

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На VII редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 13.05.2024. године, прихваћен је извештај ментора, др Светлане Живковић и др Милице Љаљевић Грбић, да је урађена докторска дисертација кандидата Стефана С. Стошића, вишег стручног сарадника у Одсеку за болести биља, Института за заштиту биља и животну средину у Београду, под насловом „Идентификација и карактеризација врста родова *Penicillium* и *Talaromyces* са ускладиштених плодова воћа и поврћа у Србији“ и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: др Милош Ступар, виши научни сарадник, Универзитет у Београду-Биолошки факултет, др Данијела Ристић, виши научни сарадник, Институт за заштиту биља и животну средину, и др Жељко Савковић, научни сарадник, Универзитет у Београду-Биолошки факултет.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и Већу подноси следећи:

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација **Стефана С. Стошића**, под насловом „**Идентификација и карактеризација врста родова *Penicillium* и *Talaromyces* са ускладиштених плодова воћа и поврћа у Србији**“, је написана на укупно 163 страна компјутерски обрађеног текста. Пагинирани текст (149 страна) садржи Биографију (1 страна) и 8 поглавља докторске дисертације (148 страна): Увод (16 страна), Циљеви рада (1 страна), Материјал и методе (12 страна), Резултати (69 страна), Дискусија (14 страна), Закључци (1 страна), Литература (34 стране), Прилог (1 страна). Дисертација садржи 11 табела (4 у поглављу Материјал и методе, 6 у поглављу Резултати, 1 у поглављу Прилог) и 79 слика (1 у поглављу Увод, 78 у поглављу Резултати). Поглавље Литература садржи 489 библиографских јединица које се адекватно наводе у тексту. Непагинирани текст (14 страна) обухвата насловне стране и сажетке на српском и енглеском језику, листу ментора и чланова комисије, захвалницу, листу коришћених скраћеница и симбола, садржај и прилоге (изјава о ауторству, изјава о истовестности штампане и електронске верзије докторског рада и изјава о коришћењу).

Анализа докторске дисертације:

У овој докторској дисертацији кандидат Стефан С. Стошић проучавао је етиологију симптома плавих и зелених трулежи на ускладиштеном воћу и поврћу у Србији, као и морфолошке, физиолошке и генетичке особине проузроковача поменутих биљних болести, гљива из родова *Penicillium* и *Talaromyces*, у периоду 2015-2020. године. Испитивана је патогеност добијених изолата гљива наведених родова на изворним домаћинима, као и анализиран специјски диверзитет гљива са 14 прикупљених биљних домаћина.

Поглавље **УВОД** обликовано је кроз шест тематских целина које описују главни фокус докторске дисертације и њену значајност. У првом потпоглављу представљен је осврт на болести биљака у складиштима, начин њиховог настанка и ширења, метаболичким процесима који се одвијају у биљним органима који се чувају у складиштима, обим економских штета које складишне биљне болести чине, и наведени су истакнути најзначајнији представници складишних фитопатогених бактерија и гљива. Друго потпоглавље описује важност гљива из родова *Penicillium* и *Talaromyces*, кроз њихов позитиван и негативан утицај у природи и на људско друштво: њихова улога у екосистемима, коришћење врста наведених родова у индустрији хране и пића, фармацеутској индустрији, примену и биотехнолошким истраживањима и процесима, процесима биоремедијације земљишта. Треће потпоглавље има две целине, од којих се прва фокусира на врсте истраживаних родова као патогена биљака, њихове биолошке особине који их чине изузетним у односима конкуренције и колонизације биљних домаћина и других супстрата, епидемиолошке аспекте (процес настанка болести, формирања и расејавања инокулама, изглед типичних симптома, најчешће патогене и њихове биљне домаћине). Друга целина овог потпоглавља се бави патофизиолошким променама које се дешавају на хистолошком, биохемијском и молекуларном нивоу приликом процеса инфекције и каснијег развоја плавих и зелених трулежи на плодовима воћа и поврћа. У четвртном поглављу обрађен је негативни утицај врста *Penicillium* и *Talaromyces* на здравље људи и животиња, од којих су најважнији микотоксикозе (изазване продукованим микотоксинима и конзумацијом контаминираних производа), и хумане и анималне микозе. Пето потпоглавље детаљно описује историју таксономских истраживања, систематике рода и промена које су се одвијале у систематици рода *Penicillium*. Шеста целина увода се бави сличном тематиком као претходна, само са фокусом на други истраживани род, *Talaromyces*.

У поглављу **ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА** истиче се недостатак систематских истраживања гљива из родова *Penicillium* и *Talaromyces* као складишних патогена на различитим биљним домаћинима у Србији и важност ове дисертације која ће то извести користећи савремени, полифазни приступ, са посебним фокусом на имплементацију молекуларних метода у дијагностици болести плавих и зелених трулежи. Велике економске штете које изазивају ове врсте гљива и способност продукције микотоксина представљају озбиљан аспект безбедности хране и због тога су неопходне практичне, брзе и прецизне методе идентификације. Стога је постављено пет циљева истраживања, који укључују изолацију, идентификацију и карактеризацију проузроковача симптома плавих и зелених трулежи са већег броја биљних домаћина у Србији, проверу њихове вирулентности на изворним домаћинима и утврђивање специјског диверзитета гљива *Penicillium* и *Talaromyces* на прикупљеним биљним домаћинима. На тај начин би се пружили нови подаци о биологији и екологији поменутих врста гљива, нови подаци о кругу потенцијалних домаћина и пружио допринос фундаменталним миколошким истраживањима у нашој земљи. Такође би се поставила основа за примењена истраживања у области пољопривреде, јер ови резултати представљају базу за будућу имплементацију адекватних мера контроле болести и заштите испитиваних пољопривредних производа у складишним условима.

Поглавље **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** чини седам потпоглавља. Прво потпоглавље описује начин сакупљања узорака биљака са симптомима плавих и зелених трулежи, процес изолације гљива коришћењем стандардних фитопатолошких метода, начин добијања моноспоричних изолата гљива *Penicillium* и *Talaromyces* и формирања колекције, услови чувања и критеријум одабира изолата за даљи рад. У другом потпоглављу детаљно су представљене методе морфолошке идентификације и

карактеризације одабраних изолата - начин засејавања суспензије спора на три семидиференцијалне подлоге: Чапекова аутолизатна подлога са екстрактом квасца (*eng. Czapek Yeast Autolysate agar*, CYA), подлога са сладним екстрактом/малт агар (*eng. Malt Extract Agar*, MEA) и подлога са креатином и сахарозом (*eng. Creatine sucrose agar*, CREA), услови и дужина инкубације, начин оцене пораста култура и испољених фенотипских одлика (изглед и боја мицелије са лица и наличја, текстура колонија, спорулација, присуство и боја ексудата, евентуална промена боје подлоге). У трећем потпоглављу објашњени су начин припреме микроскопских препарата ради проучавања микроморфолошких одлика (гранање конидиофора, облик и орнаментација ћелијског зида фијалида и конидија), начин добијања микрографија, као и технике и софтверски програми коришћени за мерење величине спора изолата. У четвртном поглављу кандидат је представио методе за испитивање утицаја три различите температуре инкубације (5, 25 и 37°C) на пораст и изглед изолата гљива. Пето потпоглавље чини некоколико целина, које до детаља описују методе молекуларне идентификације и карактеризације добијених изолата. Опширно су представљени протоколи за екстракцију ДНК изолата гљива и умножавање четири генска региона [интерни транскрибовани регион (ITS), бета тубулин (*BenA*), калмодулин (*CaM*) и ДНК-зависна друга највећа субјединица РНК полимеразе II (*RPB2*)] у ланчаној реакцији полимеразе (PCR), сепарација добијених PCR продуката у хоризонталној електрофорези, њихово услужно пречишћавање и секвенцирање (Macrogen Europe, Холандија), BLAST анализе (Basic Local Alignment Search Tool) добијених секвенци у циљу идентификације и њихово депоновање у доступној бази података генских секвенци (NCBI GenBank). Реконструкцијом филогенетских стабала представљене су филогенетске анализе, односно проучавање еволутивне повезаности секвенци изолата добијених током ових истраживања са секвенцама изолата доступним у базама података. У шестом потпоглављу описане су методе коришћене за проверу вирулентности добијених изолата *Penicillium* и *Talaromyces* на изворним домаћинима, од начина припреме суспензије спора преко техника инокулације и инкубације инокулисаних биљних домаћина, до оцене теста патогености и финалне провере испуњености Кохових постулата. На крају, у седмом потпоглављу описане су методе статистичке анализе мерених података у огледима у програму IBM SPSS Statistics (верзија 24).

Поглавље **РЕЗУЛТАТИ** је обликовано у шест целина где је кандидат детаљно и систематично представио резултате овог истраживања. Прво потпоглавље описује број сакупљених узорака воћа и поврћа, забележене симптоме плавих и зелених трулежи, укупан број различитих биљних домаћина на којима су симптоми уочени, и број добијених изолата према биљкама домаћинима (1 табела и 1 слика). Друго потпоглавље садржи две целине - у првом делу описане су основне морфолошке одлике добијених изолата гљива на три тестиране подлоге (CYA, MEA, CREA) и прелиминарна идентификација на основу њих на две веће групе (родови *Penicillium* и *Talaromyces*), и у оквиру њих укупно 11 морфолошких подгрупа (9 подгрупа идентификованих до нивоа врсте и 2 подгрупе идентификованих до нивоа рода). Осим у тексту, ово је документовано и кроз 11 слика који се односе на макроморфолошке одлике и 9 слика које се односе на микроморфолошке особине добијених изолата. Друга целина овог потпоглавља кроз текст и 7 слика у виду графикона детаљно представља вредности пораста изолата гљива на три поменуте подлоге, као и адекватне статистички анализе (nested ANOVA, ANOVA и Студентов т-тест) урађене како би се утврдило постоји ли статистичка значајност у просечним вредностима раста гљива на испитиваним медијумима, на интерспецијском и интраспецијском нивоу. У трећем потпоглављу,

кандидат је описао резултате тестова раста изолата на 3 различите температуре инкубације, статистичке анализе које су поредиле просечне вредности пораста (5 слика) изолата различитих врста, као и анализе поређења вредности раста изолата унутар исте врсте. Четврто потпоглавље приказује податке добијене приликом молекуларне идентификације добијених изолата користећи 2, односно 4 генска локуса (4 табеле), као и резултате изведених филогенетских анализа (8 слика филогенетских стабала). На крају овог потпоглавља, након обједињавања података из конвенционалних и молекуларних тестова идентификације, представљен је и специјски диверзитет изолованих *Penicillium* и *Talaromyces* spp. у односу на сакупљене биљне домаћине (1 табела). У последњем, шестом потпоглављу, кандидат је представио резултате тестова провере патогености изолованих врста гљива *Penicillium* и *Talaromyces*. Резултати у овом делу су организовани у девет целина, и поред текстуалног дела прати их 29 слика који илуструју симптоме уочених некроза које су изоловане врсте изазвале након вештачке инокулације здравих плодова, луковица и корена воћа и поврћа, као 8 слика које у виду графикана приказују просечне вредности измерених некроза и евентуално доказане статистичке значајне разлике у вирулентности различитих врста на истом биљном домаћину.

У поглављу **ДИСКУСИЈА**, кандидат је пружио свеобухватно и критичко тумачење добијених резултата дисертације у односу на корпус коришћене литературе. У првом потпоглављу дискутовано је о симптомима, диверзитету и дистрибуцији врста *Penicillium* и *Talaromyces* добијених у овој студији и у ранијим истраживањима. Друго потпоглавље фокусирао се на коментарисање резултата уочене морфолошке варијабилности изолата два поменута рода и разматрање чиниоца који доприносе том феномену. У трећем потпоглављу, кандидат је дискутовао забележене разлике у фенотипским одликама изолата *Penicillium* и *Talaromyces* spp. на тестираним температурама инкубације, како на интерспецијском, тако и на интраспецијском нивоу. Четврто поглавље бавило се дискутовањем резултата идентификације и карактеризације на молекуларном и филогенетском нивоу, са посебним освртом на информативне и мање информативне генске локусе. У петом потпоглављу дискутовано је о доказаној вирулентности изолованих врста два рода, проблемима као што су унакрсна контаминација, унакрсна инфекција и патогеност ових врста гљива на различитим биљним домаћинима у складишним условима, као и појави преференције одређених врста *Penicillium* и *Talaromyces* ка одређеним биљним домаћинима. Дат је осврт на биолошке особине ових врста гљива који их чине јаким конкурентима у биотичким и абиотичким интеракцијама на различитим биљним домаћинима, али и другим стаништима и екосистемима. Такође, истакнута је важност првих налаза ове студије у односу на географски простор (свет, Европа, Србија), као и посебна вредност резултата овог истраживања који представљају заокруживање Кохових постулата на изворним домаћинима, што је квалитативни недостатак бројних студија других аутора које су се раније бавиле фитопатогеним врстама ова два рода.

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ** кандидат је извео закључке на основу података добијених у поглављу Резултати, поређењу тих података са ранијим литературним изворима у поглављу Дискусија, а у складу са постављеним циљевима дисертације. Кандидат истиче како су симптоми плавих и зелених трулежи забележени на 14 различитих биљних домаћина сакупљених у Србији (јабука, крушка, дуња, нектарина, парадајз, поморанца, лимун, мандарина, грејпфрут, киви, црни лук, бели лук, кромпир, шаргарепа). Коришћењем савременог приступа идентификације са тих домаћина изоловано је 9 врста гљива, од којих 7 припадају роду *Penicillium* (*P. allii*, *P. crustosum*,

P. digitatum, *P. expansum*, *P. italicum*, *P. olsonii* и *P. polonicum*), а две роду *Talaromyces* (*T. minioluteus* и *T. rugulosus*). У огледима који су укључивали испитивање макроморфолошких, микроморфолошких и физиолошких одлика изолата наведених врста, уочена је варирање тих карактеристика на интерспецијском и интраспецијском нивоу, што одсликава фенотипску пластичност изолованих врста. Кандидат наводи како се од свих испитиваних генских маркера у овој студији, ген за бета тубулин показао као прецизнији маркер за генетичку дискриминацију врста ова два рода. Закључено је и да су од свих изолованих врста, врсте *P. expansum* и *T. minioluteus* изоловане са највећег броја различитих биљака домаћина (11, односно 6 различитих домаћина). Истакнуто је да су у тестовима провере патогености изолованих врста све врсте потврђене као патогени на изворним домаћинима, осим изолата *T. minioluteus* на кртолама кромпира. Као најзначајније нове светске налазе ове дисертације у области складишне фитопатологије, кандидат је навео детекцију и потврду патогености врста *T. minioluteus* на плодовима крушке, дуње, парадајза, поморанце и луковицама црног лука и *T. rugulosus* на плодовима крушке. Као врло значајан налаз истакнута је и изолација и потврда *P. olsonii* као патогена плода парадајза јер је у питању прва потврда ове врсте гљиве у Србији и прва за подручје Европе. Поред ових налаза, кандидат је навео да, на основу увида у релевантну и доступну литературу, прве детекције и потврде патогености изолованих врста на територији наше земље обухватају и: *P. expansum* на плодовима нектарине, мандарине, грејпфрута, кивија, лимуна, парадајза, поморанце, крушке и корену шаргарепе; *P. allii* на луковицама белог и црног лука; *P. polonicum* на луковицама белог лука и плодовима лимуна и парадајза; *P. italicum* на луковицама белог лука и плодовима крушке; *T. rugulosus* и *P. digitatum* на плодовима лимуна.

Поглавље **ЛИТЕРАТУРА** садржи 489 библиографских јединица из међународних и домаћих извора. Коришћена литература је разноврсна и укључује оригиналне научне чланке, прегледне радове, књиге, приручнике, докторске дисертације и мастер тезе других аутора, као и зборнике радова са међународних скупова чија је примарна тематика била усмерена на два истраживана рода. Сви литературни извори су адекватно одабрани, правилно и на одговарајућим местима цитирани у докторској дисертацији.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Радови у часописима међународног значаја

<p>1. Stošić, S., Ristić, D., Gašić, K., Starović, M., Ljaljević Grbić, M., Vukojević, J., Živković, S. (2020): <i>Talaromyces minioluteus</i>: new postharvest fungal pathogen in Serbia. <i>Plant Disease</i> 104(3): 656-667. Линк: https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-08-19-1806-RE DOI: https://doi.org/10.1094/PDIS-08-19-1806-RE</p>	M21
<p>2. Stošić, S., Ristić, D., Savković, Ž., Ljaljević Grbić, M., Vukojević, J., Živković, S. (2021): <i>Penicillium</i> and <i>Talaromyces</i> species as postharvest pathogens of pear fruit (<i>Pyrus communis</i> L.) in Serbia. <i>Plant Disease</i> 105(11):3510-3521. Линк: https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-01-21-0037-RE DOI: https://doi.org/10.1094/PDIS-01-21-0037-RE</p>	M21

Други радови и конгресна саопштења из докторске дисертације (хронолошки)

<p>3. Živković, S., Ristić, D., Stošić, S., (2021): First Report of <i>Penicillium olsonii</i> Causing Postharvest Fruit Rot on Tomato in Serbia. Plant Disease 105(8): 2246-2246.</p> <p>Линк: https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-02-21-0323-PDN</p> <p>DOI: https://doi.org/10.1094/PDIS-02-21-0323-PDN</p>	<p>News Item y M21</p>
<p>4. Stošić, S., Ristić, D., Živković, S. (2021): Postharvest decay of mandarin fruit in Serbia caused by <i>Penicillium expansum</i>. Matica srpska Journal for Natural Sciences, 140: 29-44.</p> <p>Линк: https://doiserbia.nb.rs/Article.aspx?id=0352-49062140029S</p> <p>DOI: https://doi.org/10.2298/ZMSPN2140029S</p>	<p>M24</p>
<p>5. Živković, S., Ristić, D., Starović, M., Aleksić, G., Kovačević, S., Trkulja N., Stošić, S. (2022): Vrste rodova <i>Penicillium</i> i <i>Talaromyces</i> – prouzrokovачи truleži plodova paradajza. Zbornik rezimea radova, XVII Savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor, Srbija, 28/11/-01/12/2022., str. 47-48.</p>	<p>M64</p>
<p>6. Živković, S., Ristić, D., Starović, M., Aleksić, G., Stošić, S. (2022): <i>Penicillium expansum</i> as a postharvest pathogen of tomato fruit in Serbia. Book of Proceedings of the XIII International Scientific Agricultural Symposium "Agrosym 2022", Jahorina, Bosnia and Herzegovina, 6-9/10/2022, str. 545-551.</p>	<p>M33</p>
<p>7. Stošić, S., Deliћ, D., Živković, S. (2022): Polyphasic identification of decay agents of lemon fruits in Serbia. Matica srpska Journal for Natural Sciences, 143:73-87.</p> <p>Линк: https://doiserbia.nb.rs/Article.aspx?id=0352-49062243073S</p> <p>DOI: https://doi.org/10.2298/ZMSPN2243073S</p>	<p>M51</p>
<p>8. Stošić, S., Živković, S. (2023): <i>Talaromyces</i> spp. - the postharvest fruit pathogens in Serbia. XIX Congress of European Mycologists, Perugia, Italy, 4-8/09/2023, Book of Abstracts, str. 71.</p>	<p>M34</p>

Мишљење и предлог Комисије:

На основу изложеног, Комисија сматра да докторска дисертација кандидата Стефана С. Стошића, под насловом „Идентификација и карактеризација врста родова *Penicillium* и *Talaromyces* са ускладиштених плодова воћа и поврћа у Србији“, представља оригинално научно истраживање већег обима, урађено по свим критеријумима научно-истраживачког рада и водећи се принципима добре истраживачке праксе. Дисертација представља опсежну, свеобухватну и систематичну студију патогена, проузроковача плавих и зелених трулежи ускладиштеног воћа и

поврћа, који су веома значајан негативни фактор у финалним фазама пољопривредне производње, кроз утицај на драстично смањење приноса и квалитета производа. Ова докторска дисертација је дала допринос у познавању патогених врста рода *Penicillium* и *Talaromyces*, њихове биологије и екологије, услова за појаву и развој болести, преношења и начина одржавања инфективних пропагула у природи, изгледу симптома на биљним домаћинима и диверзитету врста у Србији. Молекуларне анализе су допринеле брзој, тачној и комплетној идентификацији изолата до нивоа врсте, као и уочавању интер- и интраспецијске генетичке варијабилности и филогенетских односа проучаваних врста. Мноштво нових, првих налаза ових врста гљива као патогена воћа и поврћа, како у свету, тако и на територији Србије, указује на претходну неистраженост ове проблематике и неопходност извођења ове научне студије. Текст дисертације је послат на софтверску проверу оригиналности 24.04.2024. и резултати показују да индекс подударности износи 8%, а сва уочена појединачна подударњања су у опсегу мањем од 1% и углавном се односе на стандардно присутне делове докторских дисертација.

Имајући у виду све наведено, Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију кандидата дисертација кандидата Стефана С. Стошића, под насловом „Идентификација и карактеризација врста родова *Penicillium* и *Talaromyces* са ускладиштених плодова воћа и поврћа у Србији“, и са задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати Извештај и одобри јавну одбрану ове докторске дисертације.

У Београду, 14.05.2024.

КОМИСИЈА:

Др Милош Ступар, виши научни сарадник
Универзитет у Београду, Биолошки факултет

Др Данијела Ристић, виши научни сарадник
Институт за заштиту биља и животну средину, Београд

Др Жељко Савковић, научни сарадник
Универзитет у Београду, Биолошки факултет