičastoj do vunastoj koloniji, čije je naličje bilo narandžasto. Nakon 10 ili više dana na PDA i MEA podlogama delovi kolonija su se odvajali u vidu krasta, što je tipična karakteristika ove vrste po kojoj je dobila ime (**Frisvad and Samson, 2004; Pitt and Hocking, 2009; Vico et al., 2014**). Brzina porasta kolonija izolata *P. crustosum* na MEA podlozi odgovarao je navodima **Frisvad and Samson (2004)**, **Pitt and Hocking (2009)** i **Duduk et al., 2020**, dok je na CYA i YES podlozi odgovarao navodima **Frisvad and Samson (2004)**. Na osnovu klaster analize brzine porasta kolonija na različitim podlogama izolati *P. crustosum* iz jabučastog voća grupisani su u tri grupe, što do sada nije opisano u literaturi (**Frisvad and Samson, 2004; Pitt and Hocking, 2009; Vico et al., 2014; Duduk et al., 2020**).

Izolat *P. solitum* je formirao somotastu do vunastu, radijalno naboranu koloniju sa naličjem krem do jarko žute boje i obilnim prozirnim eksudatom na CYA podlozi. Izgled i brzina porasta kolonija odgovarali su navodima **Frisvad and Samson (2004)** i **Pitt and Hocking (2009)**. *P. solitum* je formirao kolonije najmanjeg prečnika na sve četiri podloge, dok su kolonije izolata *P. expansum* imale najbrži porast na CYA i YES podlogama. Na podlogama PDA i MEA porast kolonija *P. expansum* i *P. crustosum* bio je ujednačen. **Stošić et al. (2021)** su takođe uočili brži porast kolonija izolata *P. expansum* od izolata *P. crustosum* na CYA podlozi, ali su takođe uočili brži porast na MEA

podlozi. Najpogodnija podloga za rast izolata *Penicillium* spp. iz jabučastog voća je YES podloga što je u skladu sa podacima iz literature (**Frisvad and Samson, 2004**).

Mikroskopske odlike. Zajedničke mikromorfološke karakteristike za izolate *P. expansum*, *P. crustosum* i *P. solitum* izolovane iz plodova jabučastog voća u ovom istraživanju su bile konidiofore sa *terverticillata*, ređe *biverticillata* tipom grananja, cilindričan oblik rama i metula, cilindrične do ampuliformne fijalide i konidije sa glatkim zidovima. Izolovane vrste su se međusobno razlikovale u izgledu konidiofora: izolati *P. expansum* su formirali konidiofore i konidije glatkih zidova, *P. crustosum* su formirali konidiofore nazubljenih zidova, odnosno stipe i rame su bile nazubljene, metule takođe nazubljene, ređe glatke, a fijalide glatkih zidova, ređe nazubljene. Izolat *P. solitum* je obrazovao konidiofore sa glatkim ili blago nazubljenim zidovima, odnosno stipe su bile nazubljene, rame glatkih ili blago nazubljenih zidova, a metule i fijalide su bile glatke. Oblik konidija se nije značajno razlikovao. Izolat *P. solitum* je uglavnom formirao okruglaste, ređe ovalne konidije, *P. crustosum* okruglasto-ovalne, dok je *P. expansum* pored navedenih oblika ređe formirao i eliptične konidije. Izgled konidiofora i konidija odgovarali su literaturnim podacima (**Frisvad and Samson, 2004; Pitt and Hocking, 2009; Visagie et al., 2014**).

Rezultati u okviru disertacije pokazali su da je *P. crustosum* formirao šire konidije i šire i duže metule nego *P. expansum*, dok je izolat *P. solitum* formirao krupnije konidije, šire metule i kraće i šire rame. **Habib et al. (2021)** navode da *P. solitum* formira veće konidije nego *P. expansum*. Između izolata *P. expansum* uočena je varijabilnost u veličini konidija, fijalida, metula i rama, a među izolatima *P. crustosum* u veličini konidija i dužini fijalida. Dužina rama, metula, fijalida i konidija, kao i širina konidija ispitivanih izolata *P. expansum*, *P. crustosum* i *P. solitum* odgovarala je navodima u literaturi (**Raper and Thom, 1949; Frisvad and Samson, 2004; Pitt and Hocking, 2009; Duduk et al., 2020**), dok su izolati dobijeni u ovom istraživanju formirali šire rame, metule i fijalide nego izolati ovih vrsta u drugim istraživanjima (**Raper and Thom, 1949; Frisvad and Samson, 2004; Pitt and Hocking, 2009**). U prethodnim istraživanjima u Srbiji prosečne dimenzije konidija izolata *P. expansum* i *P. crustosum* bile su veće nego kod izolata ispitivanih u okviru ove disertacije (**Vico et al., 2014b; Stošić et al., 2021**).

Biohemijske odlike. Proizvodnja ciklopiazonske kiseline i drugih alkaloida u Ehrlich-ovom testu jedna je od značajnih karakteristika vrsta roda *Penicillium* (**Lund, 1995; Visagie et al., 2014**). Većina izolata *P. expansum* (12) iz jabučastog voća je u reakciji sa Ehrlich-ovim reagensom na filter papiru obrazovala žuti prsten, što znači da ne proizvode ciklopiazonsu kiselinu, već druge alkaloidne, što se slaže sa rezultatima prethodnih istraživanja u Srbiji (**Vico et al., 2014**). Šest izolata *P. expansum* formiralo je ljubičasti prsten, što upućuje na sposobnost stvaranja ciklopiazonske kiseline, što je karakteristično za *P. expansum* (**Frisvad and Samson, 2004; Pitt and Hocking, 2009**). Izolati *P. crustosum* iz jabučastog voća obrazovali su svetlo žuti do žuti prsten, što je u skladu sa podacima iz prethodnih istraživanja u Srbiji (**Vico et al., 2014b; Duduk et al., 2020**), kao i navodima **Frisvad and Samson (2004)** i **Pitt and Hocking (2009)**. Izolat *P. solitum* iz jabučastog voća u ovom istraživanju, je formirao žuti prsten u reakciji sa Ehrlich-ovim reagensom. Ovaj rezultat se ne slaže sa navodima **Frisvad and Samson (2004)** i **Pitt and Hocking (2009)** prema kojima *P. solitum* daje negativnu reakciju sa Ehrlich-ovim reagensom, odnosno nema sposobnost stvaranja ciklopiazonske kiseline ni drugih alkaloida.

6.4. Virulentnost *Penicillium* spp. iz jabučastog voća

Penicillium expansum važi za najvirulentniju vrstu u okviru roda *Penicillium*, jer je dobro prilagođen da ostvari infekciju, kolonizuje tkivo, brzo izazove trulež i potpuno propadanje ploda (Jurick and Cox, 2016). Razlog tome je sposobnost sinteze različitih pektolitičkih enzima koji razgrađuju ćelijski zid, kao i sinteze organskih kiselina kojima snižava pH, što omogućava bolji rad enzima, a takođe i sinteze sekundarnih metabolita i mikotoksina koji doprinose bržoj kolonizaciji tkiva (Prusky and Yakoby, 2003; Hadas et al., 2007; Luciano-Rosario et al., 2020). Rezultati istraživanja virulentnosti vrsta roda *Penicillium* u okviru ove disertacije takođe pokazuju da je *P. expansum*, među ispitivanim vrstama, ispoljio najvišu virulentnost na inokulisanim plodovima jabuke. Prema Morales et al. (2008) ovakva sposobnosti *P. expansum* da kolonizuje tkivo ploda jabuke posledica je toga što su faktori virulentnosti konstantni u populaciji ove vrste.

Rezultati istraživanja u okviru ove disertacije pokazali su da je *P. expansum* bio virulentniji od *P. crustosum*, dok je *P. solitum* ispoljio slabu virulentnost na inokulisanim plodovima jabuke sorti Zlatni Delišeš, Crveni Delišeš i Greni Smit. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima drugih istraživanja gde je *P. expansum* je bio najvirulentniji, zatim *P. crustosum*, a *P. solitum* je bio najmanje virulentan na pet sorti jabuke (Greni Smit, Zlatni Delišeš, Krips Pink, Rojal Gala i Topred) i tri sorte kruške (Pakams Trijumf, Forelle i D'Anjou) (Sanderson and Spotts, 1995; Louw and Korsten, 2014). Simptomi plave truleži na inokulisanim plodovima jabuke prouzrokovani *P. expansum* i *P. crustosum* različito su se ispoljavati na različitim sortama i odgovaraju prethodno opisanim simptomima (Louw and Korsten, 2014; Rosenberger, 2014). Međutim, u toku istraživanja u ovoj disertaciji, osim u virulentnosti, na poprečnom preseku inokulisanog ploda uočene su razlike i u simptomima koje izazivaju ove dve vrste, što do sada nije opisano u literaturi. *P. crustosum* prouzrokuje trulež tamnije boje, a na plodovima jabuke sorte Crveni Delišeš sporuliše i u unutrašnjosti poda. Trulež koju prouzrokuje *P. expansum* je svetlije boje, a na inokulisanim plodovima sporulacija se javlja samo oko mesta inokulacije. Razlike u virulentnosti između *P. expansum* i *P. crustosum* mogu se objasniti metaboličkim promenama inficiranih plodova jabuke. *P. expansum* prouzrokuje intenzivnije i dinamičnije promene metabolita u plodu jabuke što se odražava na odbrambene reakcije ploda. Reakcija ploda na infekciju *P. expansum* ogleda se u naglom padu sadržaja ukupnih fenola i glutaciona, što nije slučaj kod *P. crustosum* (Žebeljan et al., 2019a; 2019b; Žebeljan et al., 2021). Poznato je da je visok sadržaj fenola važan za odbranu ploda jabuke od plave truleži (Sun et al., 2017; Ahmadi-Afzadi et al., 2015; Schovankova i Opatova, 2011).

Među izolatima u okviru vrste *P. expansum* i *P. crustosum* uočena je varijabilnost u virulentnosti, pa su tako neki izolati *P. crustosum* na plodovima sve tri inokulisane sorte ispoljili podjednaku virulentnost kao *P. expansum*. Jednaku virulentnost izolata *P. expansum* i *P. crustosum* na plodovima kruške sorte Boskova Bočica i Viljamovka pokazuju i rezultati istraživanja drugih autora (Louw and Korsten, 2014; Stošić et al., 2021). Ovaj rezultat pokazuje da iako slabije virulentan i manje prilagođen od *P. expansum*, *P. crustosum* može, a i izazvao je propadanje plodova jabuke. Osim toga, obilna sporulacija čak i u unutrašnjosti ploda doprinosi tome da *P. crustosum* postane druga najvažnija vrsta roda *Penicillium*, prouzrokovaca plave truleži plodova jabuke.

Među ispitivanim sortama (Zlatni, Crveni Delišeš i Greni Smit) utvrđeno je da su se na plodovima sorte Greni Smit sporije razvijali simptomi nakon inokulacije, što je potvrđeno i u drugim istraživanjima (Spotts et al., 1999; Konstantinou et al., 2011). Pretpostavlja se da je razlog veće otpornosti taj što plod sorte Greni Smit sadrži veće količine flavonola i glutaciona nego druge sorte (Lata et al., 2007; Čebulj et al., 2017). Osim toga, žuti prsten oko zaraženog tkiva koji je uočen na plodovima jabuke sorte Greni Smit inokulisanim *P. crustosum* je slična reakciji uočenoj na plodovima jabuke sorte Zlatni Delišeš zaraženim nekompatibilnim patogenom ploda jabuke, *P. digitatum* (Vilanova et al., 2012). Objašnjenje može biti da povreda i infekcija ploda aktiviraju početnu akumulaciju H₂O₂ (Su et al., 2011; Buron-Moles et al., 2015), a akumulacija ROS može oštetiti hloroplaste, zbog čega tkivo dobija žutu boju.

6.5. Intraspecijska varijabilnost *Penicillium* spp. iz jabučastog voća

U etiološkim ispitivanjima u okviru ove disertacije kao prouzrokovajući plave truleži plodova jabuke, kruške, dunje i mušmule identifikovane su tri vrste roda *Penicillium*: plavu trulež plodova jabuke, kruške i dunje prouzrokovao je *P. expansum*, plodova jabuke, kruške, dunje i mušmule *P. crustosum*, a dunje *P. solitum*. Vrste *P. expansum*, *P. crustosum* i *P. solitum* su se jasno razdvojile na osnovu morfoloških i molekularnih odlika četiri regiona (ITS, *BenA*, *CaM*, *RPB2*), koje odgovaraju opisanim odlikama ovih vrsta u literaturi (Marek et al., 2003; Frisvad and Samson, 2004; Oliveri et al., 2007; Pitt and Hocking, 2009; Elhariry et al., 2011; Sanzani et al., 2013; Vico et al., 2014; Visagie et al., 2014), kao i na osnovu virulentnosti (Sanderson and Spotts, 1995; Louw and Korsten, 2014). Osim toga, u okviru istraživanja u ovoj disertaciji utvrđeno je da na osnovu određenih morfoloških i molekularnih osobina kod *P. expansum*, kao i na osnovu određenih morfoloških, molekularnih osobina i virulentnosti kod *P. crustosum* postoji intraspecijska varijabilnost.

U okviru vrste *P. expansum* uočeno je postojanje više dobro podržanih podgrupa zasnovanih na analizi pojedinačnih i spojenih lokusa (ITS, *BenA*, *CaM* i *RPB2*). Na osnovu *BenA*, *CaM* regiona, kao i multilokus analize četiri regiona razdvojene su dve dobro podržane podgrupe u okviru ove vrste koje se razlikuju i u makromorfologiji. U okviru vrste *P. crustosum* na osnovu brzine porasta kolonija, virulentnosti i molekularnih karakteristika *RPB2* genskog regiona i multilokus analize četiri regiona izolati su se jasno razdvojili u tri grupe. Najveća varijabilnost izolata, kako *P. expansum*, tako i *P. crustosum* u pogledu molekularnih karakteristika, uočena je u *RPB2* regionu, što prema navodima Houbroken and Samson (2011), govori o polifiletskom poreklu sekcije *Penicillium* roda *Penicillium*. Moguće je da je razlog za razdvajanje u okviru ovih vrsta taj što prolaze kroz genetske promene koje prate uočene morfološke razlike kod *P. expansum* ili razlike u virulentnosti kod *P. crustosum* koje zatim utiču na specijalizaciju u ekologiji, biologiji ili ishrani populacija ovih vrsta. Bez obzira na grupisanja u okviru vrste Houbroken et al. (2020) ukazuju na to da taksoni niži od vrste kao što su podvrste, varijeteti, *formae specialis* i druge, ne bi trebalo da se koriste u formalnoj taksonomiji. Iako je njihova taksonomska vrednost i dalje diskutabilna, dublji pogled na različite podvrste vrsta u rodu *Penicillium* upoređivanjem profila metabolita, organizacije genoma ili rasporeda gena klastera sekundarnih metaboličkih verovatno će dati više informacija da bi se utvrdila biološka osnova za ova zapažanja.

Grupisanje izolata na osnovu virulentnosti koje je uočeno kod izolata *P. crustosum* bilo je u korelaciji sa morfološkim i genetičkim grupisanjem i do sada nije opisano u literaturi (Sanzani et al., 2013; Lopez et al., 2016; Duduk et al., 2020). Za izolate *P. expansum* ovakva varijabilnost u virulentnosti nije uočena u istraživanjima u okviru ove disertacije, što se može objasniti istraživanjima Morales et al. (2008). Navedeni autori navode varijabilnost izolata *P. expansum* u brzini porasta na različitim hranljivim podlogama, rezistentnosti prema fungicidima i sintezi patulina, ali smatraju da je bez obzira na variranje virulentnost *P. expansum* visoka. Morales et al. (2008) to objašnjavaju time da je sposobnost *P. expansum* da kolonizuje plod jabuke nepromenljiva karakteristika svih jedinki u populaciji ove vrste.

Na osnovu rezultata dobijenih u ovoj disertaciji uočeno je da poreklo dobijenih izolata *P. expansum* i *P. crustosum* nije imalo uticaj na morfološke i genetičke osobine, kao ni virulentnost izolata. U istraživanjima Sanzani et al. (2013) uočena je morfološka i molekularna varijabilnost izolata *P. expansum* (u okviru *BenA* gena) koja je za razliku od rezultata dobijenih u ovoj disertaciji, bila uslovljena poreklom izolata. Ovi autori navode da postoji mogućnost da se specijalizacija u okviru jedne vrste dogodila prema specifičnom domaćinu. Moguće je da izolati dobijeni u ovoj disertaciji ispoljavaju varijabilnost u drugim osobinama, a ne u specijalizaciji prema domaćinu jer nisu evoluirali do istog nivoa. Moguće je i da izolati dobijeni u istraživanju Sanzani et al. (2013) poseduju više varijacija na *BenA* lokusu. U radu Habib et al. (2021) na osnovu *BenA* izolati *P. expansum* su se grupisali u tri grupe, međutim nije utvrđeno da varijabilnosti u okviru *BenA* sekvence utiče na sintezu patulina. U proučavanju genoma *P. expansum* Julca et al. (2015) su ustanovili da postoji velika razlika u sekvencama u okviru vrste *P. expansum*, koja nije u korelaciji sa geografskom

udaljenošću izolata. Ovo ukazuje na to da su se izolati odavno razdvojili, a da su na geografsku strukturu populacije uticale migracije. Iako se *P. expansum* primarno razmnožava bespolnim putem, genetička raznolikost ukazuje na sposobnost i mejotičke i mitotičke rekombinacije, odnosno na potencijalno polno razmnožavanje, što dodatno objašnjava variranje u okviru vrste (Julca et al., 2015).

6.6. Fiziološke promene u plodovima jabuke zaraženim *P. expansum* i *P. crustosum*

Nakon berbe, fiziološki i biohemijski procesi kod obranih plodova razlikuju se od onih tokom vegetacije. Tokom čuvanja ova živa tkiva nastavljaju, da se menjaju i nastavljaju sa procesima dozrevanja i starenja. Najznačajniji fiziološki procesi koji se menjaju u toku čuvanja plodova su disanje, transpiracija, proizvodnja etilena, promene u sastavu, porast i razvoj (Mratinić i Đurović, 2015; Vico i Duduk, 2020). Jabuka je klimakterično voće, pa u plodovima dolazi do povećanja etilena i ubrzavanja disanja, što uslovljava hemijske i fiziološke promene. Najznačajnija promena je pretvaranje skroba u di- ili monosaharide, što dovodi do povećanja količine monosaharida i degradacije organskih kiselina (Hecke et al., 2006). Sve te promene čine plod podložnijim infekciji (Martinelli and Dandekar, 2014). Ukoliko dođe do infekcije, veća količina energije je potrebna za aktiviranje odbrambenih mehanizama u plodu, što rezultira intenziviranjem disanja, neravnotežom u odnosu šećera i organskih kiselina, akumulacijom ROS-a i sintezom antioksidanata, među kojima su najznačajniji askorbat i glutacion (Noctor and Foyer, 1998).

Rezultati istraživanja fizioloških promena u plodovima jabuke inokulisanim *P. expansum* i *P. crustosum*, u okviru ove disertacije, su pokazali da ubrzo posle inokulacije (6 hpi) dolazi do promena u koncentraciji metabolita i antioksidanata, što govori o brzom aktiviranju odbrambenih mehanizama. Oba patogena su prouzrokovala povećanje koncentracije glutaciona i smanjenje u sadržaju fenola, jabučne kiseline i fruktoze, s tim što su te promene bile izraženije u plodovima jabuke inokulisanim virulentnijim patogenom - *P. expansum*. Takođe, pored ovih promena, u jabukama inokulisanim *P. expansum* utvrđeno je i smanjenje koncentracije askorbata, šikiminske kiseline i glukoze, kao i naglo povećanje koncentracije saharoze. Uočeni pad u sadržaju glukoze, fruktoze i jabučne kiseline može se objasniti intenziviranjem disanja, koje je neophodno da bi se stvorilo što više energije potrebne za sintezu odbrambenih molekula (Scheideler et al., 2002). U istraživanjima Torres et al. (2003) zabeleženo je naglo povećanje H_2O_2 u jabukama zaraženim *P. expansum* 6 hpi, što govori da promene u koncentraciji antioksidanata u plodovima jabuka zaraženim sa oba patogena reflektuje reakciju antioksidanata sa povećanim količinama ROS-a. Pored svoje osnovne uloge da eliminiše višak ROS-a, AA-GSH ciklus je odgovoran i za modulaciju ROS-a kako bi imao signalnu ulogu (Foyer and Noctor, 2005). Kada fenoli reaguju sa ROS-om nastaju fenoksi radikali, koji se mogu redukovati do svoje početne forme putem askorbata (Foyer and Noctor, 2011; Urbanek Krajnc, 2014). Kao posledica inokulacije izolatima *P. expansum* i *P. crustosum* stvoreni ROS je uticao na fenole, dok je dodatno usled inokulacije *P. expansum* vršen pritisak i na askorbat. Međutim, u biljkama *Arabidopsis* sp. je uočeno da nedostatak askorbata izaziva ekspresiju PR proteina (Pastori et al., 2003), pa je moguće da je pad u koločini askorbata, u vezi sa aktivacijom sinteze PR proteina, koji imaju značajnu ulogu u odbrani. Istraživanja Gullner et al. (2017) ističu da glutacion pored toga što je značajan kao antioksidant, može biti značajan i kao signalni molekul, zbog čega je moguće da povišena koncentracija glutaciona predstavlja rani odgovor jabuke na infekciju. Slično rezultatima istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji, Wang et al. (2019) su utvrdili da je ubrzo nakon inokulacije (1, 3 i 6 hpi) *P. expansum* izazvao aktivaciju različitih odbrambenih mehanizama: sinteza fitohormona, PTI (PAMP-triggered immunity) i ETI (effector-triggered immunity). Pored povišenog glutaciona u oba patosistema, nagli porast u koncentraciji saharoze, uočen u toku istraživanja u disertaciji, takođe, predstavlja rani odgovor jabuke na virulentnijeg patogena *P. expansum*, jer je dokazano da saharoza može imati signalnu ulogu (Ramon et al., 2008; Tauzin et al., 2014).

Zajednička reakcija ploda jabuke na inokulaciju *P. expansum* i *P. crustosum* 24 hpi bila je blago povećanje sadržaja askorbata, glutaciona, jabučne i šikiminske kiseline, dok je u jabukama

inokulisanim *P. expansum* utvrđeno i smanjenje koncentracije saharoze i povećanje koncentracije glukoze. Zanimljivo je to da je u plodovima jabuka zaraženim *P. crustosum* zabeleženo znatno veće povećanje koncentracije glutaciona u odnosu na plodove zaražene *P. expansum*. Nagomilavanje glutaciona remeti ćelijsku redoks homeostazu, kako bi se obezbedio adekvatan odgovor na stress (Tausz et al., 2004; Foyer and Noctor, 2005), a takođe je i esencijalni molekul za regeneraciju ćelija (Tausz et al., 2004). Nakupljanje glutaciona u inokulisanim plodovima upućuje na to da zaraženi plod jabuke uključuje mehanizme za odbranu od stresa (*P. crustosum*) i da glutacion ima značajnu ulogu u pokretanju odbrambenih mehanizama jabuke u ranoj fazi infekcije izolatom *P. crustosum*. U patosistemu *P. expansum* – plod jabuke, zabeleženo je naglo smanjenje koncentracije saharoze i povećanje koncentracije glukoze. Takođe, u oba patosistema (*P. expansum* – plod jabuke i *P. crustosum* – plod jabuke) zabeležena je negativna korelacija između koncentracija saharoze i glukoze. Pad u sadržaju saharoze i povećanje koncentracije glukoze se može objasniti prevođenjem saharoze u glukozu i fruktozu, pomoću enzima invertaze. To je detektovano i u patosistemu *Botrytis cinerea* – paradajz, kada je nakon 24 h indukovana invertaza, dok je najjaktivnija bila 48 h od inokulacije, što je rezultovalo značajnim smanjenjem saharoze i nakupljanjem glukoze (Hyun et al. 2011). Nakupljanje glukoze, jabučne i šikiminske kiseline predstavlja nakupljanje gradivnih komponenti koji potpomažu sintezu različitih odbrambena jedinjenja. Glukoza i jabučna kiselina su neophodne u procesu ćelijskog disanja i dobijanja energije, dok je šikiminska kiselina jedinjenje koje učestvuje u sintezi fenola (Chandran et al., 2003).

Treći dan posle inokulacije (3 dpi) zajednička reakcija jabuke na inokulaciju *P. expansum* i *P. crustosum* bila je povećanje sadržaja glutaciona i šikiminske kiseline, kao i smanjenje koncentracije saharoze. Takođe, utvrđena je pozitivna korelacija između koncentracije glutaciona i šikiminske kiseline u oba patosistema, što može značiti da povišeni nivo glutaciona daje signal ćeliji za povećanje sinteze fenola, pa samim tim se šikiminska kiselina povećava kao ključan intermedijer Schovankova and Opatova (2011). Nagli skok u sadržaju glutaciona je u jabukama inokulisanim sa *P. expansum* (3 dpi) usledio kasnije nego u jabukama inokulisanim sa *P. crustosum* (24 hpi). Pored toga, u patosistemu *P. crustosum* – plod jabuke dolazi i do nakupljanja fenola, i značajnog smanjenja koncentracije askorbata 3 dpi. Kako askorbat ima sposobnost da redukuje fenoksi radikale (Singh et al., 2021), povećan nivo fenola vrši pritisak na askorbat, što je rezultovalo smanjenjem njegove koncentracije.

Pet dana posle inokulacije plodova jabuke *P. expansum*, pega na plodovima se povećala i bila je prečnika 12,48 mm, dok je veličina pege koju je izazvao *P. crustosum* bila manjeg prečnika (6,88 mm). U ovoj fazi razvoja bolesti oba patogena su izazvala smanjenje koncentracije glutaciona, fenola i glukoze, kao i povećanje koncentracije saharoze. Naglo povećanje koncentracije saharoze je bilo izraženo kod jabuka zaraženih *P. expansum*, što se smatra delom odbrambenog odgovora, jer je saharoza poznata kao signalni molekul (Tausz et al., 2014). Veća količina saharoze u podlozi može uticati na *P. expansum* tako što smanjuje ekspresiju regulatura *LaeA* (reguliše nekoliko gena za sintezu sekundarnih metabolita) i povećava ekspresiju represora katabolita ugljenika *CreA* (transkripcioni faktor koji blokira gene zadužene za sintezu enzima, koji koriste drugi vid izvora ugljenika od glukoze) (Kumar et al., 2017). Na taj način detektovana povećana količina saharoze može uticati na poremećaj lučenja sekundarnih metabolita *P. expansum*, kao i na favorizovanje potrošnje glukoze umesto drugih izvora ugljenika, što rezultuje značajnim smanjenjem njene koncentracije. Pored navedenih promena, u plodovima jabukama inokulisanim *P. expansum* uočeno je i smanjenje koncentracije šikiminske kiseline i askorbata. Ova promena može da se poveže sa poremećajem funkcije enzima šikimat dehidrogenaze, koji katališe četvrti korak šikimatskog puta, što se dešava kao posledica povećanja H_2O_2 (Torres et al., 2003; Michael et al., 2003). U plodovima jabuka zaraženim *P. crustosum* dodatno je zabeleženo i znatno povećanje koncentracije fruktoze. Iako je samo pretpostavka da fruktoza može imati signalnu ulogu (Bolouri-Moghaddam et al., 2010), može se pretpostaviti da naglo i značajno povećanje koncentracije fruktoze ima signalnu ulogu u patosistemu *P. crustosum* – plod jabuke.

Sedam dana nakon inokulacije reakcija plodova jabuke na prisustvo *P. expansum* razlikovala se u odnosu na reakciju plodova na *P. crustosum*. Jedini značajni zajednički odgovor je predstavljao

smanjenje sadržaja šikimiske kiseline. U jabukama zaraženim *P. expansum* pege su se gotovo udvostručile u poređenju sa prethodnim terminom (5 dpi), pa su zabeležene i značajne promene u sadržaju metabolita. Smanjenje količine saharoze je najverovatnije nastalo usled dejstva enzima invertaze, koji razlaže saharozu na glukozu i fruktozu, čije količine su se naglo povećale. U zaraženom plodu ovo razlaganje šećera je neophodno za dobijanje energije, koja je potrebna za sintezu odbrambenih molekula (Grace, 2005; Ramon et al., 2008; Rojas et al., 2014). Sedam dana nakon inokulacije nije uočen porast koncentracije jabučne kiseline, što nije u skladu sa navodima Vilanova et al. (2014), koji su 5 dpi zabeležili porast koncentracije jabučne kiseline. Sedam dana nakon inokulacije plodova, među antioksidantima, nagli pad u sadržaju glutaciona bio je praćen povećanjem koncentracije askorbata i fenola, što ukazuje na povećano opterećenje AA-GSH ciklusa. Povećana koncentracija fenola je takođe zabeležena u plodovima jabuka inokulisanim *P. expansum* 5 dpi u istraživanjima Schovankova and Opatova (2011). Šikiminska kiselina je prekursor fenolnih jedinjenja i očekivano je da se povećanje koncentracije fenola poklapa sa smanjenjem količine šikiminske kiseline (Grace, 2005). Međutim, u jabukama inokulisanim *P. expansum* i *P. crustosum* test korelacije nije pokazao da su ove komponente negativno korelisane. Moguće je, da je fenilpropaidni put favorizovan u odnosu na šikimatni put u sintezi fenola, jer veće količine saharoze i heksoza stimulišu fenilpropanoidni metabolizam (Morkunas and Ratajczak, 2014). U patosistemu *P. crustosum* – plod jabuke 7 dpi dolazi do akumulacije signalnih molekula: glutaciona, saharoze i fruktoze, dok je pad u koncentraciji glukoze posledica ubrzanog disanja.

Nakon 11 dana od inokulacije promene u metabolitima jabuke izazvane *P. expansum* i *P. crustosum* su se u potpunosti razlikovale. *P. expansum* je kao virulentniji patogen izazvao veću neravnotežu među metabolitima, koja se ogledala u naglom i značajnom smanjenju u sadržaju glutaciona, koji je još izraženiji nego u prethodnom terminu (7 dpi). Smanjenje koncentracije glutaciona bilo je praćeno smanjenjem koncentracije fenola i šikimiske kiseline i porastom koncentracije fruktoze. Ovakva neravnoteža ukazuje na to da je stres na vrlo visokom nivou i da premašuje kapacitet antioksidativnog sistema jabuke. Sličan odgovor AA-GSH ciklusa je zabeležen u listovima paradajza koji su zaraženi patogenom *Botrytis cinerea* (Kuzniak and Sklodowska, 2001). S druge strane, *P. crustosum* nije izazvao veće promene u koncentraciji metabolita ploda jabuke 11 dpi, kada je jedino uočeno smanjenje koncentracije askorbata i smanjenje koncentracije saharoze. Smanjenje koncentracije saharoze 11 dpi nije bilo praćeno akumulacijom glukoze, što govori o tome da je *P. crustosum* koristio saharozu kao glavni izvor ugljenika u ovom trenutku bolesti, pošto *P. expansum* ima sposobnost da koristi saharozu iz supstrata i pretvara ga u fruktooligosaharide (Prata et al., 2010).

Praćenjem dinamike promene sadržaja metabolita tokom patogeneze uočeno je, da se odbrambeni odgovori ploda jabuke ponavljaju, ali u različitom vremenu u zavisnosti od patogena koji prouzrokuje infekciju (*P. expansum* ili *P. crustosum*). Plod jabuke je intenzivnije i dinamičnije reagovao na infekciju *P. expansum*, što je i očekivano, jer je izolat *P. expansum* bio virulentniji od izolata *P. crustosum*. U oba patosistema došlo je do smanjenja koncentracije ukupnog askorbata dva puta, ali je u slučaju inokulacije ploda *P. expansum* smanjenje koncentracije askorbata uočeno je ranije (6 hpi i 5 dpi), u odnosu na plod inokulisan *P. crustosum*, gde je smanjenje koncentracije askorbata zabeleženo je 3 i 11 dpi. Slično je bilo i sa dinamikom promena u koncentraciji fenola i glutaciona. U oba patosistema smanjenje koncentracije fenola vodilo je akumulaciji glutaciona, što upućuje na to da stres koji dovodi do smanjenja fenola predstavlja signal za sintezu glutaciona, ključnog odbrambenog jedinjenja koje ima ulogu antioksidanta i signalnog molekula. Tako je, u plodovima jabuka inokulisanim *P. crustosum* smanjenje koncentracije fenola 6 hpi i 5 dpi, praćeno povećanjem koncentracije glutaciona 24 hpi i 7 dpi, dok je u plodovima jabuka inokulisanim *P. expansum* smanjenje koncentracije fenola (6 hpi), izazvalo povećanje koncentracije glutaciona 24 hpi i 3 dpi. U kasnijim fazama razvoja bolesti (7 dpi) smanjenje koncentracije fenola nije izazvalo povećanje koncentracije glutaciona 11 dpi, jer je *P. expansum* uspeo da slomi odbrambeni sistem ploda jabuke. U oba patosistema, uočen slom odbrane ploda jabuke manifestovao se smanjenjem ukupnog sadržaja fenola i glutaciona, koje se brže događa u plodovima jabuke zaraženim *P. expansum*. Slom

otpornosti ploda jabuke koji je *P. crustosum* prouzrokovao 5 dpi bio je privremen i plod se oporavio i odoleo pritisku patogena do kraja eksperimenta (11 dpi).

Poznavanje dinamike odbrambenog odgovora ploda jabuke na infekciju gljivama *P. expansum* i *P. crustosum*, može dati značajan doprinos u zaštiti plodova od propadanja u toku čuvanja. Kako se odbrambeni mehanizmi ploda manifestuju kroz promene koncentracije antioksidanata u toku razvoja bolesti, sprečavanje progresije bolesti moglo bi se sprečiti primenom ovih jedinjenja ili dodavanjem njihovih prekursora.

7. ZAKLJUČAK

Plodovi jabučastog voća, jabuke, kruške, dunje i mušmule, sa simptomima plave truleži prikupljeni su iz skladišta sa različitim uslovima čuvanja tokom 2014. i 2015. godine. Etiologija plave truleži je ispitana i proučena je dinamika promena metabolita ploda jabuke u toku interakcije sa prouzrokovateljima plave truleži i izvedeni su sledeći zaključci:

- Iz plodova sa simptomima u vidu svetlosmeđih do smeđih, ugnutih pega i zona sa razmekšalim tkivom u okviru kojih se javlja obilna plavozelena sporulacija izolovane su gljive koje su po morfološkim karakteristikama odgovarale *Penicillium* spp. Iz 112 plodova sakupljenih iz 20 lokaliteta dobijeno je 96 izolata i to 71 iz plodova jabuke, 14 iz plodova kruške, 10 iz plodova dunje i jedan izolat iz ploda mušmule.
- Dobijeni izolati ispoljili su patogenost na plodovima jabuke, a izolati iz kruške, dunje i mušmule i na domaćinu iz koga su izolovani.
- Na osnovu molekularnih odlika primenom specifičnih prajmera za poligalakturonazu detektovani su izolati *P. expansum*, a na osnovu karakteristika četiri genska regiona (ITS, *BenA*, *CaM*, *RPB2*), analizom pojedinačnih i spojenih sekvenci (multilokus), kao prouzrokovaci plave truleži jabučastog voća u Srbiji identifikovane su tri vrste roda *Penicillium*: *P. expansum*, *P. crustosum* i *P. solitum*.
- Najčešće izolovana vrsta roda *Penicillium* iz jabučastog voća bila je *P. expansum* (91,67%), a zatim *P. crustosum* (7,29%), dok je zastupljenost *P. solitum* bila 1,04%. *P. expansum* je izolovan iz plodova jabuke, kruške i dunje, *P. crustosum* iz plodova jabuke, kruške, dunje i mušmule, a *P. solitum* iz ploda dunje.
- Novi nalazi u ovoj disertaciji su prvi opis *P. crustosum* i *P. solitum* kao prouzrokovaca plave truleži plodova dunje i *P. crustosum* kao prouzrokovaca plave truleži plodova mušmule u svetu, kao i prvi opis *P. expansum* kao prouzrokovaca plave truleži plodova dunje u Srbiji. *P. expansum* i *P. crustosum* identifikovani kao prouzrokovaci plave truleži plodova jabuke i kruške potvrdili su rezultate prethodnih istraživanja u svetu i u Srbiji.
- Molekularne analize pokazale su genetičku varijabilnost izolata u okviru vrste *P. expansum* na određenim pozicijama u tri genska lokusa (*BenA*, *CaM* i *RPB2*) i vrste *P. crustosum* u dva genska lokusa (*CaM* i *RPB2*) što pokazuje postojanje različitih haplotipova kod izolata ove dve vrste. Na osnovu ITS regiona nije uočena varijabilnost među ispitivanim izolatima *Penicillium* spp.
- Na različitim hranljivim podlogama (MEA, CYA, YES i PDA) izolati *P. expansum*, *P. crustosum* i *P. solitum* formirali su plavozelene kolonije sa ili bez eksudata, različite boje naličja (krem, žuta ili kremcrvena). Na osnovu brzine porasta kolonije, boje naličja kolonija na PDA i MEA (krem ili žuto naličje), kao i razlike u obojenosti naličja na CYA, izolati *P. expansum* razdvojili u dve grupe, dok su se izolati *P. crustosum* na osnovu brzine porasta kolonija na različitim podlogama razdvojili u tri grupe.
- Ispitivani izolati *P. expansum*, *P. crustosum* i *P. solitum* iz plodova jabučastog voća formirali su *terverticillata*, ređe *biverticillata* konidiofore, cilindrične rame i metule, cilindrične do ampuliformne fialide i konidije glatkih zidova koje se formiraju u nizu; konidiofore *P. expansum* su bile glatkih zidova, stipe, rame i metule *P. crustosum* nazubljenih zidova, a kod *P. solitum* stipe su bile nazubljene, rame glatkih ili blago nazubljenih zidova, a metule i fialide glatke; oblik konidija se nije razlikovao; u odnosu na *P. expansum* i *P. crustosum* izolat *P. solitum* je formirao veće konidije, šire metule i kraće i šire rame.
- Produkcija ciklopiazonske kiseline uočena je kod šest izolata *P. expansum*, dok je produkcija drugih alkaloida uočena kod 12 izolata *P. expansum*, kao i izolata *P. crustosum* i *P. solitum*.
- Izolati *P. expansum* su bili virulentniji od izolata *P. crustosum* na inokulisanim plodovima jabuka sorti Zlatni Delišeš, Crveni Delišeš i Greni Smit. Izolat *P. solitum* je ispoljio najslabiju virulentnost. Najveća razlika u virulentnosti između *P. expansum* i *P. crustosum* uočena je na

plodovima jabuke sorte Crveni Delišeš. Obe vrste su najslabiju virulentnost ispoljile na plodovima jabuke sorte Greni Smit. Izolati *P. crustosum* su se na osnovu virulentnosti, grupisali u tri grupe.

- PCA i klaster analiza na osnovu molekularnih odlika četiri regiona (ITS, *BenA*, *CaM*, *RPB2*), morfoloških karakteristika i virulentnosti jasno su razdvojile i potvrdile identifikaciju vrsta. Osim toga, kod vrsta *P. expansum* i *P. crustosum* utvrđena je intraspecijska varijabilnost: klaster analiza na osnovu makromorfoloških i molekularnih osobina pokazala je postojanje dve grupe u okviru vrste *P. expansum*, a na osnovu makromorfoloških, molekularnih osobina i virulentnosti postojanje tri grupe u okviru vrste *P. crustosum*.
- U plodovima jabuke sorte Ajdared nakon inokulacije izolatima *P. expansum* i *P. crustosum* došlo je do aktiviranja odbrambenih mehanizama ploda koji su se ogledali u dinamičkim promenama u koncentraciji primarnih metabolita (šećera: saharoze, glukoze i fruktoze i organskih kiselina: jabučne i šikiminske kiseline) i antioksidanata (glutaciona, askorbata i fenola).
- Promene u koncentraciji primarnih metabolita i antioksidanata u zaraženom plodu bile su slične i ponavljale su se u toku razvoja bolesti, ali je dinamika tih promena zavisila od patogena koji prouzrokuje infekciju (*P. expansum* ili *P. crustosum*). Reakcija ploda jabuke bila je intenzivnija i dinamičnija nakon inokulacije izolatima *P. expansum* koji je virulentniji.
- U plodu jabuke, nakon inokulacije izolatima *P. expansum* ili *P. crustosum*, dinamičke promene u koncentraciji šećera i organskih kiselina ukazuju na brzu konverziju primarnih metabolita u cilju dobijanja energije potrebne za sintezu odbrambenih jedinjenja. Naizmenične promene u koncentraciji šećera u inokulisanom plodu jabuke tokom kolonizacije potvrđuju da šećeri igraju vitalnu ulogu u signalizaciji i obezbeđivanju izvora energije za odbrambene reakcije ploda.
- U toku razvoja bolesti došlo je do smanjenja koncentracije ukupnog askorbata dva puta, u oba patosistema, ali je u slučaju inokulacije ploda *P. expansum* promena uočena ranije, u odnosu na plod inokulisan *P. crustosum*. Slično, u oba patosistema u toku razvoja bolesti smanjenje koncentracije fenola vodilo je akumulaciji glutaciona dva puta u toku eksperimenta, ali je u plodovima jabuka inokulisanim *P. crustosum* promena uočena kasnije nego u plodovima jabuka inokulisanim *P. expansum*.
- U kasnijim fazama bolesti u plodu inokulisanom *P. expansum* smanjenje koncentracije fenola nije izazvalo povećanje koncentracije glutaciona jer je *P. expansum* uspeo da slomi odbrambene mehanizme ploda jabuke. Uočen slom odbrane ploda jabuke koji se manifestovao smanjenjem ukupnog sadržaja fenola i glutaciona, brže se događao u plodovima jabuke zaraženim *P. expansum*. Slom otpornosti ploda jabuke koji je *P. crustosum* prouzrokovao ubrzo posle pojave simptoma bio je privremen i plod se oporavio i odoleo pritisku ovog patogena do kraja eksperimenta.
- Poznavanje dinamike odbrambenog odgovora ploda na infekciju gljivama *P. expansum* i *P. crustosum*, može dati značajan doprinos u zaštiti od propadanja u toku čuvanja, jer povećanje sinteze glutaciona ili fenola, dodavanjem ovih jedinjenja ili njihovih prekursora u toku razvoja bolesti može doprineti odbrambenim mehanizmima ploda i sprečiti progresiju bolesti.

8. LITERATURA

- Ackermann, J., Fischer, M., Amado, R. (1992). Changes in Sugars, Acids, and Amino Acids during Ripening and Storage of Apples (Cv. Glockenapfel). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40:1131-1134.
- Ainsworth, E.A., 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.
- Alwakeel, S.S. (2013). Molecular identification of isolated fungi from stored apples in Riyadh, Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Science*, 20:311-317.
- Amiri, A., 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.
- Andersen, B., Smedsgaard, J., Frisvad, J.C. (2004). *Penicillium expansum*: Consistent production of patulin, chaetoglobosins, and other secondary metabolites in culture and their natural occurrence in fruit products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52:2421-2428.
- Andersen, B., Thrane, U. (2006). Food-borne fungi in fruit and cereals and their production of mycotoxins. *Advances in Food Mycology*, 571:137-152.
- Arsenijević, M., Jasnić, S. (1988). O nalazu *Pestalotiopsis* sp. (Syn. *Pestalotia* sp.) na uskladištenim plodovima jabuke. *Zaštita bilja*, 186:443-449.
- Arsenijević, M., Gavrilović, V. (2005). *Phomopsis perniciosa* Grove - uzročnik truleži uskladištenih plodova jabuke. *Pesticidi i Fitomedicina*, 20:189-194.
- Babović, M., Perišić, M., Marković, S., Stojanović, S., Pantelić, Z. (1979). Investigation on rot of apple fruits in cold storehouse. *Zaštita bilja* 147:83-87.
- Babović, M., Bulajić, A., Tošić, B. (1994). *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc izazivač propadanja uskladištenih plodova jabuke. *Zbornik rezimea sa trećeg jugoslovenskog kongresa o zaštiti bilja, Vrnjačka Banja*, str. 50.
- Babović, V.M., Jakovljević, D., Kranjaja, V.S. (1997). *Botrytis cinerea* prouzrokovao truleži uskladištenih plodova jabuke. *Zbornik rezimea trećeg jugoslovenskog savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor*, str. 100.
- Barad, S., Horowitz, S., Kobiler, I., Sherman, A., Prusky, D. (2014). Accumulation of the mycotoxin patulin in the presence of gluconic acid contributes to pathogenicity of *Penicillium expansum*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 27:66–77.
- Barreto, M.C., Houbaken, J., Samson, R.A., Frisvad, J.C., San-Romão M.V. (2011). Taxonomic studies of the *Penicillium glabrum* complex and the description of a new species *P. subericola*. *Fungal Diversity*, 49:23–33.
- Barkai-Golan, R. (1974). Species of *Penicillium* causing decay of stored fruits and vegetables in Israel. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, 54:141-145.

- Barkai-Golan, R. (2001). In *Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables. Development and Control*. Elsevier Science, B.V. The Netherlands.
- Barkai-Golan, R. (2008). *Penicillium* mycotoxins. In *Mycotoxins in Fruit and Vegetables* (Barkai-Golan and Paster). Elsevier Inc, USA.
- Batra, L.R. (1991). *World Species of Monilinia* (Fungi): Their Ecology, Biosystematics and Control. Berlin, Germany.
- Battilani, P., Barbano, C., Logrieco, A. (2008). Risk Assessment and Safety Evaluation of Mycotoxins in Fruits. In *Mycotoxins in Fruits and Vegetables* (Barkai-Golan and Paster, eds.). Elsevier Inc, pp. 9.
- Begić-Akagić, A., Spaho, N., Oručević, S., Drkenda, P., Kurtović, M., Gaši, F., Kopjar, M., Piližota, V. (2011). Influence of cultivar, storage time, and processing on the phenol content of cloudy apple juice. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 3: 1–8.
- Berrie, A.M., Holb, I. (2014). Apple Scab. In *Compendium of Apple and Pear Diseases* (Sutton et al. eds.). APS Press, St. Paul, Minnesota, pp. 8-11.
- Bertetti, D., Guarnaccia, V., Spadaro, D., Gullino, M.L. (2018). First Report of Fruit Rot in European Pear Caused by *Diaporthe eres* in Italy. *Plant Disease*, 102(12):2651.
- Biango-Daniels, M.N., Hodge, K.T. (2018). *Paecilomyces* Rot: A New Apple Disease. *Plant Disease*, 102(8):1581–1587.
- Blakeslee, A. (1915). Lindner's roll tube method of separation cultures. *Phytopathology*, 5:68–69.
- Bolouri-Moghaddam, M.R., Le Roy, K., Xiang, L., Rolland, F., Van den Ende, W. (2010). Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells, *FEBS Journal*, 277:2022–2037.
- Bolton, M.D. (2009). Primary metabolism and plant defense—fuel for the fire. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 22:487–497.
- Borecka, H. (1977). Fungi of the genus *Penicillium* on apples and pears during the storage period. *Acta Agrobotanica*, 30:213-227.
- Boruta, T., Przerywacz, P., Ryngajllo, M., Bizukojc, M. (2018). Bioprocess-related, morphological and bioinformatic perspectives on the biosynthesis of secondary metabolites produced by *Penicillium solitum*. *Process Biochemistry*, 68:12-21.
- Borve, J., Roen, D., Stensvand, A. (2013). Harvest time influences incidence of storage diseases and fruit quality in organically grown ‘Aroma’ apples. *European Journal of Horticultural Science*, 78:232–238.
- Brown, E.A., Britton, K.O. (1986). *Botryosphaeria* diseases of apple and peach in the Southeastern United States. *Plant Disease*, 70:480-4.
- Browicz, K., (1972). *Mespilus* L. In *Flora of Turkey and the East Aegean Islands* (Davis ed.). Edinburgh University Press, Edinburgh, pp. 128–129.

- Brown-Rytlewski, D., McManus, P. (2000). Virulence of *Botryosphaeria dothidea* and *Botryosphaeria obtusa* on apple and management of stem cankers with fungicides. *Plant Disease*, 84:1031-1037.
- Buron- Moles, G., Wisniewski, M., Vinas, I., Teixido, N., Usall, J., Droby, S., 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.
- Byrde, R. J. W. Willetts, H. J. (1977). *The Brown Rot Fungi of Fruit. Their Biology and Control*. Pergamon Press, Oxford.
- CABI (2021). *Penicillium expansum*. In: *Invasive Species Compendium*. Wallingford, UK: CAB International. www.cabi.org/isc.
- Carbone, K., Giannini, B., Picchi, V., Scalzo, R.L., Cecchini, F. (2011). Phenolic composition and free radical scavenging activity of different apple varieties in relation on the cultivar, tissue type and storage. *Food Chemistry*, 127:493–500.
- Casati, P., Drincovich, M.F., Edwards, G.E., Andreo, C.S. (1999). Malate metabolism by NADP-malic enzyme in plant defense. *Photosynthesis Research*, 61:99–105.
- Chandran, S.S., Yi, J., Draths, K.M., von Daeniken, R., Weber, W. Frost, J.W. (2003). Phosphoenolpyruvate availability and the biosynthesis of shikimic acid. *Biotechnology Progress*, 19:808–814.
- Chatterton, S., Wylie, A.C., Punja, Z.K. (2012). Fruit infection and postharvest decay of greenhouse tomatoes caused by *Penicillium* species in British Columbia. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 34(4):524-535.
- Coates, L.M., Johnson, G.I. (1997). Postharvest diseases of fruit and vegetables. In *Plant Pathogens and Plant Diseases* (Brown and Ogle eds.). Rockvale Publications, pp. 533-547.
- Cole, R.J., Schweikert, M.A. (2003). *Handbook of Secondary Fungal Metabolites*. Academic Press, Amsterdam, The Netherlands, pp. 147-148.
- Combrink, J.C., Kotze, J.M., Wehner, F.C., Grobbelaar, C.J. (1985). Fungi associated with core rot of Starking apples in South Africa. *Phytophylactica*, 17:81-83.
- Cossentine, J.E., Sholberg, P.L., Jensen, L.B.J., Bedford, K.E., Shephard, T.C. (2004). Fumigation of empty fruit bins with carbon dioxide to control diapausing codling moth larvae and *Penicillium expansum* Link. ex Thom spores. *Hortscience*, 39:429-432.
- Cote, M.J., Tardif, M.C. and Meldrum, A.J. (2004). Identification of *Monilinia fuctigena*, *M. fruticola*, *M. laxa*, and *Monilia polystroma* on inoculated and naturally infected fruit using multiplex PCR. *Plant Disease*, 88:1219-1225.
- Čebulj, A., Cunja, V., Mikulič-Petkovšek, M., Veberič, R. (2017). Importance of metabolite distribution in apple fruit. *Scientia Horticulturae*, 214:214–220.

- 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.
- Delgado-Cerrone, L., Mondino-Hintz, P., Alaniz-Ferro, S. (2016). *Botryosphaeriaceae* species associated with stem canker, die-back and fruit rot on apple in Uruguay. *European Journal of Plant Pathology*, 146:637-655.
- Dobra, A., Dussi, M.C., Díaz, K., Sugar, D. (2015). First report of *Aureobasidium pullulans* as a postharvest disease of 'abate fetel' pears from an organic orchard in Rio Negro, Argentina. *Acta Horticulturae*, 1094:579-582.
- Domsch, K.H., Gams. W., Anderson T.H. (1980). *Compendium of soil fungi*. Vol.1. Academic Press (London) LTD 24/28 Oval Road London NW1, pp. 859.
- Duduk, N., Lazarević, M., Žebeljan, A., Vasić, M., Vico, I. (2017). Blue mould decay of stored onion bulbs caused by *Penicillium polonicum*, *P. glabrum* and *P. expansum*. *Journal of Phytopathology*, 165:662–669.
- Duduk, N., Bekčić, F., Žebeljan, A., Vučković, N., Vico, I. (2020). First Report of Blue Mold Caused by *Penicillium crustosum* on Nectarine Fruit in Serbia. *Plant Disease*, 105(2):487.
- Đurović, D. (2021). Posebno voćarstvo i jabučaste voćke. Univerzitet u Beogradu – Poljoprivredn fakultet. Beograd, pp. 5,7.
- Elhariry, H., Bahobial, A.A. & Gherbawy, Y. (2011). Genotypic identification of *Penicillium expansum* and the role of processing on patulin presence in juice. *Food and Chemical Toxicology*, 49(4):941-946.
- European Union (2003). Commission regulation (EC) No. 1425/2003 of 11 August 2003 amending regulation (EC) No 466/2001 as regards patulin. *Official Journal of the European Union* L 203/13.
- Farr, D.F. and Rossman, A.Y. *Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA*. <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/> (accessed 27 januar 2022).
- Ferrada, E.E., Naranjo, P., Briceño, E.X., Lolas, M., Díaz, G.A. (2020). Occurrence of *Botrytis prunorum* Causing Calyx-End Rot in European Pear Fruits During Cold Storage in Chile. *Plant Disease*, 104(2):590.
- Food and Agriculture Organization (2018). Preventing post-harvest losses in the apple supply chain in Lebanon. Beirut: The Food and Agriculture Organization of the United Nations and the Ministry of Lebanon.
- Food and Agriculture Organization. FAOstat. World Agriculture Statistics Data Base. 2022. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> (preuzeto 26 januara 2022).
- Foyer, C.H., Noctor, G. (2005). Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environment*, 28:1056–1071.
- Foyer, C.H., Noctor, G. (2011). Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiology*, 155:2–18.

- Francini, A., Sebastiani, L. (2013). Phenolic compound in Apple (*Malus x domestica* Borkh.): Compounds Characterization and Stability during Postharvest and after Processing. *Antioxidants*, 2:181-193.
- Frisvad, J.C. (1981). Physiological criteria and mycotoxin production as aids in identification of common asymmetric *Penicillia*. *Applied and Environmental Microbiology* 41:568–579.
- Frisvad, J.C., Filtenborg, O., Lund, F., and Samson, R.A. (2000). The homogeneous species and series in subgenus *Penicillium* are related to mammal nutrition and excretion. In *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification* (Samson and Pitt eds.). Harwood Academic Publishers, N.Y., USA, pp. 265-283.
- Frisvad, J.C., Samson, R.A. (2004). Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Studies in Mycology*, 49:1–174.
- Fu, M., Crous, P.W., Bai, Q., Zhang, P.F., Xiang, J., Guo, Y.S., Zhao, F.F., Yang, M.M., Hong, N., Xu, W.X., Wang, G.P. (2019). *Colletotrichum* species associated with anthracnose of *Pyrus* spp. in China. *Persoonia*, 42:1–35.
- Gariepy, T.D., Rahe, J.E., Lévesque, C.A., Spotts, R.A., Sugar, D.L., Henriquez, J.L. (2005). *Neofabraea* species associated with bull's-eye rot and cankers of apple and pear in the Pacific Northwest. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 27:118-124.
- Gao, L.L., Zhang, Q., Sun, X.Y., Jiang, L., Zhang, R., Sun, G.Y., Zha, Y.L., Biggs, A.R. (2013). Etiology of moldy core, core browning, and core rot of Fuji apple in China. *Plant Disease*, 97:510-516.
- Glass, N.L., Donaldson, G.C. (1995). Development of premier sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 61:1323–1330.
- Glos, H., Bryk, H., Michalecka, M., Poniatowska, A., Pulawska, J. (2021). First report of *Diaporthe* *eres*, a new pathogen causing rot of apples during storage period in Poland. *Journal of Plant Pathology*, 103:393–394.
- Gomes, R.R., Glienke, C., Videira, S.I.R., Lombard, L., Groenewald, J.Z., Crous, P.W. (2013). *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. *Persoonia*, 31:1-41.
- Gonçalves, V.N., Campos, L.S., Melo, I.S., Pellizari, V.H., Rosa, C.A., Rosa, L.H. (2013). *Penicillium solitum*: a mesophilic, psychrotolerant fungus present in marine sediments from Antarctica. *Polar Biology*, 36:1823–1831.
- Gong, D., Bi, Y., Li, Y., Zong, Y., Han, Y., Prusky, D. (2019). Both *Penicillium expansum* and *Trichothecium roseum* infections promote the ripening of apples and release specific volatile compounds, *Frontiers in Plant Science*, 10:338.
- Gong, D., Bi, Y., Zong, Y., Li, Y., Sionov, E., Prusky, D. (2021). *Penicillium expansum* – Induced release of branched-chain volatile compounds in apple fruit by increasing amino acids accumulation. *Postharvest Biology and Technology*, 173:111432.

- Gougouli, M., Koutsoumanis, K.P. (2010). Modelling growth of *Penicillium expansum* and *Aspergillus niger* at constant and fluctuating temperature conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 140 (2–3):254-262.
- Gow, N.A.R., Gadd, G.M. (1995). *The growing fungus*. Chapman and Hall, London.
- Grantina-Ievina, L., (2015). Fungi causing storage rot of apple fruit in integrated pest management system and their sensitivity to fungicides. *Rural Sustainability Research* 34:1-11.
- Grace, S.C. (2005). Phenolics as antioxidants, in: *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants* (Smirnoff ed.). Blackwell, Oxford.
- Grahovac, M. (2014). Biološko suzbijanje *Colletotrichum* spp. parazita uskladištenih plodova jabuke. Doktorska disertacija. Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
- Guerber, J.C., Liu, B., Correll, J.C., Johnston, P.R. (2003). Characterization of Diversity in and Intron *Colletotrichum acutatum* sensu lato by Sequence Analysis of Two Gene Introns, mtDNA RFLPs, and Mating Compatibility. *Mycologia*, 95(5):872-95.
- Gullner, G., Zechmann, B., Künstler, A., Kiraly, L. (2017). The signaling roles of glutathione in plant disease resistance. In *Glutathione in Plant Growth, Development, and Stress Tolerance* (Hossain, et al. eds.). Springer International Publishing.
- Habib, W., Masiello M., Chahine-Tsouvalakis, H., Al Moussawi, Z., Saab, C., Tohmé Tawk, S., Piemontese, L., Solfrizzo, M., Logrieco, A.F., Moretti, A., Susca, A. (2021). Occurrence and Characterization of *Penicillium* Species Isolated from Post-Harvest Apples in Lebanon. *Toxins*, 13:730.
- Hadas, Y., Goldberg, I., Pines, O., Prusky, D., (2007). Involvement of gluconic acid and glucose oxidase in the pathogenicity of *Penicillium expansum* in apples. *Phytopathology*, 97: 384–390.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4:9.
- Hasan, H. (2000). Patulin and aflatoxin in brown rot lesion of apple fruits and their regulation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16:607–612.
- Heald, F.D., Ruehle, G.D. (1931). The rots of Washington apples in cold storage. *Wash. Agric. Ex. Stn. Bull.* 253:48.
- Hecke, H., Herbinger, K., Veberič, R., Trobec, M., Toplak, H., Štampar, F., Keppel, H., Grill, D. (2006). Sugar-, acid- and phenol content in apple cultivars from organic and integrated fruits cultivation. *European Journal of Clinical Nutrition*, 60:1136–1140.
- Hocking A.D., Pitt J.I. (1980). Dichloran-glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low-moisture foods. *Applied and Environmental Microbiology* 39: 488–492.
- Hocking, A.D., Holds, K., Torbin, N.F. (1988). Intoxication by tremorgenic mycotoxin (penitrem A). *Australian Veterinary Journal*, 65:82-85.

- Holb, I.J. (2004). Effect of acidity on growth rate and stroma formation of *Monilia fructigena* and *M. polystroma* isolates. *International Journal of Horticultural Science*, 10:63–67.
- Holmes, R. (1990). An Analysis of Post-Harvest Losses in the Victorian Pome Fruit Industry. Report no. 115. Victoria, Australia: Department of Agricultural and Rural Affairs.
- Hong, S-B., Cho, H-S., Shin, H-D., et al. (2006). Novel *Neosartorya* species isolated from soil in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56: 477–486.
- Hoog de, G.S., Gerrits van den Ende, A.H. (1998). Molecular diagnostics of clinical strains of filamentous Basidiomycetes. *Mycoses*, 41:183–189.
- Hou, Y.M., Zhang, X., Zhang, N.N., Naklumpa, W., Zhao, W.Y., Liang, X.F., Zhang, R., Sun, G.Y., Gleason, M.L. (2019). Genera *Acremonium* and *Sarocladium* Cause Brown Spot on Bagged Apple Fruit in China. *Plant Disease*, 103(8):1889–1901.
- Houbraken, J., Samson, R.A. (2011). Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of Trichocomaceae into three families. *Studies in Mycology*, 70:1-51.
- Houbraken, J., Spierenburg, H., Frisvad, J.C. (2012). *Rasamsonia*, a new genus comprising thermotolerant and thermophilic *Talaromyces* and *Geosmithia* species. *Antonie van Leeuwenhoek* 101: 403–421.
- Houbraken, J., Wang, L., Lee, H.B., Frisvad, J.C. (2016). New sections in *Penicillium* containing novel species producing patulin, pyripyropens or other bioactive compounds. *Persoonia*, 36: 299–314.
- Houbraken, J., Kocsube, S., Visagie, C.M., Yilmaz, N., Wang, X.-C., Meijer, M., Kraak, B., Hubka, V., Samson, R.A., Frisvad, J.C. (2020). Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (*Eurotiales*): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. *Studies in Mycology*, 95:5-169.
- Hrustić, J., Grahovac, M., Mihajlović, M., Delibašić, G., Ivanović, M., Nikolić, M., Tanović, B. (2012). Molecular detection of *Monilinia fructigena* as causal agent of brown rot on quince. *Pesticides and Phytomedicine*, 27:15-24.
- Hyun, T.K., Eom, S.H., Rim, Y., Kim, Y.-S. (2011). Alteration of the expression and activation of tomato invertases during *Botrytis cinerea* infection, *Plant Omics* 4:413–417.
- Ivić, D., Voncina, D., Sever, Z., Simon, S. and Pejić, I. (2013). Identification of *Colletotrichum* Species Causing Bitter Rot of Apple and Pear in Croatia. *Journal of Phytopathology*, 161:284–286.
- Jackson, L., Dombrink-Kurtzman, M.A. (2006). Patulin. In *Microbiology of Fruits and Vegetables* (Sapers et al., ed.). CRC Press Taylor and Francis Group, Boca Raton. FL, U.S.A., pp. 282, 294.
- Jeandet, P., Formela-Luboińska, M., Labudda, M., Morkunas, I. (2022). The Role of Sugars in Plant Responses to Stress and Their Regulatory Function during Development. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9): 5161.

- Jia, X-H., Fu, J-F., Wang, W-H., Cui, J-C., Du, Y-M., Zhou, R-J., Sun, P-P. (2018). First report of *Athelia bombacina* causing postharvest fruit rot on pear. *Journal of Integrative Agriculture*, 17(11):2596–2599.
- Jin-Hyeuk, K., Jinwoo, K., Won-Il K. (2011). First Report of *Rhizopus oryzae* as a Postharvest Pathogen of Apple in Korea. *Mycobiology*, 39:140–142.
- Jolliffe, I. (2002). Book, Principal Component Analysis (2 edn). Springer series in statistics, New York, 2002.
- Julca, I., Droby, S., Sela, N., Marcet-Houben, M., Gabaldon, T. (2015). Contrasting genomic diversity in two closely related postharvest pathogens: *Penicillium digitatum* and *Penicillium expansum*. *Genome Biology and Evolution*, 8: 218–227.
- Jurick II, W.M., Vico, I., Gaskins, V.L., Garrett, W.M., 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.
- Jurick II, W. M., Vico, I., Gaskins, V. L Janisiewicz, W. J.. and Peter K. A (2013a). First report of *Botryosphaeria dothidea* causing white rot on apple fruit in Maryland. *Plant Disease*, 97: 999.
- Jurick II, W.M., Vico, I., Gaskins, V., Janisiewicz, W. J. and Peter, K.A. (2013b). First report of *Neofusicoccum ribis* causing postharvest decay of apple fruit from cold storage in Pennsylvania. *Plant Disease*, 97:7.
- Jurick II, W.M., Cox, K.D. (2016). Pre and postharvest fungal apple diseases. In *Achieving Sustainable Apple Production*; Evans, K., Ed.; Burleigh Dodds Science Publishing: Cambridge, UK.
- Karlshøj, K., Nielsen, P.V., Larsen, T.O. (2007). Fungal volatiles: Biomarkers of good and bad food quality. In *Food Mycology. A Multifaceted Approach to Fungi and Food* (Dijksterhuis and Samson, ed.), pp. 284.
- KC, A.N., Rasmussen, A.L. (2019). First Report of *Diaporthe rudis* Causing Fruit Rot of European Pears in the United States. *Plant disease*, 103(8):2132.
- Keserović, Z., Magazin, N., Injac M., Totis, F., Milić, B., Dorić, M., Petrović, J. (2013). Integralna proizvodnja jabuke. Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, p. 250.
- Kim, Y.K., Xiao, C.L. (2008). Distribution and incidence of *Sphaeropsis* rot in apple in Washington State. *Plant Disease*, 92:940–946.
- Kingsnorth, J., Perrine, J., Berrie, A., Saville, R. (2017). First report of *Neofabraea kienholzii* causing bull's eye rot of apple in the UK. *New Disease Reports*, 36:15.
- Khokhar, I., Jia, Y. Mukhtar, I. Wang, J.H., Ruth, N., Eltoukhy, A., Fan, S.H., Li, X.J., Wang, J.Y., Yan, Y.C. First Report of *Rhizopus oryzae* Causing Postharvest Fruit Rot on Pear in China. *Plant disease*, 104(6):1423.
- Koffmann, W., Penrose, L.J. (1987). Fungicides for the control of blue mould (*Penicillium* spp.) in pome fruits. *Scientia Horticulturae*, 31:225- 232.

- Köhl, J., Groenenboom-de Haas B.H., Kastelein, P., Rossi, V., Waalwijk, C. (2009). Quantitative Detection of Pear-Pathogenic *Stemphylium vesicarium* in Orchards. *Phytopathology*, 99:1377-1386.
- Konstantinou, S., Karaoglanidis, G.S., Bardas, G.A., Minas, I.S., Doukas, E., Markoglou, A.N. (2011). Postharvest fruit rots of apple in Greece: Pathogen incidence and relationships between fruit quality parameters, cultivar susceptibility, and patulin production. *Plant Disease*, 95:666-672.
- Kumar, D., Barad, S., Chen, Y., Luo, X., Tannous, J., Dubey, A., Matana, N.G., Tian, S., Li, B., Keller, N., Prusky, D. (2017). LaeA regulation of secondary metabolism modulates virulence in *Penicillium expansum* and is mediated by sucrose, *Molecular Plant Pathology*, 18:1150–1163.
- Kunert K.J., Foyer C.H. (2023). The ascorbate/glutathione cycle. *Advances in Botanical Research*, 105: 77-112.
- Kuzniak, E., Sklodowska, M. (2001). Ascorbate, glutathione and related enzymes in chloroplasts of tomato leaves infected by *Botrytis cinerea*. *Plant Science*, 160:723–731.
- Lamb, C., Dixon, R.A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology*, 48:251–275.
- Lahuf, A.A., Kareem, A., Mohammadali, M.T., Li, J., Mohsen, H.M. (2020). First Report of *Alternaria alternata* Causing Leaf Spot on Quince (*Cydonia oblonga*) in Iraq. *Plant Disease*, 104(5):1538.
- Larcher, W. (2003). *Physiological Plant Ecology*. Springer Verlag, Berlin.
- Larsen, T.O., Frisvad, J.C. (1995). Chemosystematics of fungi in genus *Penicillium* based on profiles of volatile metabolites. *Mycological Research*, 99:1167-1174.
- Łata, B., Trąmpczyńska, A., Oleś, M. (2005). Antioxidant content in the fruit peel, flesh and seeds of selected apple cultivars during cold storage. *Folia Horticulturae*, 17(1):47-60.
- Łata, B., Trąmpczyńska, A., Paczesna, J. (2009). Cultivar variation in apple peel and whole fruit phenolic composition. *Scientia Horticulturae*, 121:176–181.
- Laundon, G.F. (1973). *Botryosphaeria obtusa*, *B. stevensii* and *Othia spiraeae* in New Zealand. *Transactions of the British Mycological Society*, 61:369-374.
- Libik-Konieczny, M., Surowka, E., Nosek, M., Goraj, S., Miszalski, Z. (2012). Pathogen-induced changes in malate content and NADP-dependent malic enzyme activity in C₃ or CAM performing *Mesembryanthemum crystallinum* L. plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34:1471-1477.
- Liu, Y.J., Whelen, S., Hall, B.D. (1999). Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Molecular Biology and Evolution* 16: 1799–1808.
- Liu, B.H., Wu, T.S., Yu, F.Y., Su, C.C. (2007). Induction of oxidative stress response by the mycotoxin patulin in mammalian cells. *Toxicological Sciences*, 95:340–347.

- Liu, F., Li, B-H., Lian, S., Dong, X-L., Wang, C-X., Zhang, Z-F., Liang, W-X. (2018). Effects of Temperature and Moisture on the Infection and Development of Apple Fruit Rot Caused by *Phytophthora cactorum*. *Plant Disease*, 102: 1811–1819.
- Locato, V., Cimini, S., De Gara, L. (2013). Strategies to increase vitamin C in plants: from plant defense perspective to food biofortification. *Frontiers in Plant Science*, 4:152.
- Lolas, M., Contreras, J.M., Méndez, R., Cáceres, M., Díaz, G.A. (2016). First Report of *Phytophthora* Fruit Rot in Apple Caused by *Phytophthora syringae* During Cold Storage in Maule Region, Chile. *Plant Disease*, 100(7):1507.
- Lopez, S.N., Sangorrin, M.P., and Pildain, M.B. (2016). Fruit rot of sweet cherries and raspberries caused by *Penicillium crustosum* and *Mucor piriformis* in South Patagonia, Argentina. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 38(4): 511-516.
- Louw, J.P., Korsten, L. (2014). Pathogenic *Penicillium* spp. on Apple and Pear. *Plant Disease*, 98:590-598.
- Louw, J.P., Korsten, L. (2016). Postharvest decay of nectarine and plum caused by *Penicillium* spp. *European Journal of Plant Pathology*, 146:779–791.
- Luciano-Rosario, D., Keller, N.P., Jurick, W.M. (2020). *Penicillium* spp.: Biology, omics, and management tools for a global postharvest pathogen causing blue mold of pome fruit. *Molecular Plant Pathology*, 21:1391–1404.
- Lund, F. (1995). Differentiating *Penicillium* species by detection of indole metabolites using a filter paper method. *Letters in Applied Microbiology*, 20:228 – 231.
- Majeed, T., Wani, I.A., Muzzaffar, S. (2018). Postharvest Biology and Technology of Quince. In *Postharvest Biology and Technology of Quince Biodiversity of Temperate Fruits* (Mir et al. eds.). Springer, Cham, pp. 273-284.
- Marek, P., Annamalai, Y., Venkitanarayanan, K. (2003). Detection of *Penicillium expansum* by polymerase chain reaction. *International Journal of Food Microbiology*, 89:139- 144.
- Marin-Felix, Y., Groenewald, J.Z., Cai, L., Chen, Q., Marincowitz, S., Barnes, I., Bensch, K., Braun, U., Camporesi, E., Damm, U. et al. (2017). Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 1. *Studies in Mycology*, 86:99-216.
- Marinelli, E., Orzali, L., Scalercio, S., Riccioni, L. (2012). First report of *Botryosphaeria dothidea* causing fruit rot of quince (*Cydonia oblonga*) in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 94(4):92.
- Martinelli, F., Dandekar, A. (2014). Functional genomics for the study of fruit ripening and quality: towards an integrative approach. In *Fruit Ripening, Physiology, Signalling and Genomics* (Nath et al. eds.). CABI, 2014, pp. 300,301.
- Martini, C., Di Francesco, A., Lantos, A., Mari, M. (2015). First Report of Asiatic Brown Rot (*Monilinia polystroma*) and Brown Rot (*Monilinia fructicola*) on Pears in Italy. *Plant Disease*, 99(4):556.

- Masclaux, F., Gueho, E., Hoog, G.S. de, et al. (1995). Phylogenetic relationships of human-pathogenic *Cladosporium* (*Xylohypha*) species inferred from partial LS rRNA sequences. *Medical Mycology*, 33:327–338.
- Mattheis, J.P., Roberts, R.G. (1992). Identification of Geosmin as a volatile metabolite of *Penicillium expansum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58:3170-3172.
- McCallum, J.L., Tsao, R., Zhou, T. (2002). Factors affecting patulin production by *Penicillium expansum*. *Journal of Food Protection*, 65:1937–1942.
- Mehdy, MC. (1994). Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiology*, 105:467–72.
- Michael, G., Roszak, A.W., Sauve, V., Maclean, J., Matte, A.,nCoggins, J.R., Cygler, M., Laphorn, A.J. (2003). Structures of shikimate dehydrogenase AroE and its paralog YdiB, a common structural framework for different activities, *Journal of Biological Chemistry*, 278:19463–19472.
- Mikulič-Petkovšek, M., Usenik, V., Štampar, F. (2003). The role of chlorogenic acid in the resistance of apples to apple scab (*Venturia inaequalis* (Cooke) G. Wind. Aderh.). In *Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Kmetijstvo, Univerza v Ljubljani*, 81:233–242.
- Mikulič-Petkovšek, M., Stampar, F., Veberic, R. (2008). Increased phenolic content in apple leaves infected with the apple scab pathogen. *Journal of Plant Pathology*, 90:49–55.
- Mikulič-Petkovšek, M., Slatnar, A., Stampar, F., Veberič, R. (2010). The influence of organic/integrated production on the content of phenolic compounds in apple leaves and fruits in four different varieties over a 2-year period. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(14):2366-2378.
- Mikulič-Petkovšek, M., Schmitzer, V., Slatnar, A., Štampar, F., Veberič, R. (2012). Composition of Sugars, Organic Acids, and Total Phenolics in 25 Wild or Cultivated Berry Species. *Food Science*, 77(10): C1064-C1070.
- Mirzaei, S., Goltapeh, E.M., Shams-bakhsh, M. (2007). Taxonomical studies on the genus *Botrytis* in Iran. *Journal of Agricultural Technology*, 3(1):65-76.
- Mišić, P. (1994). *Jabuka*. Nolit, Beograd.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7:405–410.
- Moral, J., Lovera, M., Benitez, M.J., Arquero, O., and Trapero, A. (2007). First report of *Botryosphaeria obtusa* causing fruit rot of quince (*Cydonia oblonga*) in Spain. *Plant Pathology*, 56:351.
- Morkunas, I., Ratajczak, L. (2014). The role of sugar signaling in plant defense responses against fungal pathogens, *Acta Physiologiae Plantarum*, 36:1607–1619.
- Moslem, M., Abd-Elsalam, K., Yassin, M. and Bahkali, A. (2010). First morphomolecular identification of *Penicillium griseofulvum* and *Penicillium aurantiogriseum* toxicogenic isolates associated with blue mold on apple. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7:857-861.

- Moss, M.O. (1987). Morphology and Physiology of *Penicillium* and *Acremonium*. In Biotechnology Handbooks: *Penicillium* and *Acremonium* (Peberdy ed.). Springer Science + Business Media, New York, pp 37-53.
- Mratinić, E., Đurović, D. (2015). Biološke osnove čuvanja voća. Partenon, Beograd.
- Mratinić, E. (2016a). Kruška. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd, pp. 10,11.
- Mratinić, E. (2016b). Dunja. Partenon, Beograd, pp. 5.
- Mulenko, W., Majewski, T., and Ruszkiewicz-Michalska, M. (2008). A preliminary checklist of Micromycetes in Poland. W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences 9: 752.
- Mullineaux, P.M., Rausch, T. (2005). Glutathione, photosynthesis and the redox regulation of stress-responsive gene expression. Photosynthesis Research, 86:459–474.
- Muntanola–Cvetković, M. (1987). Opšta mikologija. Niro Književne novine, Beograd, 13–320.
- Muñoz-Bertomeu, J., Lorences, E.P. (2014). Changes in xyloglucan endotransglucosylase / hydrolase (XTHs) expression and XET activity during apple fruit infection by *Penicillium expansum* Link. European Journal of Plant Pathology, 138:273–282.
- Naets, M., Bossuyt, L., De Coninck, B., Keulemans, W., Geeraerd, A. (2020). Exploratory study on postharvest pathogens of ‘Nicoter’ apple in Flanders (Belgium). Scientia Horticulturae, 260: 108872.
- NCBI Taxonomy Browser: *Penicillium expansum*.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>
- Noctor, G.N., Foyer, C.H. (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 49:249–279.
- Núñez, F., Westpha, C.D., Bermúdez, E., Asensio, M.A. (2007). Production of secondary metabolites by some terverticillate penicillia on carbohydrate-rich and meat substrates. Journal of Food Protection, 70(12):2829-2836.
- Onofre, B.S., Antonizzi, D. (2014). Behaviour of the fungus *Colletotrichum gloeosporoides* (Renz and Sacc), which causes bitter rot in apples after harvest. Advances in Microbiology, 4:202-206.
- Oliveri, C., Campisano, A., Catara A., Cirvilleri, G. (2007). Characterization and fAFLP genotyping of *Penicillium* strains from postharvest samples and packinghouse environments. Journal of Plant Pathology, 89(1):29-40.
- Osswald, H., Frank, H.K., Komitowski, D., Winter, H. (1978). Long-term testing of patulin administered orally to Sprague-Dawley rats and Swiss mice. Food and Cosmetics Toxicology, 16:243–247.
- Ostry, V., Skarkova, J., Ruprich, J. (2004). Occurrence of *Penicillium expansum* and patulin in apples as raw materials for processing of foods - case study. Mycotoxin Research, 20:24–28.

- Park, M.S., Kim, B-R., Park, I-H., Hahm, S-S. (2018). First Report of Two *Colletotrichum* Species Associated with Bitter Rot on Apple Fruit in Korea – *C. fructicola* and *C. siamensis*. *Mycobiology*, 46(2):154–158.
- Pastori, G.M., Kiddle, G., Antoniw, J., Bernard, S., Veljović-Jovanović, S., Verrier, P.J., Noctor, G., Foyer, C.H. (2003). Leaf vitamin C Contents Modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. *Plant Cell*, 15:939–951.
- Pašalić, D. (2009). Tehnologija skaldštenja jabučastog voća. Zbornik radova savetovanja inovacije u voćarstvu Beograd, pp. 79-92.
- Penrose, L.J., Nicholls, M.R., James, L. (1984). The relative importance of *Penicillium verrucosum* and *P. expansum* as the cause of blue mould and their reaction to benomyl. In Biology Branch Plant Diseases Survey (1982–83). Australia: New South Wales Department of Agriculture, 15–7.
- Perišić, M.M. (1972). *Penicillium expansum*, the cause of soft rot of apple fruits. *Jugoslovensko Voćarstvo*, 21/22:843-846.
- Peter, K.A., Vico, I., Gaskins, V., Janisiewicz, W.J., Saftner, R.A. and Jurick II, W.M. (2012). First report of *Penicillium carneum* causing blue mold on stored apples in Pennsylvania. *Plant Disease*, 96:1823.
- Peterson, S.W., Vega, F., Posada, F., et al. (2005). *Penicillium coffeae*, a new endophytic species isolated from a coffee plant and its phylogenetic relationship to *P. fellutanum*, *P. thiersii* and *P. brocae* based on parsimony analysis of multilocus DNA sequences. *Mycologia* 97: 659–666.
- Petroczy, M., Palkovics, L. (2009). First report of *Monilia polystroma* on apple in Hungary. *European Journal of Plant Pathology*, 125:343-347.
- Phillips, A., Alves, A., Correia, A., Luque, J. (2005). Two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella* anamorphs. *Mycologia*, 97:513-529.
- Phillips, A.J.L., Lopes, J., Abdollahzadeh, J., Bobev, S., Alves, A. (2012). Resolving the *Diplodia* complex on apple and other Rosaceae hosts. *Persoonia*, 29:29-38.
- Pianzzola, M.J., Moscatelli, M., Vero, S. (2004). Characterization of *Penicillium* Isolates Associated with Blue Mold on Apple in Uruguay. *Plant Disease*, 88:23-28.
- Pierson, C.F., Ceponis, M.J., McColloch, L.P. (1971). Market Diseases of Apples, Pears, and Quinces. *Agricultural Handbook*, US Department of Agriculture, pp. 376.
- Pitt, J.I. (1979). The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press Inc, London.
- Pitt J.I. (2002). Biology and Ecology of Toxigenic *Penicillium* Species. In *Mycotoxins and Food Safety* (deVries et al. eds). Springer, Boston, MA, pp. 29-41.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D. (2009). *Fungi and Food Spoilage*. Springer, New York, USA.

- Pitt, J.I. (2014). *Penicillium* | *Penicillium* and *Talaromyces*. In Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition) (Batt and Tortorello eds.). Elsevier, UK.
- Prencipe, S., Spadaro, D., Fruk, G., Jemric, T. (2016). First report of *Tilletiopsis pallescens* causing white haze on apple in Croatia. Plant Disease, 100:225.
- Prodromou, I., Thomidis, T., Zambounis, A. (2018). First report of *Penicillium expansum* (Link) Thom. causing postharvest fruit rot of kiwifruit in Northern Greece. Plant Disease, 102:1851.
- Prusky, D., Ben-Arie, R. (1985). Effect of imazalil on pathogenicity of *Penicillium spp.* causing storage rots of pome fruits. Plant Disease, 69:416-418.
- Prusky, D., and Yakoby N. (2003). Pathogenic fungi: leading or led by ambient pH?. Molecular Plant Pathology 4.6: 509-516.
- Puel, O., Galtier, P., Oswald, I.P. (2010). Biosynthesis and Toxicological Effects of Patulin. Toxins, 2:613- 631.
- Punja, K.Z. (2004). Fungal Disease Resistance in Plants, Biochemistry, Molecular Biology, and Genetic Engineering. Food Products Press® An Imprint of The Haworth Press, Inc. New York, London, Oxford.
- Qin, G., Liu, J., Cao, B., Li, B., Tian, S. (2011). Hydrogen peroxide acts on sensitive mitochondrial proteins to induce death of fungal pathogen revealed by proteomic analysis, PLoS One, 6:e21945.
- Radivojević, D., Marković, N. (2015). Voćarstvo i Vinogradarstvo. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd-Zemun, pp. 49.
- Ramon, M., Rolland, F., Sheen, J. (2008). Sugar Sensing and Signaling. The Arabidopsis Book, 6:e0117.
- Raper, K. B., Thom, C. (1949). A manual of the *Penicillia*. The Williams & Wilkins Company, Baltimore.
- Republički zavod za statistiku Srbije. Baza podataka. Biljna proizvodnja, od 2005: Ukupan prinos jabuke u 2014. godini u Republici Srbiji. Dostupno na: <http://webrzs.stat.gov.rs>
- Ristić, D., Stevanović, M., Stošić, S., Vučurović, I. (2016). *Diaporthe eres* as a pathogen of quince fruit (*Cidonia oblonga*) in Serbia. VII International Scientific Agriculture Symposium," Agrosym", 1270-1275.
- Rojas, C.M., Senthil-Kumar, M., Tzin, V., Mysore, K.S. (2014). Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense. Frontiers in Plant Science, 5(17):17.
- Roll, R., Matthiaschk, G., Korte, A. (1990). Embryotoxicity and mutagenicity of mycotoxins. Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology, 10:1-7.
- Rooney-Latham, S., Soriano, M.C. (2016). First report of *Neofusicoccum nonquaesitum* causing branch dieback of apple in California. Plant Disease, 100:1012.

- Rosenberger, D.A. (2014). Blue mold. In Compendium of apple and pear diseases (Sutton et al. eds.). St. Paul, MN: APS Press.
- Rosenberger, D. A., Xiao, C. L. (2014). Minor diseases. In Compendium of Apple and Pear Diseases (Sutton et al. eds.). APS Press, St. Paul, Minesota, pp. 86.
- Sadar, N., Urbanek Krajnc, A., Tojnko, S., Tijskens, L.M.M., Schouten, R.E., Unuk, T. (2016). Development and distribution of quality related compounds in apples during growth. *Scientia Horticulturae*, 213: 222-231.
- Samson, R.A., Pitt, J.I. (1985). General recommendations. In *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics* (Samson and Pitt eds). Plenum Press, London, pp. 455-460.
- Samson, R.A., Seifert, K.A., Kuijpers, A.F.A., Houbraken, J.A.M.P., Frisvad, J.C. (2004). Phylogenetic analysis of *Penicillium* subgenus *Penicillium* using partial β -tubulin sequences. *Studies in Mycology*, 49: 175-200.
- Samson, R.A., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J.C., Andersen, B. (2010). Food and indoor fungi. CBS KNAW Biodiversity Center, Utrecht.
- Samson, R.A., Yilmaz, N., Houbraken, J., Spierenburg, H., Seifert, K.A., Peterson, S.W., Varga, J., Frisvad, J.C. (2011). Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. *Studies in Mycology* 70: 159- 173.
- Sanderson, P.G., Spotts, R.A. (1995). Postharvest decay of winter pear and apple fruit caused by species of *Penicillium*. *Phytopathology*, 85:103-110.
- Sang, H., Choi, Y., Yu S. H. (2010). Phylogenetic analysis, morphology and pathogenicity of *Penicillium* spp. associated with blue mold of apple in Korea. *Journal of Agricultural Science*, 37:341-350.
- Santos, L., Phillips, A.J.L., Crous, P.W., Alves, A. (2017). *Diaporthe* species on Rosaceae with descriptions of *D. pyracanthae* sp. nov. and *D. malorum* sp. nov. *Mycosphere*, 8:485-511.
- Sanzani, S.M., Montemurro, C., Di Rienzo, V., Solfrizzo, M. and Ippolito, A. (2013). Genetic structure and natural variation associated with host of origin in *Penicillium expansum* strains causing blue mould. *International Journal of Food Microbiology*, 165:111-120.
- Scheideler, M., Schlaich, N.L., Fellenberg, K., Beissbarth, T., Hauser, N.C., Vingron, M., Slusarenko, A.J., Hoheisel, J.D. (2002). Monitoring the switch from housekeeping to pathogen defence metabolism in *Arabidopsis thaliana* using cDNA arrays. *Journal of Biological Chemistry*, 277:10555–10561.
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, et al. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 6241–6246.
- Schoch, C.L., Ciufo, S., Domrachev, M., Hotton, C.L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., Mcveigh, R., O'Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J.P., Sun, L., Turner, S., Karsch-Mizrachi, I. (2020). NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database (Oxford).

- Schovankova, J., Opatova, H. (2011). Changes in phenols composition and activity of phenylalanine-amonia lyase in apples. Horticultural Science (Prague), 38:1-10.
- Sholberg, P.L., Haag, P.D. (1996). Incidence of postharvest pathogens of stored apples in British Columbia. Canadian Journal of Plant Pathology, 18:81–85.
- Seifert, K.A., Samson, R.A., deWaard, J.R., Houbroken, J., Lévesque, C.A., Moncalvo, ., Louis-Seize, G., Hebert, P.D.N. (2007). Prospects for fungus identification using CO1 DNA barcodes, with *Penicillium* as a test case. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104:3901–3906.
- Serdani, M., Kang, C. J., Anderson, B., Craus, P. (2002). Characterization of *Alternaria* species groups associated with core rot of apples in South Africa. Mycological Research, 106:561-569.
- Seung-Yeol, L., Su-Jin, P., Jae-Jin, L., Chang-Gi, B., Leonid, N.T., In-Kyu, K., Hee-Young, J., (2017). First Report of Fruit Rot Caused by *Fusarium decemcellulare* in Apples in Korea. The Korean Journal of Mycology, 45:54-62.
- Sharma, Y.P., Sumbali, G. (1997). Unrecorded post-harvest fungal rot of quince fruits from India. National Academy Science Letters, 20:35–37.
<https://www.cabi.org/isc/abstract/19981004386>
- Singh, Y., Nair, A.M., Verma, P. (2021). Surviving the odds: From perception to survival of fungal phytopathogens under host-generated oxidative burst. Plant Communications, 2:100142.
- Skouboe, P., Frisvad, J. C., Taylor, J.W., et al. (1999). Phylogenetic analysis of nucleotide sequences from the ITS region of *terverticillate Penicillium* species. Mycological Research, 103:873–881.
- Slatnar, A., Mikulič Petkovšek, M., Halbwirth, H., Štampar, F., Stich, K., Veberič, R. (2012). Polyphenol metabolism of developing apple skin of a scab resistant and a susceptible apple cultivar. Trees, 26:109–119.
- Slippers, B., Crous, P.W., Denman, S., Coutinho, T.A., Wingfield, B.D., Wingfield, M.J. (2004). Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. Mycologia, 96:83-101.
- Slippers, B., Smit, W.A., Crous, P.W., Coutinho, T.A., Wingfield, B.D., Wingfield, M.J. (2007). Taxonomy, phylogeny and identification of Botryosphaeriaceae associated with pome and stone fruit trees in South Africa and other regions of the world. Plant Pathology, 56:128-139.
- Sl. Glasnik RS, br. 29/2014 i 37/2014 ispr. Pravilnik o maksimalno dozvoljenim količinama ostataka sredstava za zaštitu bilja u hrani i hrani za životinje i o hrani i hrani za životinje za koje se utvrđuju maksimalno dozvoljene količine ostataka sredstava za zaštitu bilja.
- Smirnoff, N. (2005). Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants. Blackwell, Oxford.
- Smith, E.E., Duffus, E.A., Small, M.H (1993). Effects of patulin on postimplantation rat embryos. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 25:267–270.

- Smit, W.A., Viljoen, C.D., Wingfield, B.D., Wingfield, M.J., Calitz, F.J. (1996). A New Canker Disease of Apple, Pear, and Plum Rootstocks-Caused by *Diaporthe ambigua* in South Africa. *Plant Disease*, 80:1331-1335.
- Snowdon, A.L. (1990). *Color Atlas of Post-Harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables. Vol 1: General Introduction and Fruits*. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Sonjak, S., Frisvad J.C., Gunde-Cimerman, N. (2005). Comparison of secondary metabolite production by *Penicillium crustosum* strains, isolated from Arctic and other various ecological niches. *FEMS Microbiology Ecology*, 53:51-60.
- Spadaro, D., Lorè, A., Amatulli, M. T., Garibaldi, A., Gullino, M. L. (2011). First Report of *Penicillium griseofulvum* Causing Blue Mold on Stored Apples in Italy (Piedmont). *Plant Disease*, 95(1):76.
- Spotts, R.A., Cervantes, L.A., Mielke, E.A. (1999). Variability in postharvest decay among apple cultivars. *Plant Dis.* 83, 1051–1054.
- Spotts, R.A., Seifert, K., Wallis, K.M., Sugar, D., Xiao, C.L., Serdani, M., and Henriques, J.L. (2009). Description of *Cryptosporiopsis kienholzii* and species profiles of *Neofabraea* in major pome fruit growing districts in the Pacific Northwest USA. *Mycological Research*, 113:1301-1311.
- Spotts, R. A. (2014a). Mucor rot. In *Compendium of Apple and Pear Diseases* (Sutton et al., ed.). APS Press, St. Paul, Minnesota, pp. 80-81.
- Spotts, R. A. (2014b). Coprinus rot. In *Compendium of Apple and Pear Diseases* (Sutton et al., ed.). APS Press, St. Paul, Minnesota, pp. 84-85.
- Stančević, A.S. (1986). Dunja, mušmula, oskoruša. Nolit, Beograd.
- Stevens, J. (1996), *Applied multivariate statistics for the social sciences*, Mahwah, NJ: Lawrence Erlbaum.
- Stojanović, D., Petronijević, M. (1968). *Fusarium lateritium* Ness kao parazit jabuke i šljive. *Zaštita bilja*, 98:25-28.
- Stojanović, S., Živković, S., Gavrilović, V. Starović, M., Aleksić, G., Pavlović, S. (1996). *Botryosphaeria obtusa* prouzrokovac truleži ploda u Srbiji. *Zaštita Bilja*, 54(1-4):19-31.
- Stošić, S., Ristić, D., Gašić, K., Starović, M., Ljaljević Grbić, M., Vukojević, J., Živković, S. (2020). *Talaromyces minioluteus* – new postharvest fungal pathogen in Serbia. *Plant disease*, 104(3): 656–667.
- Stošić, S., Ristić, D., Savković, Ž., Ljaljević Grbić, M., Vukojević, J., Živković, S. (2021). *Penicillium* and *Talaromyces* species as postharvest pathogens of pear fruit (*Pyrus communis* L.) in Serbia. *Plant Disease*, 108(11):3510–3521.
- Strausbaugh, K. (2018). Incidence, distribution, and pathogenicity of fungi causing root rot in Idaho long-term sugar beet storage piles. *Plant Disease*, 102: 2296–2307.
- Sugar, D. (2014). Cladosporium rot. In *Compendium of Apple and Pear Diseases*, (Sutton et al. eds.). APS Press, St. Paul, Minnesota, pp. 84.

- Sun, J., Janisiewicz, W.J., Nichols, B. Jurick II, W.M., Chen, P. (2017). Composition of phenolic compounds in wild apple with multiple resistance mechanisms against postharvest blue mold decay, *Postharvest Biology and Technology*, 127:68–75.
- Sutton, T.B., H.S. Aldwinckle, A.M. Agnello, and J.F. Walgenbach. (2014). *Compendium of apple and pear diseases and pests*, 2nd ed. APS Press, Saint Paul, MN.
- Šoškić, M. (2011). *Jabuka*. Partenon, Beograd.
- Tabachnick, B.G, Fidell, L.S. (2007). *Using multivariate statistic*, Boston: Pearson Education.
- Tausz, M., Wonisch, A., Grill, D., Morales, D., Jimenez, M.S. (2003). Measuring antioxidants in tree species in the natural environment: from sampling to data evaluation. *Journal of Experimental Botany*, 54:1505–1510.
- Tausz, M., Šircelj, H., Grill, D. (2004). The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid? . *Journal of Experimental Botany*, 55:1955–1962.
- Tauzin, A.S., Giardina, T. (2014). Sucrose and invertases, a part of the plant defense response to the biotic stresses. *Frontiers in Plant Sciences*, 5:293.
- Themen, D. (2014). Reduction of Food Losses and Waste in Europe and Central Asia, for Improved Food Security and Agrifood Chain Efficacy, Food and Agriculture Organization of the UN.
- Thielemans, A., Massart, D.L. (1985). The use of component analysis as a display method in the interpretation of analytical chemical, biological, environmental and epidemiological data, *Chimia*, 39:236-242.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D. G. (1997): The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24:4876-882.
- Torres, R. Valentines, M.C. Usall, J. Vinas, I. Larrigaudiere C. (2003). Possible involment of hydrogen peroxide in the development of resistance mechanisms in `Golden Delicious` apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 27:235–242.
- Torres, M.A., Jones, J.D.G., Dangl, J.L. (2006). Reactive oxygen species signaling in response to pathogen. *Plant Physiology*, 141:373–378.
- Tošić, B., Babović, M., Bulajić, A. (1994). *Monilinia fructigena* uzročnik truleži plodova jabuke u uslovima skladišta. U *Zaštita Bilja Danas i Sutra* (Šestović i sar. ed.). Društvo za zaštitu bilja Srbije, Beograd, pp. 105-113.
- Trkulja, V. (2003). Patogene, morfološke i odgajivačke odlike *Colletotrichum* prouzrokovaca gorke truleži ploda jabuke. Doktorska disertacija. Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd.
- Turechek, W. W. (2004). Apple Diseases and their Management. In *Diseases of Fruits and Vegetables* (Naqvi ed.). Springer Netherlands, pp. 87-89.

- Tuszynski, J. A., Carpenter, E. J., Huzil, J. T., Malinski, W., Luchko, T. and Ludueña, R. F. (2006). The evolution of the structure of tubulin and its potential consequences for the role and function of microtubules in cells and embryos. *The International Journal of Developmental Biology*, 50:341-358.
- Udayanga, D., Castlebury, L.A., Rossman, A.Y., Chukeatirote, E., Hyde, K.D. (2014a). Insights into the genus *Diaporthe*: phylogenetic species delimitation in the *D. eres* species complex. *Fungal Diversity*, 67:203-229.
- Udayanga, D., Castlebury, L.A., Rossman, A.Y., Hyde, K.D. (2014b). Species limits in *Diaporthe*: molecular re-assessment of *D. citri*, *D. cytospora*, *D. foeniculina* and *D. rudis*. *Persoonia*, 32:83-101.
- Urbanek Krajnc, A., Novak, M., Felicijan, M., Kraševac, N., Lešnik, M., Zupanec, N., Komel, R. (2014). Antioxidative response patterns of Norway spruce bark to low-density *Ceratocystis polonica* inoculation. *Trees (Berl.)*:1145–1160.
- van der Walt, L., Spotts, R.A., Visagie, C.M., Jacobs, K., Smit, F.J., McLeod, A. (2010). *Penicillium* species associated with preharvest wet core rot in South Africa and their pathogenicity on apple. *Plant Disease*, 94:666-675.
- van Leeuwen, G. C. M., Stein, A., Holb, I., Jeger, M. J. (2000). Yield loss in apple caused by *Monilinia fructigena* (Aderh. & Ruhl.) Honey, and spatio-temporal dynamics of disease development. *European Journal of Plant Pathology*, 106:519–28.
- van Leeuwen, G.C.M., Baayen, B.P., Holb, I.J., Jeger, M.J. (2002). Distinction of the Asiatic brown rot fungus *Monilia polystroma* sp. nov. from *M. fructigena*. *Mycological Research*, 106: 441-51.
- Vasić, M., Duduk, N., Ivanović, M. M., Obradović, A. and Ivanović, M. S. (2012). First report of brown rot caused by *Monilinia fructicola* on stored apple in Serbia. *Plant Disease*, 96: 456.
- Vasić, M, Duduk, N. and Ivanović M. (2013a): First report of brown rot caused by *Monilia polystroma* on apple in Serbia. *Plant Disease*, 97: 145.
- Vasić, M., Duduk, N., Vico, I., Ivanović, M. S. (2013b): First report of *Botryosphaeria dothidea* causing white rot of apple fruit in Serbia. *Plant Disease*, 97:1659.
- Vasić, M, Vico, I., Jurick, W.M., Duduk, N. (2018). Distribution and Characterization of *Monilinia* spp. Causing Apple Fruit Decay in Serbia. *Plant Disease*, 102:359-369.
- Vico, I. i Jurick, W. M. (2012). Postžetvena Patologija Biljaka i Biljnih proizvoda. Poljoprivredni fakultet Univerzitet u Beogradu, Beograd.
- Vico, I., Duduk, N., Vasić, M., Nikolić, M. (2014a). Identification of *Penicillium expansum* causing postharvest blue mold decay of apple fruit. *Pesticidi i Fitomedicina*, 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.

- Vico, I., Duduk, N., Vasić, M., Žebeljan, A., Radivojević, D. (2015). Bull's eye rot of apple fruit caused by *Neofabraea alba*. Book of Abstracts Third Balkan Symposium on Fruit Growing, Belgrade, Serbia, p. 171.
- Vico, I., Žebeljan, A., Vučković, N., Duduk, N. (2017). First report of *Diplodia seriata* causing postharvest rot of quince fruit in Serbia. *Plant Disease*, 101:1823.
- Vico I., Duduk, N. (2020). Postžetvena patologija. Univerzitet u Beogradu – Poljoprivredn fakultet. Beograd.
- Vilanova, L., Vinas, I., Torres, R., Usall, J., Buron-Moles, G., Teixido, N. (2014). Acidification of apple and orange hosts by *Penicillium digitatum* and *Penicillium expansum*. *International Journal of Food Microbiology*, 178:39-49.
- Vilanova, L., Vallllaura, N., Torres, R., Usall, J., Teixidó, N., Larrigaudière, C., et al. (2017). *Penicillium expansum* (compatible) and *Penicillium digitatum* (non-host) pathogen infection differentially alter ethylene biosynthesis in apple fruit. *Plant Physiology and Biochemistry*, 120:132–143.
- Vinas, I., Bonet, J., Sanchis, V. (1992). Incidence and mycotoxin production by *Alternaria tenuissima* in decayed apples. *Letters in Applied Microbiology*, 14:284-287.
- Visagie, C.M., Houburaken, J., Frisvad, J.C., Hong, S.-B., Klaassen, C.H.W., Perrone, G., Seifert, K.A., Varga, J., Yaguchi, T., Samson, R.A. (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Micology*, 78:343–371.
- Visagie, C.M., Houburaken, J., Dijksterhuis, J., Seifert, K.A., Jacobs, K., Samson R.A. (2016). A taxonomic review of *Penicillium* species producing conidiophores with solitary phialides, classified in section *Torulomyces*. *Persoonia* 36: 134–155.
- Visagie, C.M., Yilmaz, N., Vanderwolf, K., Renaud, J.B., Sumarah, M.W., Houburaken, J., Assebgui, R., Seifert, K.A., Malloch, D. (2020). *Penicillium* diversity in Canadian bat caves, including a new species, *P. speluncae*. *Fungal Systematics and Evolution*, 5: 1-15.
- Vu, D., Groenewald, M., de Vries, M., Gehrman, T., Stielow, B., Eberhardt, U., Al-Hatmi, A., Groenewald, J.Z., Cardinali, G., Houburaken, J., Boekhout, T., Crous, P.W., Robert, V., Verkley, G.J.M. (2019). Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation. *Studies in Mycology*, 92: 1–20.
- Vučković, V., Babović, M. (1997). *Monilinia laxa* - parazit plodova jabuke. Zbornik rezimea trećeg jugoslovenskog savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor, str. 99.
- Vučković, N., Vico, I., Duduk, B., Duduk, N. (2022). Diversity of Botryosphaeriaceae and *Diaporthe* species associated with apple fruit rot in Serbia. *Phytopathology*, 112(4):929-943.
- Vučković, N., Vico, I., Duduk, N. (2023). First report of *Botryosphaeria dothidea* causing postharvest rot of quince fruits in Serbia. *Journal of Plant Pathology*, 105:605.
- Wang, K., Zheng, X., Zhang, X., Zhao, L., Yang, Q., Boateng, N.A.S., Ahima, J., Liu, J., Zhang, H. (2019). Comparative transcriptomic analysis of the interaction between *Penicillium expansum* and apple fruit (*Malus pumila* Mill.) during early stages of infection, *Microorganisms*, 7:495.

- Weber, R.W.S. (2011). *Phacidiopicnis washingtonensis* - cause of a new storage rot of apples in Northern Europe. *Journal of Phytopathology*, 10:682-686.
- Weber, R.W.S. (2014). Biology and control of the apple canker fungus *Neonectria ditissima* (syn. *N. galligena*) from a Northwestern European perspective, *Erwerbs-Obstbau*, 56:95-107.
- Wenneker, M., Pham K.T.K., Lemmers, M.E.C., de Boer, F.A., van der Lans, A.M., van Leeuwen, P.J., Hollinger, T.C. (2015). First Report of *Colletotrichum godetiae* Causing Bitter Rot on 'Golden Delicious' Apples in the Netherlands. *Plant Disease*, 100(1):218.
- Wenneker, M., Pham K.T.K., Lemmers, M.E.C., de Boer, F.A., van der Lans, A.M., van Leeuwen, P.J., Hollinger, T.C., Thomma, B.P.H.J. (2016a). First report of *Fusarium avenaceum* causing wet core rot of 'Elstar' apples. *Plant Disease*, 100: 1501.
- Wenneker, M., Pham, K.T.K., Boekhoudt, L.C., de Boer, F.A., van Leeuwen, P.J., Hollinger, T.C., Thomma, B.P.H.J. (2016b). First Report of *Truncatella angustata* Causing Postharvest Rot on 'Topaz' Apples in the Netherlands. *Plant Disease*, 101:508.
- Wenneker, M., Pham, K.T.K., Lemmers, M.E.C., de Boer, F.A., van der Lans, A.M., van Leeuwen, P.J., Hollinger, Thomma, B.P.H.J. (2016c). First report of *Neonectria candida* causing postharvest decay on 'Conference' pears in the Netherlands. *Plant Disease* 100: 1787
- Wenneker, M., Pham, K.T.K., Lemmers, M.E.C., de Boer, F.A., van Leeuwen, P.J., Hollinger, T.C., Groenenboom-de Haas, B.H., Köhl, J. (2016d). First report of *Cadophora luteo-olivacea* causing side rot on 'Conference' pears in the Netherlands. *Plant Disease*, 100: 2162.
- Wenneker, M., Pham, K.T.K., Lemmers, M.E.C, de Boer, F.A., van Leeuwen, P.J., Hollinger, T.C., van de Gejin, F.G., Thomma, B.P.H.J. (2017). *Fibulorhizoctonia psychrophila* is the causal agent of lenticel spot on apple and pear fruit in the Netherlands. *European Journal of Plant Pathology*, 148: 213-217.
- Wenneker, M., Pham, K.T.K., Teeuw, L., Hartevelde, D.O.C. (2019). First Report of *Rosellinia quercina* Causing Postharvest Decay on 'Conference' Pears in the Netherlands. *Plant Disease*, 103(2):370.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., et al. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR protocols: a guide to methods and applications* (Innis et al. eds). Academic Press Inc, New York:315-322.
- Wilson, P.G. and Borisy, G.G. (1997). Evolution of the Multi-Tubulin Hypothesis. *BioEssays*, 19(6):451-454.
- Wiseman, M.S., Dugan, F.M., Kim, Y.K. and Xiao, C.L. (2015). A postharvest fruit rot of apple caused by *Lambertella corni-marisi* in Washington State. *Plant Disease*, 99: 201-206.
- Wiseman, M.S., Kim, Y.K., Dugan, F.M., Rogers, J.D., Xiao, C.L. (2016). A New Postharvest Fruit Rot in Apple and Pear Caused by *Phacidium lacerum*. *Plant Disease*, 100(1):32-39.
- Wormald, H. (1954). *The Brown Rot Diseases of Fruit Trees*. London: Her majesty's Stationery Office, UK.

- Xiao, C.L., Rogers J.D., Boal, R.J. (2004). First report of a new postharvest fruit rot on apple caused by *Sphaeropsis pyriputrescens*. Plant Disease, 88:223.
- Xiao, C.L., Rogers, J.D., Kim, Y.K., Liu, Q. (2005). *Phacidiopycnis washingtonensis*: a new species associated with pome fruits from Washington. Mycologia, 97:464-473.
- Xiao, C.L. (2006). Postharvest Fruit Rots in d'Anjou Pears Caused by *Botrytis cinerea*, *Potebniamyces pyri*, and *Sphaeropsis pyriputrescens*. Plant Health Progress, 7.
- Xiao, C.L. (2014). Grey mold. In Compendium of Apple and Pear Diseases (Sutton et al. eds.). APS Press, St. Paul, Minnesota, pp. 77-78.
- Xu, B.L., Wei, Z.Z., Wang, X.L. (2000). Symptoms and identification of black spot disease on apple fruit. Plant Protection, 26(5):6-8.
- Xu, X.M., Robinson, J. D., Berrie, A. M. and Harris, D. C. (2001): Spatio-temporal dynamics of brown rot (*Monilinia fructigena*) on apple and pear. Plant Pathology, 50:569 - 578.
- Xu, J., Yan, J., Li, W., Wang, Q., Wang, C., Guo, J., Geng, D., Guan, Q., Ma, F. (2020). Integrative Analyses of Widely Targeted Metabolic Profiling and Transcriptome Data Reveals Molecular Insight into Metabolomic Variations during Apple (*Malus domestica*) Fruit Development and Ripening. International Journal of Molecular Sciences, 21: 4797.
- Zhang, T., Huang, C., Deng, C., Zhang, Y., Feng, Y., Hu, J., Wang, R., Zhao, L., Wang, Y., Kai, G. (2020). First report of corm rot on saffron caused by *Penicillium solitum* in China. Plant Disease, 104(2): 579.
- Zhang, W., Groenewald, J.Z., Lombard, L., Schumacher, R.K., Phillips, A.J.L., Crous, P.W. (2021). Evaluating species in Botryosphaeriales. Persoonia, 46:63-115.
- Zhou, Y.P., Zhang, M., Dou, Z.P., Zhang, Y. (2017). *Botryosphaeria rosaceae* sp. nov. and *B. ramosa*, new botryosphaeriaceous taxa from China. Mycosphere, 8:162-171.
- Zhu, X-Q., Niu, C-W., Chen, X-Y., Guo, L-Y. (2016). *Monilinia* Species Associated with Brown Rot of Cultivated Apple and Pear Fruit in China. Plant Disease, 100(11):2240–2250.
- 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.
- Žebeljan, A., Vico, I., Duduk, N., Žiberna, B., Urbanek Krajnc, A. (2019). Profiling changes in primary metabolites and antioxidants during apple fruit decay caused by *Penicillium crustosum*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 113:101586.
- Žebeljan, A., Duduk, N., Vučković, N., Jurick II, W.M., Vico, I. (2021). Incidence, Speciation, and Morpho-Genetic Diversity of *Penicillium* spp. Causing Blue Mold of Stored Pome Fruits in Serbia. Journal of Fungi, 7(12): 1019.
- Živković, S., Dolovac, N., Popović, T., Stojanović, S. (2012). Patogenost izolata *Colletotrichum* spp. - prouzrokovaca antraknoze. Zaštita bilja, 63(1):7-21.

Živković, S., Gavrilović, V., Popović, T., Dolovac, N., Trkulja, N. (2014). First Report of *Colletotrichum clavatum* Causing Quince Anthracnose in Serbia. Plant Disease, 98(9):1272.

BIOGRAFIJA

Aleksandra Žebeljan, rođena 30.6. 1989. godine u Beogradu, Republika Srbija. U periodu od 2004 do 2008 pohađala je Zemunsku gimnaziju. Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu, Odsek za Fitomedicina upisala je školske 2009/2010, a dana 16.10.2013. godine odbranila diplomski rad pod nazivom: „*Fusarium proliferatum* – patogen paradajza sa ocenom 10, čime je završila osnovne akademske studije u predviđenom roku, sa prosečnom ocenom 8,88 (8 i 88/100) i time stekla zvanje diplomiranog inženjera poljoprivrede. Master studije na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Fitomedicina upisala je školske 2013/14 godine, a dana 15.10.2014. godine odbranila je master rad pod nazivom: „Molekularna karakterizacija *Alternaria sp.* poreklom sa mrkve“ sa ocenom 10, čime je završila master akademske studije, sa prosečnom ocenom 10 i time stekla zvanje master inženjera poljoprivrede. Zbog velike zainteresovanosti za naučno – istraživački rad iz oblasti Fitopatologije – fitopatogene gljive, upisala je doktorske studije, školske 2014/2015 godine, na studijskom programu Poljoprivredne nauke, modul: Fitomedicina. Nakon upisa na doktorske studije, svoj istraživački rad je obavljala na Poljoprivrednom fakultetu, laboratoriji za postžetvenu fitopatologiju, Katedri za fitopatologiju, a maja 2015. godine postala je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, kada je i angažovana na projektu III46008: „Razvoj integrisanih sistema upravljanja štetnim organizmima u biljnoj proizvodnji sa ciljem prevazilaženja rezistentnosti i unapređenja kvaliteta i bezbednosti hrane “Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Ispite na doktorskim studijama položila je sa prosečnom ocenom 9,50 (devet i 50/100) .

Deo istraživanja u okviru doktorske disertacije je obavljala na Poljoprivrednom fakultetu, Univerzitetu u Mariboru, na odseku za botaniku i fiziologiju biljaka u periodu od 29.09. 2016. do 31.03. 2017. godine.

U toku dosadašnjeg bavljenja istraživačkim radom, Aleksandra Žebeljan je objavila ili saopštila ukupno 16 naučnih radova. Govori engleski i slovenački jezik. Član je društva za zaštitu bilja. Trenutno radi u kompaniji za proizvodnju đubriva Fertico d.o.o na razvijanju mikrobioloških đubriva, postavljanju i praćenju ogleda.

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora Aleksandra Žebeljan

Broj indeksa FM140013

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

ETIOLOGIJA PLAVE TRULEŽI JABUČASTOG VOĆA U SRBIJI I
FIZIOLOŠKE PROMENE U ZARAŽENIM PLODOVIMA JABUKE

- Rezultat sopstvenog istraživačkog rada
- Da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- Da su rezultati korektno navedeni i
- Da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu, _____

Potpis autora

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Aleksandra Žebeljan

Broj indeksa FM140013

Studijski program Fitomedicina

Naslov rada ETIOLOGIJA PLAVE TRULEŽI JABUČASTOG VOĆA U SRBIJI I FIZIOLOŠKE PROMENE U ZARAŽENIM PLODOVIMA JABUKE

Mentor dr Ivana Vico, redovni profesor

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la radi pohranjenja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu, _____

Potpis autora

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

ETIOLOGIJA PLAVE TRULEŽI JABUČASTOG VOĆA U SRBIJI I FIZIOLOŠKE PROMENE U ZARAŽENIM PLODOVIMA JABUKE

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu o dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci.

Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

U Beogradu, _____

Potpis autora
