



**УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ  
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ**



**Департман за фитомедицину и  
заштиту животне средине**

**Марија Чоти**

дипл. инж. пољопривреде

**ОСЕТЉИВОСТ ПРОУЗРОКОВАЧА  
ПЛАВЕ ТРУЛЕЖИ ПЛОДОВА ЈАБУКЕ (*PENICILLIUM  
EXPANSUM*) ПРЕМА ТРИФЛОКСИСТРОБИНУ  
МАСТЕР РАД**

**Нови Сад, 2026.**



**УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ  
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ**



**Департман за фитомедицину и  
заштиту животне средине**

Кандидат:  
Марија Чоти

Ментор:  
проф. др Драгана Будаков

**ОСЕТЉИВОСТ ПРОУЗРОКОВАЧА  
ПЛАВЕ ТРУЛЕЖИ ПЛОДОВА ЈАБУКЕ (*PENICILLIUM  
EXPANSUM*) ПРЕМА ТРИФЛОКСИСТРОБИНУ  
МАСТЕР РАД**

**Нови Сад, 2026.**

## САДРЖАЈ

|                                                                                       |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. УВОД.....</b>                                                                   | <b>1</b>  |
| <b>2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ .....</b>                                                    | <b>4</b>  |
| <b>2.1. УЗГОЈ ЈАБУКЕ У СРБИЈИ И СВЕТУ .....</b>                                       | <b>4</b>  |
| <b>2.2. СКЛАДИШТЕЊЕ ЈАБУКЕ.....</b>                                                   | <b>6</b>  |
| 2.2.1. Губици приликом складиштења јабуке .....                                       | 9         |
| <b>2.3. ПЛАВА ТРУЛЕЖ ПЛОДОВА ЈАБУКЕ .....</b>                                         | <b>12</b> |
| 2.3.1. <i>Penicillium</i> spp.....                                                    | 12        |
| 2.3.2. <i>Penicillium expansum</i> .....                                              | 13        |
| 2.3.3. Микотоксини.....                                                               | 14        |
| 2.3.4. Патулин .....                                                                  | 14        |
| 2.3.5. Симптоми плаве трулежи .....                                                   | 16        |
| <b>2.4. МЕРЕ ЗАШТИТЕ .....</b>                                                        | <b>17</b> |
| 2.4.1. Трифлуксистробин .....                                                         | 20        |
| <b>2.5. РЕЗИСТЕНТНОСТ .....</b>                                                       | <b>21</b> |
| 2.5.1. ”Ризик повезан са фунгицидом” .....                                            | 23        |
| 2.5.2. ”Ризик повезан са патогеном” .....                                             | 26        |
| 2.5.3. Ризик повезан са условима употребе .....                                       | 29        |
| 2.5.4. Мониторинг резистентности.....                                                 | 31        |
| <b>3. ЗАДАТАК И ЦИЉ РАДА.....</b>                                                     | <b>33</b> |
| <b>4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА .....</b>                                                | <b>34</b> |
| 4.1. Прикупљање плодова са симптомима плаве трулежи.....                              | 34        |
| 4.2. Изолација патогена и формирање колекције изолата .....                           | 34        |
| 4.3. Утврђивање морфолошких карактеристика изолата.....                               | 35        |
| 4.4. <i>In vitro</i> тестирање осетљивости колекције изолата <i>P. expansum</i> ..... | 36        |
| <b>5. РЕЗУЛТАТИ .....</b>                                                             | <b>39</b> |
| 5.1. Прикупљање и идентификација изолата <i>P. expansum</i> .....                     | 39        |
| 5.2. Утврђивање морфолошких карактеристика изолата.....                               | 39        |
| 5.2.1. Утврђивање пречника колоније .....                                             | 41        |
| 5.3. <i>In vitro</i> тестирање осетљивости колекције изолата <i>P. expansum</i> ..... | 43        |
| <b>6. ДИСКУСИЈА .....</b>                                                             | <b>45</b> |
| <b>7. ЗАКЉУЧАК.....</b>                                                               | <b>48</b> |
| <b>8. ЛИТЕРАТУРА .....</b>                                                            | <b>49</b> |



## ОСЕТЉИВОСТ ПРОУЗРОКОВАЧА ПЛАВЕ ТРУЛЕЖИ ПЛОДОВА ЈАБУКЕ (*PENICILLIUM EXPANSUM*) ПРЕМА ТРИФЛОКСИСТРОБИНУ

### РЕЗИМЕ

Плава трулеж широм света представља једно од најзначајнијих обољења плода јабуке у периоду након бербе. Међу више врста рода *Penicillium* које нападају плодове јабуке, посебно је важна врста *Penicillium expansum*. Врсте из овог рода могу да нанесу огромне штете у пољопривредној производњи проузрокујући појаву трулежи током производње и складиштења плодова. Поред тога, *Penicillium expansum* производи канцерогене микотоксине који представљају ризик по људско здравље. Препарати на бази активне супстанце трифлуксистробин су једни од најчешће коришћених фунгицида за сузбијање плаве трулежи на плодовима јабуке у Р. Србији. Трифлуксистробин је активна супстанца из групе стробилурина, односно припада QoI групи фунгицида. Према FRAC класификацији, ризик од појаве резистентности код стробилурина, оцењен је као умерен, односно висок. С обзиром да су у свету потврђени случајеви резистентних популација *P. expansum*, као и да је уочена смањена ефикасност свих активних супстанци из групе стробилурина, укључујући и трифлуксистробин, у овом раду смо испитали осетљивост 36 изолата *P. expansum* са 11 локалитета у Р. Србији. Осетљивост изолата *P. expansum* је оцењивана на основу мерења пораста мицелије при излагању концентрацији од 0,1 µg/ml трифлуксистробина у хранљивој подлози. Резултати овог рада који говоре да ни за један изолат није постигнута инхибиција раста колонија од 100% или 80%, указују на постојање популација *P. expansum* са смањеним нивоом осетљивости према активној супстанци трифлуксистробин у Р. Србији.

**Кључне речи:** јабука, *Penicillium expansum*, плава трулеж, резистентност, трифлуксистробин

## SENSITIVITY OF CAUSING AGENT OF BLUE MOLD ON APPLE FRUITS (*PENICILLIUM EXPANSUM*) TO TRIFLOXYSTROBIN

### SUMMARY

Blue mold is one of the most significant postharvest diseases of apple fruit worldwide. Among the various species of the genus *Penicillium* that attack apples, *Penicillium expansum* is of particular importance. Species within this genus can cause extensive damage to agricultural production by inducing rot during the cultivation and storage of fruit. Furthermore, *Penicillium expansum* produces carcinogenic mycotoxins, which pose a risk to human health. Products based on the active substance trifloxystrobin are among the most frequently used fungicides for the control of blue mold on apple fruit in the Republic of Serbia. Trifloxystrobin is an active substance belonging to the strobilurin group specifically, the QoI group of fungicides. According to the FRAC classification, the risk of resistance development to strobilurins is assessed as moderate to high. Given that resistant populations of *P. expansum* have been confirmed globally, and that reduced efficacy has been observed for all active substances within the strobilurin group, including trifloxystrobin—this study examined the sensitivity of 36 *P. expansum* isolates collected from 11 locations in the Republic of Serbia. The sensitivity of the *P. expansum* isolates was evaluated by measuring mycelial growth when exposed to a concentration of 0.1 µg/ml of trifloxystrobin in the growth medium. The results of this study showing that 100% or 80% inhibition of colony growth was not achieved for any isolate, indicate the presence of *P. expansum* populations with reduced sensitivity to the active substance trifloxystrobin in the Republic of Serbia.

**Key words:** apple, *Penicillium expansum*, blue mold, resistance, trifloxystrobin

## 1. УВОД

Јабука је једна од економски и културолошки најзначајнијих и нутритивно најбогатијих врста воћа које се узгајају широм света (Patocka *et al.*, 2020). Домаћа јабука (*Malus domestica* Borkh.) је воћка умереног климата из породице *Rosaceae* и економски најзначајнија врста у оквиру рода *Malus* који чине 33 врсте (Магазин *и сар.*, 2022). Јабука води порекло из централне Азије, из области планине Тјен Шан, где је пронађена врста *Malus sieversii*, за коју се сматра да је претеча домаћој јабуци. Верује се да је домаћа јабука (*Malus domestica*) настала укрштањем *Malus sieversii* и *Malus orientalis* из Азије и европске дивље јабуке (*Malus Sylvestris*), за време Евроазијске размене усева, односно преношења биљака путем Свиле (Бранковић, 2022). Домаћа јабука је самобесплодна, са диплоидним бројем хромозома  $n=17$ , док је мањи број триплоидних сорти заступљен у производњи (Магазин *и сар.*, 2022).

Према подацима (ФАО, 2021), јабука су једна од најважнијих воћних врста широм света и на основу обима производње, налази се на трећем месту, после банана и лубеница (Muder *et al.*, 2022). У 2024. години укупна светска производња јабуке достигла је 97.880.076 тона на површини од 4.685.316 хектара (ФАО, 2024).

И у Србији обим производње и површине под јабуком се стално увећавају. Један од разлога су и добри агроеколошки услови који владају у Србији као и прилагодљивост јабуке, поготово њена релативна отпорност на ниске температуре и пролећне мразеве (Магазин *и сар.*, 2022). Како наводе Зоран Кесеровић *и сар.*, (2022) последњих година, највећи раст обима производње забележен је управо код јабуке, а да се свежа јабука налази међу првих 10 извозних пољопривредно-прехрамбених производа, заједно са смрзнутом малином и смрзнутом вишњом (Кесеровић *и сар.*, 2022). Укупна производња јабуке у Србији у 2024. години, достигла је 389.195 тона, на површини од 26.947 хектара (ФАО, 2024).

Осим што се користи у свежем облику, она такође представља и сировину за прераду у различите секундарне производе, као што су сок, концентрат, џем, мармелада, компот, сируп, пектин и јабучна киселина, што додатно указује на њен вишеструк значај (Вукотић *и сар.*, 2025).

Од укупне производње, око 2/3 јабуке у Р. Србији конзумира се у свежем стању (Стевановић *и сар.*, 2015). Од бербе до изношења на тржиште, плодови јабуке се чувају у складиштима краће или дуже време, током кога су често изложени нападу

разних патогена који на њима могу проузроковати значајне економске штете (Тркуља и Баги, 2022). Граховац и сар., (2011) наводе да је један од најзначајнијих узрочника смањења квалитета плодова воћака и могућих губитака после бербе јесу болести проузроковане фитопатогеним гљивама, а да економски губици који настају као последица деловања фитопатогених гљива после бербе врло често премашују губитке у самом процесу производње (Граховац и сар., 2011).

Велики број фитопатогених гљива може довести до губитака у току производње и складиштења плодова (Вукотић и сар., 2025). Као најзначајнији проузроковачи болести ускладиштених плодова јабуке наводе се следеће фитопатогене гљиве: *Penicillium* spp., *Botrytis cinerea*, *Monilinia* spp., *Colletotrichum* spp., *Neofabraea* spp., *Botryosphaeria obtusa*, *Mucor pyriformis* и др. Род *Penicillium* представља један од најзначајнијих и најраспрострањенијих родова гљива. Међу више врста рода *Penicillium* које нападају плодове јабуке, посебно је важна врста *Penicillium expansum* (Тркуља и Баги, 2022).

*Penicillium expansum* је најчешћи и економски најважнији патоген воћа након бербе који изазива плаву трулеж плодова (Luciano Rosario *et al.*, 2020). Плава трулеж широм света представља једно од најзначајнијих обољења плода јабуке у периоду након бербе, а економски губици услед овог обољења процењују се на више милиона долара годишње (Дудаш и сар., 2020). Поред тога *Penicillium expansum* производи канцерогене микотоксине који представљају ризик по људско здравље када се воће заражено плавом трулежи користи за производњу прерађених производа (Luciano Rosario *et al.*, 2020).

Хемијско сузбијање и даље остаје главни метод за успешно управљање овом болешћу. Од фунгицида за заштиту плодова јабуке од проузроковача трулежи у Србији су регистровани препарати који се могу користити 7 до 14 дана пре бербе, на бази активне супстанце трифлуксистробин, ципродинил + флудиоксонил, флудиоксинил, боскалид + пираклостробин (Тим приређивача, 2024).

Трифлуксистробин је активна супстанца из групе стробилурина, односно припада QoI групи фунгицида (спољашњи инхибитори убиквинона). Према FRAC класификацији, ризик од појаве резистентности код стробилурина, оцењен је као умерен, односно висок. Развијена резистентност према било којој активној супстанци из групе QoI фунгицида, сматра релевантном и за трифлуксистробин, због

унакрсне резистенције унутар групе FRAC 11. У свету су пријављени бројни случајеви резистенције према стробилуринима и то само пар година након њиховог увођења у употребу (Brent and Hollomon, 2007).

Како би заштита јабуке од проузроковача плаве трулежи плодова била што ефикаснија, неопходно је спроводити мониторинг осетљивости популације патогена према трифлуксистробину, као и другим доминантно коришћеним активним супстанцама (Тим приређивача, 2024).

## 2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

### 2.1.УЗГОЈ ЈАБУКЕ У СРБИЈИ И СВЕТУ

Укупна светска производња јабуке у 2024. години, достигла је 97.880.076 тона на површини од 4.685.316 хектара. Водеће земље по произведеним количинама јабуке су Кина (51.285.100 т), САД (4.922.840 т) и Турска (4.420.185 т). У Европи, водећи произвођачи су Пољска (3.384.500 т), Италија (2.398.540 т) и Француска (1.964.030 т), док се у Србији у 2024. години произвело око 389.195 тона, на површини од 26.947 хектара (ФАО, 2024).

Водеће земље по приносу према подацима ФАО за 2021. годину, су Швајцарска (59,11 т/ха), Нови Зеланд (53,15 т/ха), Чиле (50,17 т/ха), Белгија (45,7 т/ха) и Италија (42,9 т/ха). (Muder et al., 2022) По подацима Министарства пољопривреде Републике Србије за 2021. годину, исте године, остварен је рекордан род од 513.238 тона и просечан принос од 18,99 т/ха (Магазин *и сар.*, 2022). Ђуровић и сар., (2024) наводе да се уочава велика осцилација у висини остварених укупних приноса између година, па је тако већ у 2023. години, остварено само 379.690 т, иако су површине под засадама јабуке остале скоро исте (Ђуровић *и сар.*, 2024).

У развијеним земљама производња јабуке је на високом технолошком нивоу, те се обим производње не мења или се чак повећава без обзира на смањење површина под овом воћном врстом. Интензификација производње се постиже пре свега повећањем броја стабала по јединици површине и сходно томе смањењем димензија круне (Магазин *и сар.*, 2022). У Србији се такође примећује се тренд повећања густине садње, па се са некадашњих 3.000-4.000 стабала по хектару, прелази на 5.000 и више (Ђуровић *и сар.*, 2024).

У свакој земљи обично постоје географски кластери за производњу јабука, где су природни услови за узгој повољни и где је доступна специјализована инфраструктура у погледу технологије производње, удружења произвођача, складишних капацитета и приступа тржишту (Muder et al., 2022).

Површине под јабуком су стабилне или чак у порасту у Аустрији, Немачкој, Италији, Пољској, Португалији и Турској, међутим, у Чешкој и Мађарској опада током последњих десет година. Недостатак капитала за улагање у обнављање воћњака, као и недостатак система за наводњавање и савремених технологија складиштења, довела је до старења засада и смањења производних површина у

Чешкој Републици, као и у Мађарској (Muder *et al.*, 2022). Према попису пољопривреде из 2023. године у Србији највише засада има у Подунавском, Моравичком, Шумадијском и Севернобачком округу (Ђуровић *и сар.*, 2024).

Развијен је велики број комерцијалних сорти јабука, али се свега десетина њих узгаја у комерцијалне сврхе, што углавном зависи од склоности потрошача према појединим сортама. Становници Северне Америке и Европе предност дају киселим, а становници Азије слатким јабукама. У Европи, најпопуларнија сорта је Златни Делишес, праћена Галом, Ајдаредом, Црвеним Делишесом и Јонаголдом, док су у САД најпопуларније Црвени Делишес, Гала, Фуџи, Златни Делишес, Грени Смит (Бранковић, 2022). У сортименту јабуке у Србији, доминирају сорте Златни делишес, Грени Смит и Гала, а поред ове три сорте, доста се гаји и Ајдаред (у старијим засадима), као и Црвени делишес (Ђуровић *и сар.*, 2024).

Захваљујући способности дугог чувања и транспортабилности, јабука је предмет светске трговине током целе године (Магазин *и сар.*, 2022). Подаци ФАО (2020) о глобалној производњи и извозу јабука, показују да се око 10% рода јабука извози као свеже воће (Muder *et al.*, 2022). Дobar део јабуке произведене у Србији се извози, при чему је јабука друга воћна врста по вредности извоза (Магазин *и сар.*, 2022). Зоран Кесеровић *и сар.*, (2024) наводе да је, последњих година, највећи раст обима производње забележен управо код јабуке, а да се свежа јабука налази међу првих 10 извозних пољопривредно-прехранбених производа, заједно са смрзнутом малином и смрзнутом вишњом.

За разлику од ранијег периода када је готово сав извоз јабуке ишао у правцу Руске Федерације, последњих година се појављују и друга тржишта, пре свега земље Блиског и Средњег истока (Магазин *и сар.*, 2022), земље Арабијског полуострва, а значајнији извоз усмерен је и ка Великој Британији, Мађарској, Пољској, Босни и Херцеговини и Немачкој (Влаховић *и сар.*, 2015, Ђуровић *и сар.*, 2024).

Влаховић *и сар.*, (2015) наводе, да су у извозу свеже јабуке присутна значајна колебања и осцилације, због деловања читавог низа фактора: неорганизованост произвођача, уситњеност производње, недостатак обртних средстава и сл. Долазимо до тога да једне године Србија извезе у одређену земљу значајне количине, да би већ у следећој години извоз био занемарљив (Влаховић *и сар.*, 2015).

Јабука се у Србију увози из 22 земље, а највише из Републике Македоније, следе Италија, Босна и Херцеговина, Словенија и Аустрија. Значајно мање количине увозе се из Немачке, Холандије, Грчке, Пољске, Француске, Шпаније и Бразила. И код увоза јабуке на домаће тржиште се примећују осцилације током година. На количину увоза свеже јабуке утичу бројни фактори: обим домаће производње, понуда различитих сорти, увоз индустријске јабуке за прераду и сл. (Влаховић *и сар.*, 2015).

Трошкови производње воћа су значајно порасли, а пласман на инострано тржиште је отежан. У таквим условима могу да опстану само произвођачи који постижу високе приносе уз очување високог квалитета плодова (Ђуровић *и сар.*, 2024).

## 2.2.СКЛАДИШТЕЊЕ ЈАБУКЕ

Јабуке спадају међу највише узгајано и конзумирано воће у многим земљама широм света (FAO, 2020) (Muder *et al.*, 2022).

Оне су незаменљиве у људској исхрани јер садрже многе биоактивне супстанце корисне за здравље људи, међу којима су полифеноли, полисахариди (пектин), фитостероли, пентациклични тритерпени и органске киселине. Поред тога, витамини и елементи у траговима употпуњују нутритивни профил плода јабуке. Ове биоактивне супстанце заједнички показују антиоксидативно, антиканцерогено и антиинфламаторно дејство, доприносе превенцији кардиоваскуларних болести, дијабетеса, упалних процеса, карцинома, такође могу помоћи у лечењу различитих обољења и стања, као што су астма, повишена киселост желуца, артритис, дијареја, повишена телесна температура, гојазност, главобоља, болови у стомаку, кожне болести и респираторни проблеми (Patocka *et al.*, 2020).

Од укупне производње око 2/3 јабуке потроши се у свежем стању. Како би се задовољиле потребе тржишта, развила се потреба за дужим чувањем плодова јабуке у свежем стању (Стевановић *и сар.*, 2015). Плодови се након бербе усмеравају на тржиште или чувају у хладњачама за складиштење воћа. Обзиром да плодови јабучастог воћа ботанички припадају групи синкарпне коштуннице, а физиолошки се убрајају у групу климактеричних плодова, могуће је њихово чување у свежем стању, у објектима са одговарајућим техничко - технолошким решењима све до наредне бербе (Пашалић, 2009).

Свежи плодови након бербе настављају са метаболизмом, односно биохемијски и физиолошки процеси се настављају и сматра се да су они и даље живи, иако су

одвојени од матичне биљке. Услед респирације и транспирације долази до размене гасова и воде са околином што доводи до губитка компоненти плодова. То значајно доприноси губитку квалитета, због смањења масе плодова, губитка чврстоће и свежине и скраћује време чувања (Стевановић и сар., 2022). Осим тога, на оваквим плодовима се обично за кратко време појављују и различити симптоми трулежи, чији су најчешћи проузроковачи фитопатогене гљиве, који се нарочито испољавају на плодовима јабуке лошијег квалитета, често презрелим, механички оштећеним или инфицираним за време вегетације (Тркуља и Баги, 2022).

Према Тркуљи и Багију (2022), суштина складиштења је у стварању услова у којима би се проценат дусања смањено на минимум који је потребан да одржи виталне процесе у плодовима. На тај начин су резерве храњивих материја у плодовима конзервисане, зрење је одложено, очуван квалитет а нормална отпорност плодова према нападу патогених микроорганизама.

Пашалић (2009) наводи да је основни задатак складиштења воћа, очување његовог квалитета у што дужем временском периоду, чиме се омогућава континуирана понуда свежег воћа током читаве године. Мада постоје и друга решења, најбољи начин складиштења воћа је чување у хладњачама.

Разликујемо следеће типове хладњача:

- НА – хладњаче са нормалном атмосфером (регулација температуре и влажности ваздуха);
- КА – хладњаче са контролисаном атмосфером (регулација температуре, влажности ваздуха, концентрације угљен-диоксида и концентрације кисеоника);
- УЛО – ултраниски садржај кисеоника (садржај  $O_2$  највише 2%);
- УЛЕ – ултраниски садржај етилена (поседују опрему за уклањање етилена);
- ДА – хладњаче са динамичком атмосфером (праћењем физиолошког стања плодова у складишту, омогућено је аутоматско прилагођавање услова складиштења тренутном физиолошком стању плодова) (Пашалић, 2009).

Код хладњача са нормалном атмосфером (НА), хлађењем се смањује брзина респирације, успоравају биохемијски и микробиолошки процеси, како би се одржала њихова свежина и укупни квалитет, и значајно продужило време употребе у свежем стању (Стевановић и сар., 2015). Састав ваздуха који се налази у НА хладњачама, једнак је саставу спољашњег ваздуха, односно у њему се налази приближно 21% кисеоника, 0,03% угљендиоксида и 78% азота (Пашалић, 2009).

Контролисана атмосфера (КА) подразумева да се поред ниске температуре и повећане релативне влажности, измени и процентуални удео гасова, односно смањи садржај кисеоника и повећа садржај угљен-диоксида у односу на атмосферски ваздух. Контролисана атмосфера се постиже смањењем концентрације кисеоника са 21% на концентрацију која је оптимална за одређену врсту, односно сорту. Најчешће се примењује контролисана атмосфера са 1-5%  $O_2$ . Истовремено се повећава и процентуални удео угљен-диоксида од 0,03% до оптималне вредности, углавном до 3%. Такав режим складиштења подразумева и одржавање веће релативне влажности ваздуха како би се смањило исушивање ускладиштених производа, без повећаног ризика од микробиолошког кварења. Ниска концентрација кисеоника и повишена концентрација угљен-диоксида у атмосфери коморе стварају неповољне услове за активност и развој микроорганизама.

У таквој средини, смањује се респирација и транспирација плодова, као и активност ензима и стварање етилена, чиме се спречава презревање и пропадање плодова и омогућава дуже складиштење плодова (Стевановић *и сар.*, 2015; Пашалић, 2009).

Данас се у свету јабуке највише чувају у УЛО хладњачама (ULO, Ultra Low Oxygen). У УЛО контролисаној атмосфери интензитет физиолошких и микробиолошких процеса у плодовима се успорава комбинованим деловањем ниске температуре, екстремно ниске концентрације кисеоника, повећане концентрације угљен-диоксида, као и повећаном релативном влажношћу у комори, како не би дошло до исушивања и смежуравања плодова (Стевановић *и сар.*, 2015). УЛО хладњаче су КА хладњаче са ултраниским садржајем кисеоника где концентрација  $O_2$  не прелази вредност од 2% (Пашалић, 2009). Мењала се и терминологија, па су се почели користити различити називи за различите режиме, као што је: LO (Low Oxygen) када је  $O_2$  у интервалу 1,5-2% или ULO (Ultra Low Oxygen) са 1-1,5%  $O_2$ , а касније и динамичка контролисана атмосфера DCA (Dynamic Control Atmosphere) са садржајем кисеоника испод 1 % (Стевановић *и сар.*, 2015). Приликом складиштења воћа у овим објектима неопходна је строга контрола присуства етанола и ацет-алдехида, како би се избегла појава анаеробног дисања (Пашалић, 2009).

Ниска концентрација кисеоника и повећан садржај угљен-диоксида, затим оптимална температура и релативна влажност омогућавају успостављање контроле над физиолошким, биохемијским процесима и микробиолошким проузроковачима обољења, што омогућава смањење губитака уз истовремено максимално

продужавање дужине чувања и очување квалитета у великом степену (Стевановић *и сар.*, 2015).

Оно шта истиче више аутора је то, да је посебну пажњу неопходно усмерити на квалитет плодова који се уносе у хладњачу, јер се квалитет плодова ни у ком смислу не може поправити складиштењем у хладњачама. Свежи плодови никада неће имати бољи квалитет него што га имају у моменту бербе. И у најмодерније опремљеним складиштима, највише што се може очекивати је да се очува постојећи квалитет што је дуже могуће или долази до мањег или већег опадања квалитета током чувања. (Пашалић, 2009; Седлар *и сар.*, 2017; Стевановић *и сар.*, 2015)

### 2.2.1. Губици приликом складиштења јабуке

Плодови јабуке имају висок садржај воде и подложни су променама и кварењу после бербе. Према подацима (ФАО, 2002) губици у приносима након бербе свежег воћа, крећу се од 5 до 25% у развијеним земљама, а 20 до 50% у земљама у развоју. Процењује се да Србија годишње губи 30-40% својих производа у различитим фазама после бербе (Стевановић *и сар.*, 2015). Да би се ови губици смањили, неопходно је стећи основна знања о биологији и физиолошким процесима у плодовима током растења и развића, у периоду до и након бербе, као и о утицају фактора спољне средине на погоршање квалитета плодова (Пашалић, 2009).

На квалитет јабуке и појаву губитака у току складиштења утичу многобројни фактори као што су: температура, састав атмосфере у хладњачи, релативна влажност ваздуха у комори и здравствено стање плодова (Дудаш *и сар.*, 2022). Са аспекта здравственог стања плодова, узрок нарушавања квалитета може бити абиотичког или биотичког порекла (под утицајем деловања микроорганизама) (Вукотић *и сар.*, 2025)

Од биолошких специфичности плода зависи у великој мери дужина успешног чувања, па се стога и јављају осетне разлике у трајности појединих сорти. На трајност и губитке до којих долази у току чувања утичу и услови под којим су се плодови развијали, затим степен зрелости плодова, као и начин припреме и паковања (Стевановић *и сар.*, 2015).

После бербе плодови јабуке су и даље живи и настављају са дисањем, чиме се у присуству кисеоника из ваздуха оксидише присутна органска материја у плодовима, а као производи дисања ослобађају се угљендиоксид, водена пара и топлота дисања. Са смањењем интензитета дисања успорава се процес сазревања, али и презревања,

старења и пропадања плодова (Стевановић *и сар.*, 2015). Плодови јабуке карактеристични су по наглом порасту метаболичке активности, познатом као „климактерични успон дисања”. Овај процес је веома је значајан и са фитопатолошког становишта, јер после њега плодови нагло губе отпорност према разним складишним патогенима. (Тркуља и Баги, 2022)

Утврђене су значајне промене садржаја компоненти у плоду јабуке након складиштења, што указује да се процеси у плодовима јабуке одвијају и након убирања. Наставља се активност ензима, плодови дишу, трансформише се органска материја.

Првенствено долази до промене угљених хидрата и киселина. Може да се примети повећан садржај укупних шећера, из разлога што током складиштења долази до разлагања скроба у плодовима, а као резултат његовог разлагања (хидролизе) повећава се садржај шећера. Садржај шећера је врло значајан и сматра се да има директан утицај на свеукупни квалитет плодова јабуке, јер им шећери дају слаткоћу, учествују у формирању укуса, доприносе формирању сортних карактеристика (Стевановић *и сар.*, 2022).

Чврстоћа плодова је такође једна од најзначајнијих карактеристика квалитета јабуке и зато је управо спречавање омекшавања један од најзначајнијих циљева у периоду након бербе. Биохемијске реакције у плодовима имају велику улогу у промени структуре и текстуре, јер утичу на деградацију ћелијског зида, смањен тургор ткива, што доводи до његовог омекшавања. Примећено је значајно смањење пектинских материја у складиштеним јабукама у односу на свеже, а њихово присуство условљава чврстоћу плодова и врло је значајан параметар квалитета. Иначе, пектинске материје су најзаступљенији макромолекули унутар матрикса ћелијског зида и главне су компоненте средње ламеле. Током сазревања плодова долази до њихове солубилизације и деполимеризације, па се повећава присуство растворљивих форми (Стевановић *и сар.*, 2022).

Интензивнијом респирацијом и повећаним губитком воде, долази до повећања садржаја суве материје, што се јавља као последица исушивања током складиштења и концентрисања растворљиве суве материје (Стевановић *и сар.*, 2022).

Јабуке су значајан су извор и витамина Ц који се не синтетише у организму и мора се уносити храном (Стевановић *и сар.*, 2022). Губици нутритивне вредности након

бербе, посебно садржаја витамина Ц, могу бити знатни, а погоршавају их физичка оштећења, дуготрајно складиштење, високе температуре, ниска релативна влажност ваздуха (Kader *et al.*, 2013).

Смањење садржаја витамина Ц током складиштења свежих плодова, узроковано је аскорбат оксидазом, главним ензимом који разграђује витамин Ц. Очување овог витамина је веома важно и са нутритивног и технолошког аспекта, јер се сматра параметром очувања квалитета током прераде и чувања (Стевановић *и сар.*, 2022).

Температура је најважнији фактор животне средине који утиче на пропадање пољопривредних производа. На температурама изнад оптималних, брзина пропадања расте 2 до 3 пута са сваким порастом температуре од 10 °С. Температура утиче на начин на који други унутрашњи и спољашњи фактори делују на производ и има снажан утицај на клијање спора и брзину развоја патогена. (Kader *et al.*, 2013).

Релативна влажност може утицати на губитак воде, развој труљења, учесталост и озбиљност неких физиолошких поремећаја као и на уједначеност сазревања воћа. Кондензација воде на производу (знојење) током дужих временских периода је важнија за појаву обољења, него релативна влажност околног ваздуха (Kader *et al.*, 2013).

При излагању плодова температурама које су блиске њиховим тачкама замрзавања, ремети се метаболизам у ткивима и неправилно функционисање може да доведе до оштећења. Оштећење услед хладноће манифестује се различитим симптомима, укључујући промену боје на површини и у унутрашњости плода, губитак чврстине, лезије на површини плодова, појава вишка воде тј. воденасто ткиво, изостанак сазревања или неравномерно сазревање, развој неуобичајених укуса и повећану подложност нападу патогена (Kader *et al.*, 2013; Стевановић *и сар.*, 2022).

Један од најзначајнијих узрочника смањења квалитета плодова воћака и могућих губитака после бербе јесу болести проузроковане фитопатогеним гљивама. Економски губици који настају као последица деловања фитопатогених гљива после бербе врло често премашују губитке у самом процесу производње (Граховац *и сар.*, 2011). Велики број фитопатогених гљива може довести до губитака у току производње и складиштења плодова. (Вукотић *и сар.*, 2025)

Као најзначајнији проузроковачи болести ускладиштених плодова јабуке наводе се следеће фитопатогене гљиве: *Penicillium* spp., *Botrytis cinerea*, *Monilinia* spp., *Colletotrichum* spp., *Neofabraea* spp., *Botryosphaeria obtusa*, *Mucor pyriformis* и др.

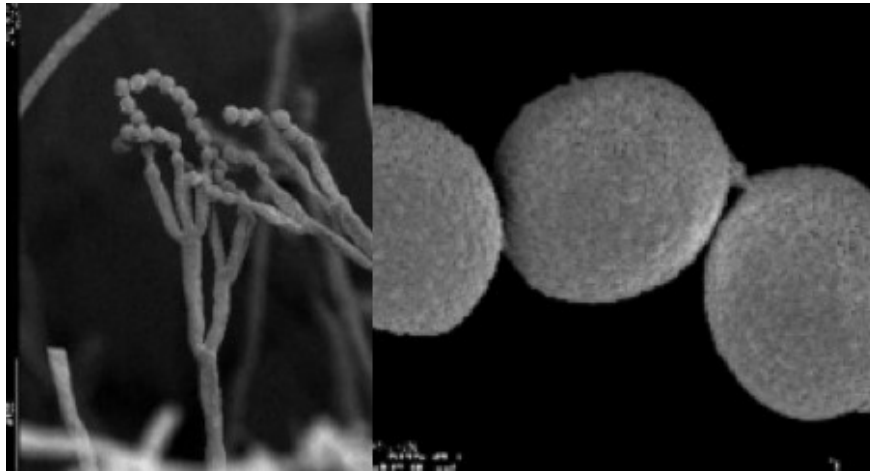
## 2.3. ПЛАВА ТРУЛЕЖ ПЛОДОВА ЈАБУКЕ

### 2.3.1. *Penicillium* spp.

Род *Penicillium* представља један од најзначајнијих и најраспрострањенијих родова гљива. Прве врсте овог рода описао је Линк 1809. године, када је и увео родовско име *Penicillium* (Vico *et al.* 2014). Линк је тада описао 3 врсте: *P. candidum*, *P. glaucum* и типску врсту рода *P. expansum*. Од тада је у оквиру овог рода уведено више од 1000 имена. Врсте рода *Penicillium* припадају разделу *Ascomycota* (Visagie *et al.*, 2014).

Највећи значај овог рода лежи у производњи пеницилина, који је донео револуцију у медицини и лечењу бактеријских обољења. Поред тога, економски значај се огледа и у томе, да врсте из овог рода могу да нанесу огромне штете у пољопривредној производњи проузрокујући појаву трулежи током производње и складиштења плодова (Visagie *et al.*, 2014). Ово се највише односи на воће намењено за прераду због производње канцерогеног микотоксина, патулина, који представља озбиљан ризик по људско здравље (Vico *et al.*, 2014). Главна улога ових врста у природи је разлагање органских материја, па се тако поједине врсте користе у прехранбеној индустрији за производњу неких врста сирева и других производа (Visagie *et al.*, 2014).

Гљиве из рода *Penicillium* се првенствено размножавају асексуално, асексуалне споре, конидије представљају примарни извор инокулума (Luciano Rosario *et al.*, 2020). Конидије су округле, једноћелијске, формирају се у низовима на сложено разгранатим конидиофорама које се називају пеницилуси (Дудаш *и сар.*, 2022).



Слика 1. Изглед конидиофора и једноћелијских конидија *Penicillium expansum*

(извор: Luciano Rosario *et al.*, 2020)

Плаву трулеж плодова јабуке проузрокује више врста из рода *Penicillium* међу којима је најзначајнија *P. expansum*. Остале врсте које се наводе су *P. solitum*, *P. commune*, *P. crustosum*, *P. italicum*, *P. digitatum*, *P. polonicum*, *P. chrysogenum*, *P. verrucosum* и *P. regulosum* (Vico *et al.*, 2014).

### 2.3.2. *Penicillium expansum*

*Penicillium expansum* је најчешћи и економски најважнији патоген воћа након бербе који изазива плаву трулеж плодова (Luciano Rosario *et al.*, 2020). Ова врста је изразито полифагна, осим плодова јабуке напада и плодове крушке, дуње, наранџе, лимуна, мандарине, јагоде, трешње, шљиве, брескве, парадајза, краставца, лука и многих других воћних, повртарских биљних врста (Тркуља и Баги, 2022).

Због великог броја домаћина Luciano Rosario *et al.*, (2020) наводе да *P. expansum* представља велику претњу глобалној индустрији воћа, негативно утиче на квалитет воћа, узрокујући вишемилионске губитке. Поред тога *Penicillium expansum* производи канцерогене микотоксине који представљају ризик по људско здравље када се воће заражено плавом трулежи користи за производњу прерађених производа (нпр. сок, сос, фил за пите, воћни путери).

Проузроковачи плаве трулежи су некротрофни патогени односно патогени рана. Како би остварили заразу захтевају ране (убоде, модрице..) које настају у току бербе или у процесу манипулације и складиштења плодова или природне отворе, као што су лентицеле или подручје чупања петелке (Vico *et al.*, 2014). Нагњечени плодови и плодови оштећени током бербе, на којима се током складиштења стварају ране су изразито подложни инфекцији (Дудаш *и сар.*, 2022).

Већина некротрофних гљивичних патогена користи ензиме који разграђују ћелијски зид како би колонизовали своје домаћине. Код *P. expansum*, идентификован је ензим полигалактуроназа 1 (PG1), који је одговоран за мацерацију ткива и колонизацију патогена. Испитивања су доказала да је полигалактуроназа 1 (PG1) важан ензим за развој плаве трулежи код *P. expansum* јер је екстрахован искључиво из распалог ткива. Такође је утврђено да, пектин, као извор угљеника доводи до максималне полигалактуроназне активности у поређењу са глукозом из плодова јабуке и крушке (Luciano Rosario *et al.*, 2020).

Ова врста се добро развија на температури од 0 °C, или чак на температурама од -2/-3 °C, што значи да може да врши инфекцију и у хладњачама (Morales *et al.*, 2007).

### 2.3.3. Микотоксини

Проузроковачи плаве трулежи ускладиштених плодова јабуке, поред економских губитака до којих доводе, представљају велику претњу по здравље људи због микотоксина које продукују (Дудаш *и сар.*, 2022). Врсте из рода *Penicillium* производе неколико секундарних метаболита, од којих неки показују ћелијска оштећења и сматрају се могућим микотоксинима. Овде се наводе хетоглобозини, цитринин, комунезини, експанзолиди А и Б, охратоксин А, пенитрем А, рокфортин Ц, рубратоксиин Б, од којих је најзначајнији патулин. Међутим, само два од ових метаболита, односно патулин и цитринин, су широко препознати као микотоксини који су штетни по људско здравље (Luciano Rosario *et al.*, 2022).

### 2.3.4. Патулин

Патулин продукује више од 60 врста гљива, а првобитно је проучаван као потенцијални антибиотик, али су га даља истраживања сврстала у микотоксине због његовог токсичног дејства на здравље људи. Према структури патулин је β-незасићени хетероциклични лактон. Ово једињење је проблематично за прерађене воћне производе јер је веома је стабилно на топлоту и не елиминише се током термичке обраде или пастеризације (Luciano Rosario *et al.*, 2022).

Истраживањем је доказано неуротоксично дејство патилина код људи као и инхибицију неколико цревних ензима. Наводи се и потенцијално генотоксично, тератогено, мутагено и имунотоксично дејство на људски организам било да се уноси конзумацијом свежег воћа или путем воћних сокова. Због токсичног и

потенцијално канцерогеног дејства, Европска Унија је законски ограничила максимално дозвољена концентрација патулина која износи 50 µg/l за воћне сокове и друге прерађевине, 25 µg/l за чврсте производе од јабуке и 10 µg/l за храну и сокове за децу (Дудаш *и сар.*, 2022; Luciano Rosario *et al.*, 2022).

На продукцију микотоксина значајно утичу активност воде (део воде у супстрату који је доступан микроорганизмима за њихову метаболичку активност), температура и рН вредност супстрата на ком се развијају. Патулин се продукује на температурама 0-25°C, док температуре изнад 31°C инхибирају његову продукцију (Дудаш *и сар.*, 2022).

Пошто је плава трулеж проблем који се углавном јавља током складиштења, важно је знати утицај различитих услова складиштења на способност *P. expansum* да расте и производи патулин током складиштења јабука. Јабуке се обично складиште у условима контролисане атмосфере, ниска температура (0,5–3,5 °C) у комбинацији са смањеним нивоима кисеоника (1–3% O<sub>2</sub>) и повишеним садржајем угљендиоксида (0,8–3% CO<sub>2</sub>). Нажалост, режими са високим нивоима CO<sub>2</sub> могу изазвати озбиљне нежељене ефекте (промену укуса, унутрашње и спољашње повреде), што је ограничило њихову примену (Baert *et al.*, 2007).

Baert *et al.*, (2007) истичу да индукција ограниченог стреса код *P. expansum*, као што је снижавање температуре или снижавање нивоа кисеоника, стимулише производњу патулина. Међутим, комбинација различитих стресних услова (нпр. ниска температура и низак ниво O<sub>2</sub>) резултираће смањеним стварањем патулина. Комбинација стресних услова, при којима се примећује смањење продукције микотоксина, зависи од соја.

Резултати истраживања показују да је смањење нивоа кисеоника на 1% и температуре на 1°C ефикасно за смањење производње патулина, али за више температуре и више нивое O<sub>2</sub>, производња патулина зависи од соја. Из овога се закључује да температура и ниво кисеоника морају бити што је могуће нижи током складиштења јабука како би се сузбила производња патулина и гарантовала безбедност хране (Baert *et al.*, 2007).

Различитим истраживањима се утврдило да уклањање трулог дела плода пре прераде може да доведе до смањења нивоа патулина у производу, те постоји препорука од

ФАО да се такви делови плода пре прераде уклоне, како би се смањио ниво патулина у финалном производу (ФАО, 2003).

### 2.3.5. Симптоми плаве трулежи

Почетни симптоми плаве трулежи на ускладиштеним плодовима јабуке уочавају се у виду кружних, меких, воденастих, светлосмеђих ситних пега, које се при повољним условима за развој патогена брзо шире, како по површини, тако и према унутрашњости плода. Између оболелог и здравог ткива плода уочава се јасна граница (Тркуља и Баги, 2022). Труло месо плода је мекано и воденасто због мацерације ткива ензимом полигалактуроназом. Како се трулеж шири, трули део се лако може одвојити од околног здравог меса плода (Vico *et al.*, 2014).



Слика 2. Почетни симптоми плаве трулежи на плоду јабуке  
(извор: Vico *et al.*, 2014)

У условима повољним за развој патогена, на површини иструлог дела плода јабуке, долази до појаве плаво-зелене плесни, коју чине репродуктивни органи (конидије), проузроковача плаве трулежи (Дудаш *и сар.*, 2022). Плаво-зелена маса спора се појављује на трулом ткиву плода, почевши од места инфекције и ширећи се ка споља како трулеж напредује (Luciano Rosario *et al.*, 2020).



Слика 3. Симптоми плаве трулежи на плоду јабуке  
(извор: Luciano Rosario *et al.*, 2020)

Трулеж је праћена појавом карактеристичног земљаног, устајалог, плеснивог мириса што представља сигуран дијагностички знак за ову болест. Плава трулеж се у неусловним складиштима може ширити на суседне здраве плодове, формирајући тзв. „гнезда” обољелих плодова (Тркуља и Баги, 2022).

#### 2.4.МЕРЕ ЗАШТИТЕ

У циљу спречавања појаве плаве трулежи на плодовима јабуке неопходно је применити интегралне мере сузбијања које подразумевају коришћење различитих механичких, хигијенско-санитарних, агротехничких, помотехничких, биолошких и хемијских мера, током гајења јабуке у воћњацима, као и током чувања плодова јабуке у хладњачама (Тркуља и Баги, 2022). Дудаш и сар., (2022) истичу значај превентивних мера које обухватају пажљиво руковање плодовима током бербе и паковања, хигијенско одржавање складишта, што брже расхлађивање плодова након бербе, као и издвајање и уништавање нагњечених и трулих плодова.

Тркуља и Баги (2022) наводе да је посебно важан моменат и начин бербе, као и манипулација, сортирање и паковање плодова. Плодове који ће се чувати у хладњачама треба брати нешто пре пуне зрелости, јер су тада мање подложни механичким повредама и нападу штетних микорорганизма, те се лакше транспортују. Такође, треба радити на томе да се разне повреде за време бербе, транспорта, сортирања и паковања плодова јабуке, сведу на најмању могућу меру.

Како би се продужио рок трајања плодова Граховац и сар., (2011) истичу мере заштите и очувања квалитета, међу којима су примена фунгицида, складиштење у

условима контролисане и модификоване атмосфере (високи садржај угљендиоксида), третирање озоном, топлотне третмане, биолошку контролу, индуковање отпорности, примену природних материја, хипобарично, тј. складиштење под ниским притиском.

Хемијско сузбијање и даље остаје главни метод за успешно управљање овом болешћу. Први синтетички фунгициди коришћени против овог патогена били су бензимидазоли (активна супстанца – тиабендазол) и инхибитори биосинтезе стерола - DMI инхибитори (DeMethylation Inhibitors) (активна супстанца – имазалил). Примењивани су након бербе, било потапањем плодова пре складиштења или прскањем на производној линији у складиштима. Међутим, забринутост због остатака фунгицида у ускладиштеним плодовима као и развој резистентности код *P. expansum* према овим активним материјама, довели су до промена у пракси сузбијања ове болести (Samaras *et al.*, 2020).

Тренутно се већина фунгицида за сузбијање плаве трулежи на плодовима јабуке примењује у воћњаку, неколико дана пре бербе. Уведене су нове хемијске групе фунгицида за сузбијање болести јабуке, укључујући и плаву трулеж. Ове групе фунгицида обухватају анилинопиримидине (активне супстанце – ципродинил, приметанил), фенилпироле (активна супстанца – флудиоксонил), инхибиторе спољашњег места везивања хинона – QoI фунгициде (Quinone Outside Inhibitors) (активне супстанце – пираклостробин, трифлуксистробин) и инхибиторе сукцинат-деhidрогеназе – SDHI фунгициде (Succinate Dehydrogenase Inhibitors) (активне супстанце – боскалид, пентиопирад, изопиразам, флуопирам) (Samaras *et al.*, 2020).

Од фунгицида за заштиту плодова јабуке од проузроковача трулежи у Србији су регистровани препарати који се могу се користити 7 до 14 дана пре бербе, на бази активне супстанце трифлуксистробин (каренца 14 дана), ципродинил + флудиоксонил (каренца 3 дана), флудиоксинил (каренца 3 дана), боскалид + пираклостробин (каренца 7 дана) (Тим приређивача, 2024). Међутим, ниједан од препарата није регистрован за третирање плодова после бербе (Граховац *и сар.*, 2011).

Дуаш и сар., (2022) наводе да се ефикасно сузбијање проузроковача плаве трулежи јабуке, може постићи применом фунгицида пре бербе (активне материје: пираклостробин и боскалид) или потапање плодова након бербе, а пре складиштења

у суспензију или емулзију фунгицида (активне материје: флудиоксонил и пириметанил).

Тркуља и Баги (2022) такође истичу велики значај последњег третмана фунгицидима пред бербу плодова јабуке. Међутим, већина фунгицида који се примењују у данима пре бербе, не обезбеђују потпуну заштиту плодова, јер се инфекције најчешће јављају након бербе. Због тога, употреба фунгицида након бербе представља најефикаснији начин хемијске заштите против проузроковача плаве трулежи.

Узимајући у обзир друге гајене биљне врсте, јабука има највећу употребу пестицида по јединици површине, са највећим бројем заштитиних третмана. Од укупне потрошње пестицида током одржавања засада јабука, 75 % се односи на примену фунгицида (Бранковић, 2022).

Иако синтетички, фунгициди имају широку примену у сузбијању обољења ускладиштених плодова воћа, појавиле су се популације овог патогена са смањеном осетљивошћу према фунгицидима, што значајно смањује њихову ефикасност (Luciano Rosario *et al.*, 2020),

Могућности управљања плавом трулежи су ограничене и појава *Penicillium* spp. резистентних према фунгицидима додатно отежава контролу болести, стога су потребни нови приступи и алати за како би се очувао квалитет плодова током складиштења (Luciano Rosario *et al.*, 2020).

Не постоји отпорност домаћина код комерцијалних сорти јабука на гљивичне биљне патогене који изазивају пропадање након бербе, укључујући *Penicillium* spp. Пошто је отпорност заснована на домаћину важан део стратегије управљања болестима, важно је разумети основне механизме и идентификовати гене који контролишу отпорност и створити комерцијалне сорте јабуке отпорне према проузроковачима трулежи (Luciano Rosario *et al.*, 2020).

Хемијска контрола не сматра се одрживим дугорочним решењем, због токсичности ових супстанци, потенцијалног штетног ефекта на животну средину и здравље људи, као и развој резистентности патогена према фунгицидима, довели су до потребе за проналажење алтернативе хемијској заштити (Граховац *и сар.*, 2011).

Међународно тржиште ће у будућем периоду поставити такве стандарде пред наше произвођаче воћа, да ће само они који се придржавају принципа интегралне производње моћи да се појаве на том тржишту. Зато се производња јабуке мора

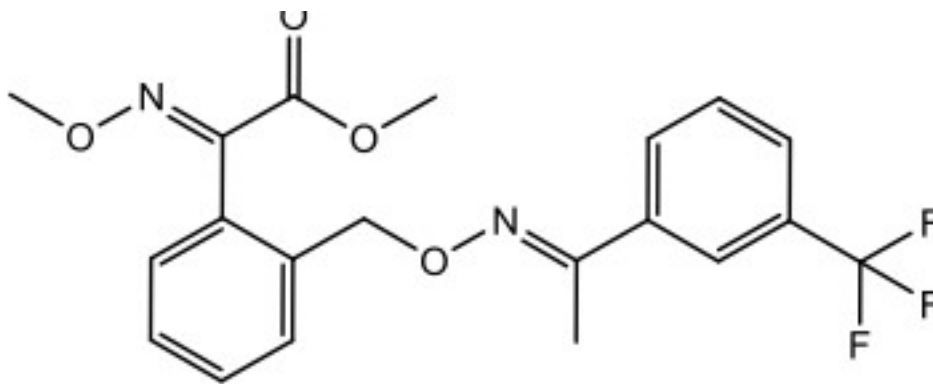
преусмерити ка производњи здравствено безбедних плодова високог квалитета (Влаховић *и сар.*, 2015).

Дудаш *и сар.* (2022) наглашавају значај који би могла да има чешћа примена биолошких мера заштите у контроли патогених врста из рода *Penicillium* (Дудаш *и сар.*, 2022). Међу микроорганизмима, као ефикасни агенси биолошке заштите од *P. expansum* на плодовима јабуке наводе се: *Bacillus subtilis*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas fluorescens*, и други (Luciano Rosario *et al.*, 2020).

#### 2.4.1. Трифлуксистробин

Трифлуксистробин је нова синтетичка активна супстанца, која припада класи QoI фунгицида (спољашњи инхибитори убиквинона) из групе стробилурина– оксимино-ацетата.

QoI група фунгицида, поред трифлуксистробина, укључује и азоксистробин, пираклостробин, флуоксастробин, крезоксим-метил, пикоксистробин, мандестробин и метоминостробин (Büyüklüoğlu *et al.*, 2026). Стробилурини А и В су први пут откривени у филтрату базидиомицете *Strobilurus tenacellus*, након чега су добијени њихови хемијски деривати са идентичним механизмом деловања, који су подељени у 9 група (Shcherbakova, 2018).



Слика 4. Структурна формула трифлуксистробина  
(извор: Бранковић, 2022)

Фунгицидно дејство се остварује инхибицијом ћелијског дисања у митохондријалном комплексу III, везивањем за убиквинол оксидазу (Qo) центар цитохрома b (на спољашњој страни митохондријалне мембране). Последица

везивања стробилурина за убиквинол оксидазу (Qo) центар, је прекид транспорта електрона између цитохрома б и цитохрома ц<sub>1</sub>, што ремети енергетски циклус и продукцију АТП-а (Russell, 2004; Shcherbakova, 2018).

Према механизму деловања, стробилурини припадају класи системичних фунгицида, који продиру у биљку, делују куративно и протективно. Ефикасни су у малим количинама у сузбијању почетне фазе болести. Испитивања су показала, да су у енергетски захтевним фазама развоја, попут клијања спора, гљиве посебно осетљиве на стробилурине управо због њиховог механизма деловања, тј. ометања процеса производње енергије, захваљујући чему су стробилурини пре свега превентивни фунгициди (Бранковић, 2022).

Трифлуксистробин има веома повољан токсиколошки профил, брзо се разлаже у земљишту и подземним водама и безопасан је за организме који нису циљани. (Schirra *et al.*, 2006)

## 2.5. РЕЗИСТЕНТНОСТ

У светској пољопривреди се тренутно користи најмање 150 различитих фунгицидних једињења са различитим механизмима деловања, док је број производа развијених и регистрованих на њиховој бази знатно већи (Shcherbakova, 2018).

Третмани фунгицидима и даље представља најзначајнији метод борбе против патогена, који гарантује високе приносе, као и очување квалитета пољопривредних производа. Ипак, често је неопходно вишекратно примењивати фунгициде током вегетационе сезоне како би се постигло ефикасно сузбијање гљивичних патогена. Оваква интензивна употреба фунгицида изазива забринутост због негативног утицаја на животну средину и здравље људи и подстиче развој резистенције код гљивичних патогена и чини их релативно краткотрајним и економски неисплативим решењем (Shcherbakova, 2018).

Примена фунгицида сузбија највећи део присутне популације патогена. Пре или касније, током интензивне употребе фунгицида, могу се појавити популације циљног патогена које више нису довољно осетљиве, на њих фунгицид има слабији утицај или их уопште не сузбија. Оне се углавном јављају као одговор на поновљену употребу тог фунгицида или другог фунгицида који је с њим хемијски и/или биохемијски повезан, путем заједничког механизма деловања (Gisi *et al.*, 2000; Brent and Hollomon, 2007).

Процес селекције изазван фунгицидом започиње преживљавањем, а затим и повећањем удела мање осетљивих (резистентних) јединки. Оне могу постати значајан део популације (тј. субпопулација) све док траје селекциони притисак, али се њихов удео смањује након престанка примене фунгицида (Gisi *et al.*, 2000).

Према дефиницији ФАО, резистентност представља појаву опадања реакције животињских и биљних врста и биљних патогена на пестициде или друге агенсе, која настаје као последица њихове употребе. Shcherbakova (2018) наводи да је резистенција на фунгициде је посебан случај природне биолошке еволуције организама способних да се прилагоде променљивим условима околине. Стевић (2019) наводи да се резистентност дефинише као могућност развијања способности код једне расе, соја или популације неких врста организама, да толеришу дозе фунгицида које су инхибиторне за нормално осетљиве популације дате врсте. Поред појма резистентност, користе се и термини смањена осетљивост или толерантност који означавају редукцију осетљивости патогена до оног нивоа који неће представљати значајнију препреку у сузбијању патогена у пољским условима (Стевић, 2019).

Једном када се појави, отпорност је наследна. Она настаје као последица једне или више промена у генетској структури популације патогена. Појава резистентних мутаната биће подстакнуто чешћим третманима фунгицидом, не поштовањем препоручене дозе, присуством већих популација патогена пре третмана, као и већом производњом спора и краћим временом генерације патогена (Brent and Hollomon, 2007).

За анализу појава отпорности, као и за процену ризика од њеног настанка, неопходно је детаљно размотрити неколико елемената. То су: механизам отпорности код патогена, хемијска сличност фунгицидних једињења, методе за детекцију резистентних јединки, као и осмишљавање стратегија примене препарата (Gisi *et al.*, 2000).

Под „ризиком од појаве резистентности” подразумева се вероватноћа да ће се резистентност развити у мери која доводи до неуспеха или значајног смањења ефикасности сузбијања болести у комерцијалној заштити биља. На укупан ризик од развоја резистентности утичу „ризик патогена“ и „ризик фунгицида“. Множењем ова два фактора, добија се производ који представља комбиновани ризик од развоја

резистентности одређеног патогена на одређени фунгицид (Brent and Hollomon, 2007).

### **2.5.1. ”Ризик повезан са фунгицидом”**

Различите класе фунгицида – било да се дефинишу према хемијској структури или механизму деловања – могу се значајно разликовати у погледу склоности ка губитку ефикасности услед појаве резистенције код циљних патогена (Brent and Hollomon, 2007).

Ризик од развоја резистентности је већи код фунгицида који се примењују учестало у току једне сезоне и код оних који имају шири спектар деловања. Такође, код фунгицида који имају куративно и ерадикативно деловање, ризик од резистентности се повећава у односу на оне који се примењују само превентивно (Стевић 2019).

Ризик од развоја резистентности се често може прво проценити узимајући у обзир хемијску класу којој фунгицид припада. Уколико фунгицид припада познатој хемијској класи, могуће је са великом сигурношћу предвидети ризик од појаве отпорности код циљних патогена за ту класу (Brent and Hollomon, 2007).

Популације патогена које развију отпорност према једном фунгициду истовремено постају отпорне и на друге фунгициде који делују на исто циљно место, односно контролисати ће их исти механизам отпорности код патогена. Углавном се ради о фунгицидима који су по хемијској структури сродни првом фунгициду или имају сличан механизам деловања. Ова појава је позната као „унакрсна отпорност”. Резистентне популације патогена су показале унакрсну резистентност на све активне супстанце из групе QoI фунгицида. Стробилурини деле унакрсну резистентност са оксазолидиндионским фунгицидом фамоксадоном и имидазолинонским фунгицидом фенамидоном. Они имају сродна циљна места деловања на цитохрому (убиквинол-оксидазу Qo), због чега патоген развија заједнички механизам резистентности. Постоји и супротна појава, „негативна унакрсна отпорност”, код које промена која доводи до отпорности на један фунгицид, резултира смењом, односно повећањем осетљивости на други (Brent and Hollomon, 2007).

Поред унакрсне отпорности, уочена је и „вишеструка отпорност” код које популације патогена развијају засебне механизме отпорности према два или више међусобно неповезаних фунгицида. Они настају услед независних мутација које се селекују излагањем сваком од фунгицида (Brent and Hollomon, 2007).

Када гледамо механизам деловања, фунгициди могу деловати на појединачним циљним местима (често се називају фунгицидима „за једно место“ или „специфичним за место“) или на више циљних места. Резистенција на фунгициде који делују на неколико циљних места је ретка, јер се неколико мутација мора догодити истовремено да би се стекла резистентност на више циљних места (Brent and Hollomon, 2007).

Са појавом нових системичних и контактних фунгицида, са механизмом деловања на појединачно циљно место (укључујући DMI и QoI фунгициде), значајно је порастао број случајева смањене или изгубљене осетљивости и унакрсне резистентности код различитих патогена (Shcherbakova, 2018). Brent and Hollomon, (2007) наводе да је разлог томе, што само једна мутација која мења једну ДНК-базу у циљном гену, може проузроковати промену циљног места, тако да постане много мање осетљиво на фунгицид (Brent and Hollomon, 2007). Истовремено, време потребно за појаву резистентних облика у многим случајевима се значајно скратило на свега две године након прве комерцијалне употребе (Shcherbakova, 2018). Brent and Hollomon, (2007) наводе да се управо код стробилурина, у року од две године након њиховог увођења, примећен значајан губитак ефикасности деловања против гљивичних обољења, као и развој високо отпорних популација патогена. QoI фунгициди се значајно разликују по својој системичном деловању (нпр. азоксистробин је изразито системичан, а трифлуксистробин готово несистемичан), па ипак су се сви суочили са проблемима резистентности код одређених патогена (Brent and Hollomon, 2007).

Према FRAC класификацији, ризик од појаве резистентности код стробилурина, оцењен је као умерен, односно висок. QoI фунгициди (стробилурини) представљају прву класу фунгицида која делује на протеин (цитохром  $bc_1$ ) кодиран митохондријалним геном. Shcherbakova, (2018) наводи да је брз развој резистентности на QoI-фунгициде последица чињенице да је убихинон-оксидаза кодирана митохондријском ДНК, која има слабије изражену способност поправке (репарације) у односу на нуклеарну ДНК, те су стога гени кодирани у митохондријама подложнији мутацијама. Учесталост промена ДНК база у митохондријској ДНК додатно је повећана због њене непосредне близине реактивним врстама кисеоника које настају током процеса дисања (Brent and Hollomon, 2007).

Brent and Hollomon, (2007) наводе да је код седамнаест патогена, висок степен резистентности (фактор резистентности обично већи од 100) према QoI фунгицидима, узрокован појединачном мутацијом (G143A). Код три патогена откривена је још једна појединачна мутација (F129L) – која углавном доводи до знатно нижег степена резистентности и не узрокује губитак контроле над болешћу, под условом да се поштују препоручене дозе (Brent and Hollomon, 2007). У новијим истраживањима наводи се и трећа мутација (G137R) која такође доводи до нижег степена резистентности према стробилуринима (Delgado *et al.*, 2012). Shcherbakova (2018) наводи да поред мутација, механизми адаптације, конкретно прекомерна експресија алтернативне оксидазе (АОХ) омогућава заобилажење респираторног комплекса III и доводи до смањења осетљивости према фунгицидима код патогена.

Молекуларна основа отпорности за овај механизам деловања први пут је идентификована од стране аутора Di Rago и сарадника 1989. године (Russell, 2004). Занимљиво је, да је у лабораторијским условима код квасаца и других микроорганизама, идентификовано једанаест различитих појединачних мутација на циљном месту (цитохром b) одговорних за резистентност патогена према QoI фунгицидима. Од тих једанаест, само две појединачне мутације (G143A; F129L) су се касније показале као значајне на терену код биљних патогена, након увођења фунгицида у употребу. Резистенција на QoI фунгициде, узрокована мутацијом G143A, први пут се појавила према проузроковачу пепелнице пшенице у северној Немачкој 1998. године, а иста мутација је од тада идентификована и у другим резистентним популацијама овог и других патогена широм света (Brent and Hollomon, 2007). FRAC наводи, да је могуће детектовати G143A мутације у популацијама гљива које никада нису биле изложене дејству QoI фунгицидима. Стога се чини да се ова мутација природно јавља у популацијама гљива, мада са ниском учесталости (Russell, 2004).

У случајевима када су познати молекуларни механизми резистенције и дефинисане појединачне мутације које их узрокују, могу се применити различите PCR технологије (ланчана реакција полимеразе), које постају начин за праћење резистенције код патогена. Праћење резистенције према QoI фунгицидима, готово у потпуности зависи од дијагностичких технологија заснованих на PCR-у, које су се показале способним да детектују појединачне мутације у пољским популацијама чак и при учесталости од свега 1 према 108. Препознавање промене једне аминокиселине

(G143A) у циљном протеину (цитохром b) за QoI фунгициде, пружио је подстицај за праћење резистенције на QoI, коришћењем алел-специфичне PCR методе у реалном времену (Brent and Hollomon, 2007).

FRAC је издао смернице за употребу QoI фунгицида како би се очувала ефикасност активних супстанци из ове групе и избегла појава резистентних популација патогена:

- Примењивати QoI фунгициде у ефикасним дозама и интервалима, у складу са препорукама произвођача.
- Ограничити укупан број примена у оквиру целокупног програма сузбијања болести, било да се примењују самостално или у смеши са другим фунгицидима.
- Смењивати примене QoI фунгицида (било самостално или у смеши, односно путем појединачних третмана или третмана у блоковима) са применом фунгицида из других група у погледу укрштене резистентности.
- Примена QoI фунгицида у блоковима мора се вршити искључиво у смеши са фунгицидом код којег не постоји укрштена резистентност (Brent and Hollomon, 2007).

### 2.5.2. "Ризик повезан са патогеном"

Различите класе патогена такође се разликују по својој способности да развију резистентност на фунгициде. У ризик који представља патоген укључени су бројни биолошки фактори, за које се сматра да делују заједно, адитивним механизмом. Већи ризик од патогена повезан је са краћим животним циклусом, обилнијом спорулацијом и брзим ширењем спора на велике удаљености. Ово се најбоље може назвати „инхерентним (или унутрашњим) ризиком повезаним са патогеном”, или краће – „ризиком патогена”. Велике разлике у ризику патогена могу се уочити између појединих класа, родова и врста биљних патогена (Brent and Hollomon, 2007). Проузроковач плаве трулежи *P. expansum* се одликује присуством средњег ризика од појаве резистентности (FRAC, 2024).

Brent and Hollomon, (2007) наводе најважније факторе који одређују ризик од патогена:

- животни циклус патогена (што је краће време генерације, то је чешћа потреба за применом фунгицида и брже се развија резистенција)

- интензитет спорулације (што се више спора ослобађа у усеву, то је већа доступност појединачних генома за мутацију и селекцију, а ширење резистентних мутаната је брже)
- способност спора да се шире између биљака, усева и региона.
- способност изазивања инфекције у свим фазама развоја усева, што захтева поновљене третмане фунгицидима.
- појава полне фазе у животном циклусу (то може погодовати развоју резистенције или га успорити)
- способност мутирања или испољавања мутантних гена (чини се да одређени патогени лакше стварају виталне мутанте од других)

Механизми развоја резистентности, подразумевају скуп, најчешће биохемијских промена, које резултирају променом осетљивости гљива на одређено једињење или групу једињења. У основи, постоје четири различита механизма развоја резистентности гљива на фунгициде: промена места деловања, детоксикација, хиперекспресија циљног места деловања и елиминација фунгицида (Стевић 2019). Brent and Hollomon, (2007) такође наводе механизме отпорности који се могу срести код патогена, укључући: промену биохемијског места деловања (тако да више није осетљиво); повећану производњу циљног протеина; развијање алтернативног метаболичког пута који заобилази циљно место деловања; метаболичка разградња фунгицида; искључивање или избацивање фунгицида путем АТП-азе зависних транспортних протеина.

Brent and Hollomon, (2007) наводи примарне механизме резистентности гљива према фунгицидима и указује да овај процес може бити нагао (последица мутације једног гена) или постепен (последица мутације више гена, сматра се полигеним).

Под утицајем селекционог притиска фунгицида може доћи до грешака у току репликације ДНК код патогена. Ове грешке познате су као мутације. Појединачне мутације доводе до промене у секвенци аминокиселина, које молекули фунгицида више не препознају као места деловања, што резултира значајним смањењем осетљивости на деловање фунгицида (Стевић 2019). Различито се назива „квалитативна“, „једностепена“, „дискретна“, „дисруптивна“ или „дисконтинуирана“ отпорност. Ову отпорност карактерише изненадни и изражени губитак ефикасности фунгицида уз присуство само потпуно резистентних популација, док форме са умереном резистентношћу изостају (долази до потпуног губитка ефикасности

фунгицида) Квалитативна резистентност се обично развија релативно брзо и са великом вероватноћом се јавља код фунгицида са деловањем на једно место (single-site фунгициди). Тај образац је карактеристичан за отпорност на неколико главних група фунгицида, укључујући бензимидазоле, фениламиде, дикарбоксимиде и QoI фунгициде (Brent and Hollomon, 2007).

Популације патогена са квалитативним типом резистентности могу се одржати само под условом да мутације гена не нарушавају виталност патогена. (Shcherbakova, 2018). Једном развијена, квалитативна отпорност тежи да буде стабилна, па тако популације патогена могу остати отпорне дуги низ година иако се смањи употреба тог фунгицида. Понекад може доћи до постепеног опоравка осетљивости, али се отпорност обично брзо враћа уколико се настави интензивна употреба фунгицида (Brent and Hollomon, 2007).

Различите промене у секвенци аминокиселина у циљном протеину могу довести до различитих нивоа резистенције. Мутација G143A (која доводи до замене глицина са аланином на позицији 143 у цитохрому b митохондријалног комплекса III) узрокује висок степен резистенције према QoI фунгицидима и последични губитак контроле над болешћу. Ређа мутација F129L (замена фенилаланина са леуцином на позицији 129 у цитохрому b) изазива само низак ниво резистенције код многих патогена према QoI фунгицидима, те је стога од малог практичног значаја, за разлику од мутације G143A (Стевић, 2019; Brent and Hollomon, 2007). У каснијим истраживањима, откривена је и трећа мутација G137R (која доводи до замене глицина са аргинином на позицији 137 у цитохрому b), која доводи до ниског нивоа резистенције (Delgado *et al.*, 2012). Поред мутација, механизми адаптације, као што је прекомерна експресија алтернативне оксидазе (AOX) омогућава заобилажење респираторног комплекса III и смањење осетљивости према фунгицидима код проузроковача обољења (Shcherbakova, 2018).

Брзи развој дијагностичких метода заснованих на PCR-у (ланчана реакција полимеразе) током протеклих година за откривање појединачних мутација које узрокују резистенцију, допринео је идентификацији механизма резистенције, посебно оних који укључују промене на циљном месту (Brent and Hollomon, 2007).

Са друге стране имамо постепено смањење осетљивости популација патогена. Ова врста отпорности се назива „квантитативна“, „вишестепена“, „континуирана“,

„усмерена“ или „прогресивна“ (Brent and Hollomon, 2007). Квантитативна отпорност може довести до отпорности на фунгициде са различитим механизмима деловања и довести до постојања облика са непотпуном отпорношћу у популацијама (смањена ефикасност фунгицида). Ово се постиже помоћу неколико механизма адаптације чији је ефекат усмерен на одржавање несмртоносних концентрација фунгицида у ћелији. Као механизми адаптације наводе се: јачање експресије гена ABC транспортера (протеина који уклањају молекуле токсичних супстанци из ћелије у екстрацелуларни простор; код неких фитопатогена, MFS-транспортери су такође укључени у овај процес), модификација плазматичних мембрана (смањена пропустљивост за фунгициде) и синтеза ензима који разлажу фунгицид или трансформишу његове молекуле у једињења која нису токсична за гљивицу (Shcherbakova, 2018). Осетљивост популација патогена се брзо враћа уколико се смањи употреба одређеног фунгицида. Сматра се да у основи „квантитативне“ резистенције која се развија у „више корака“ лежи, „полигени“ процес генетских промена, односно укључен је већи број различитих гена, од којих сваки има делимичан ефекат. Што више гена мутира у облике који узрокују резистенцију, то је виши степен резистенције (Brent and Hollomon, 2007).

### 2.5.3. Ризик повезан са условима употребе

Стварни ризик од појаве резистентности не зависи само од ризика одређене комбинације фунгицида и патогена, већ и од услова примене фунгицида (Brent and Hollomon, 2007).

Процена степена ризика од развоја резистентности мора узети у обзир све релевантне факторе, укључујући: инхерентни ризик (за сваку комбинацију фунгицид-патоген), услове животне средине и њихов утицај на учесталост појаве болести, као и релевантне агротехничке мере које треба да обухватају све специфичне стратегије примене фунгицида које препоручује произвођач. Таква процена ризика може бити само приближна, указујући на низак, средњи или висок ниво (Brent and Hollomon, 2007).

Као најважнији услови примене који утичу на ризик од развоја резистентности издвајају се:

- број узастопних примена фунгицида (што се чешће спроводи третман, то је бржа селекција мутаната),

- искључивост третмана (наизменична или комбинована примена са другим врстама фунгицида који имају другачије механизме деловања, може смањити тај ризик),
- Количина, или „доза“, фунгицида која се користи за сваку примену може утицати на ризик;
- Количине патогена изложених фунгициду; ако је учесталост болести релативно ниска, спорадична или нередовна из сезоне у сезону, унутар одређеног региона, онда се појава и селекција могућих отпорних мутаната смањује.
- Истовремена употреба интегралног управљања болестима (што је већа употреба нехемијских метода, као што су сорте отпорне на болести, ротација усева или хигијенске праксе које смањују притисак болести и тиме притисак селекције фунгицида)
- Изолација популација патогена (нпр. у пластеницима или полиетиленским тунелима), спречава поновни улазак осетљивих облика, што може фаворизовати развој отпорних популација (Brent and Hollomon, 2007)

Услови употребе могу се значајно разликовати између региона. Они обухватају факторе животне средине, посебно климатске и топографске услове који утичу на озбиљност и ширење болести усева, и низ агрономских фактора које одређују пољопривредници. Као и код других класа фунгицида, појава резистентних популација и с тим повезано смањење ефикасности QoI фунгицида значајно варирају у зависности од региона примене (Brent and Hollomon, 2007).

Ретка појава болести, на пример због неповољних климатских услова, ретке примене фунгицида или у ротацији или мешавини са другим врстама фунгицида, и истовремене употребе нехемијских мера за сузбијање болести, смањиће ризик од практичног развоја отпорности код патогена. Са друге стране велики број генерација годишње обилна спорулација, широко распрострањено ширење спора имају тенденцију да повећају ризик од отпорности (Brent and Hollomon, 2007).

Систематска оцена свих фактора ризика, укључујућу механизам деловања фунгицида, особине самог патогена и агрономске факторе, обезбеђује прецизну процену ризика од појаве резистентности. У циљу превазилажења ових проблема, постоји потреба увођења сталног мониторинга и утврђивања стања осетљивости патогена према фунгицидима у нашој земљи (Стевић, 2019).

#### 2.5.4. Мониторинг резистентности

Праћење (мониторинг) је од кључног значаја како би се утврдило да ли је резистентност узрок неуспеха у сузбијању болести и проверило да ли су стратегије управљања отпорношћу ефикасне (Brent and Hollomon, 2007).

Под мониторингом резистентности према фунгицидима подразумева се испитивање нивоа осетљивости циљаних патогена према одређеним фунгицидима. Праћење отпорности на фунгициде је кључно за одржавање ефикасности фунгицида са специфичним механизмом деловања према којима су патогени склони развоју отпорности, што се заснива на развоју алата за откривање популација патогена отпорних на фунгициде. (Luciano Rosario et al., 2020)

У сарадњи са FRAC, другим одборима за деловање против резистентности (Fungicide Resistance Action Committees), Европска организација за заштиту биља (EPPO или OEPP) израдила је Стандард за анализу ризика од резистентности (EPPO, 2002). Овим стандардом се препоручује достављање процене ризика од резистентности, а по потреби и података о почетном нивоу осетљивости („baseline sensitivity“ – базна осетљивост), предложене стратегије управљања резистентношћу, планова за праћење, као и примера декларације производа са одговарајућим информацијама о управљању резистентношћу (Brent and Hollomon, 2007).

Почетни ниво осетљивости популације патогена према фунгициду („baseline sensitivity“), конструисан је коришћењем биолошких или молекуларно биолошких техника за процену одговора претходно неизложених популација патогена на фунгицид. „Базна осетљивост“ је алат за успостављање и накнадно праћење стратегија управљања отпорношћу на фунгициде. У практичној употреби успоставља се референтна тачка за одређени (почетни) ниво осетљивости патогена према фунгициду. Популације патогена чији је одговор на примену фунгицида, ван основног одговора обично се сматрају „мање осетљивим“ или „отпорним“ на фунгицид (Russell, 2004).

Касније, током праћења ефикасности фунгицида, почетни ниво осетљивости служи као референтна тачка за процену развијања резистентности током комерцијалне употребе активне супстанце на терену. То се постиже узимањем узорака са подручја где се фунгицид примењује и спровођењем тестова осетљивости уз коришћење

истих протокола који су употребљени за утврђивање почетног нивоа осетљивости (Russell, 2004).

Утврђивање базне осетљивости применом поступака биолошког испитивања, подразумевало је употребу низа доза и процену реакције изолованих популација патогена на сваку од тих доза. Када се након праћења стања на терену, уоче одступања од базне осетљивости, услед чега се поједине популације класификују као резистентне, могуће је поједноставити поступак праћења употребом такозване дискриминативна концентрације пестицида.

Дискриминативна концентрација пестицида представља, ону концентрацију при којој је, на основу реакције изолат патогена, могуће утврдити да ли је тај изолат осетљив или резистентан на одређену активну супстанцу. У одређеним околностима могуће додатно поделити категорију „осетљивих” популација (нпр. на осетљиве и мање осетљиве) (Russell, 2004).

### 3. ЗАДАТАК И ЦИЉ РАДА

Препарати на бази активне супстанце трифлуксистробин су једни од најчешће коришћених фунгицида у циљу сузбијања плаве трулежи на плодовима јабуке у Р. Србији. С обзиром да су у свету потврђени случајеви резистентних популација *P. expansum*, као и да је уочена смањена ефикасност свих активних супстанци из групе стробилурина, укључујући и трифлуксистробин, задатак рада представља испитивање осетљивости изолата *P. expansum* према трифлуксистробину.

Циљ овог истраживања представља утврђивање осетљивости изолата *P. expansum*, проузроковача плаве трулежи плодова јабуке, према фунгициду на бази активне супстанце трифлуксистробин, на основу излагања концентрацији од 0,1 µg/ml, активне супстанце трифлуксистробина.

## 4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА

### 4.1. ПРИКУПЉАЊЕ ПЛОВОА СА СИМПТОМИМА ПЛАВЕ ТРУЛЕЖИ

За потребе истраживања прикупљани су плодови јабуке са симптомима плаве трулежи током 2020. и 2021. године из складишта на 11 локалитета Републике Србије. Плодови су сакупљани у складиштима из Мале Ремете, Таванкута, Јазка, Крчедина, Торњоша, Ариља, Ступчевића, Водња, Доброг Доа, Удовица и Луњевца.

Прикупљени плодови јабуке са симптомима плаве трулежи припадали су сортама: фуџи, златни делишес, црвени делишес, гала, ајдаред, грени смит и Red Jonaprince.

Пријем и анализа оболелих плодова спроводи се у лабораторији за фитопатологију, на Департману за фитомедицину и заштиту животне средине, на Пољопривредном факултету, Универзитета у Новом Саду.

### 4.2. ИЗОЛАЦИЈА ПАТОГЕНА И ФОРМИРАЊЕ КОЛЕКЦИЈЕ ИЗОЛАТА

Изолација патогена из заражених плодова јабуке са симптомима плаве трулежи вршена је стандардним фитопатолошким методама, у стерилним условима у коморама за изолацију. Плодови су првобитно површински дезинфиковани са 70% алкохолом, а затим су стерилним скалпелом пресечени по средини некрозе. Из унутрашњости плода, на месту преласка здравог у оболели део, узета су по три фрагмента ткива и пренешена у Петри кутију на хранљиву подлогу КДА (кромпир декстрозни агар). Петри кутије су инкубиране у мраку при температури од  $24 \pm 1$  °C.

Након седам дана, мицелија се јасно развила и могли смо видети са ког места у Петри посуди можемо изоловати чисту културу. Фрагменти колонија карактеристичног изгледа *P. expansum* пребачени су у нове Петри кутије ради добијања чистих култура. Пресејавање се вршило у стерилним условима, помоћу стерилне игле, тако што се са ивице колоније исече квадратић, при чему се захвата и мицелија и хранљива КДА подлога и пренесе у другу Петри посуду. Приликом пресејавања, мали фрагмент који је исечен се окреће тако да мицелија додирује хранљиву подлогу. Петри кутије су инкубиране у мраку при температури од  $24 \pm 1$  °C.

Моноспоријални изолати добијени су размазом суспензије конидија по површини хранљиве подлоге водени агар (2,5%) и након инкубације 16-18h при температури  $24 \pm 1$  °C у стерилним условима, под микроскопом су помоћу копљасте игле, исечени

појединачни фрагменти подлоге са по једном конидијом која клија и пренесени у нове Петри кутије са подлогом КДА.

Након 7 дана инкубације у мраку при температури  $24 \pm 1$  °C, формирана је колекција моноспоријалних изолата који се чувају у форми суспензије на температури 4 °C и који су коришћени у истраживању.

У експериментима су коришћене суспензије конидија изолата у стерилној дестилованој води са 0,05% Tween 20 ( $10^6$  конидија/ml). Суспензије су припремљене од колонија изолата са КДА подлоге након 7 дана инкубације при температури  $24 \pm 1$  °C.

#### 4.3.УТВРЂИВАЊЕ МОРФОЛОШКИХ КАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛАТА

Раст и морфолошке карактеристике изолата су процењене на начин који су описали Visagie *et al.* (2014) на следећим хранљивим подлогама: кромпир декстрозни агар (КДА), агар са екстрактом слада (Malt extract agar, MEA), Чапеков агар са екстрактом квасца (Czapeck yeast autolizate agar, CYA) и квашчев агар са сахарозом (Yeast extract agar, YES).

Инокулација за сваки изолат извршена је на 3 места у Петри кутији са по 1  $\mu$ l суспензије конидија ( $10^6$  конидија/ml) у три Петри кутије. Петри кутије су стављене на инкубацију у мраку у периоду од 7 дана на температури од  $24 \pm 2$  °C.



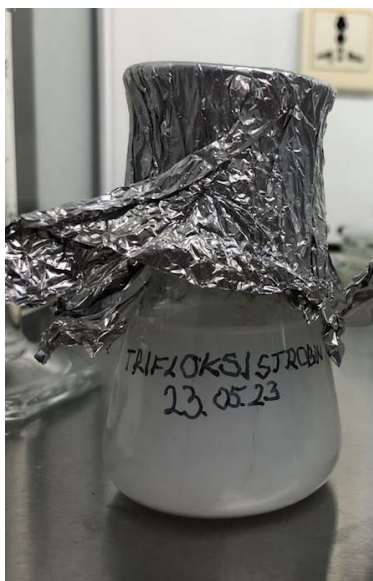
Слика 5. Инокулација Eppendorf пипетом на 3 места у Петри кутији  
(фото: Пузић, 2023)

Приликом оцењивања раста изолата, мерен је пречник колоније на најширем делу колоније, а за утврђивање морфолошких карактеристика, бележени су изглед лица и наличја колоније, боја и присуство ексудата.

#### 4.4. *IN VITRO* ТЕСТИРАЊЕ ОСЕТЉИВОСТИ КОЛЕКЦИЈЕ ИЗОЛАТА *P. EXPANSUM*

Оцењивање осетљивости изолата *P. expansum* заснивало се на поређењу пораста колонија код 36 изолата при развоју на: КДА подлози (контрола); КДА подлози уз додатак салицилхидроксамичне киселине (контрола + SHAM); КДА подлози која садржи активну супстанцу трифлуксистробин.

За утврђивање присуства резистентних изолата, коришћена је концентрација од 0,1ppm (0,1 µg/ml) трифлуксистробина, која је додавана у хранљиву подлогу. Активна супстанца трифлуксистробин била је у формулацији WG вододисперзибилних гранула концентрације 500g/kg. Како би се постигла концентрација трифлуксистробина од 0,1 µg/ml у хранљивој КДА подлози, у 300 ml хранљиве КДА подлоге додато је 6 µl препарата. Раствор фунгицида је додаван у стерилисану и прохлађену подлогу у стерилним условима.



Слика 6. Раствор фунгицида на бази активне супстанце трифлуксистробин  
(фото: Чоти, 2023)

Свака концентрација фунгицида је тестирана уз додатак 100 µg/ml салицилхидроксамичне киселине (SHAM) у подлогу. За негативну контролу у подлогу није додаван фунгицид, већ само салицилхидроксамична киселина у концентрацији 100 µg/ml.

У *in vitro* испитивањима се у подлогу додаје раствор салицилхидроксамичне киселине (salicylhydroxamic acid – SHAM), из разлога што гљиве у присуству

стробилурина у подлози имају способност коришећења алтернативне оксидазе (АОХ), што омогућава и осетљивим изолатима да остварују пораст мицелије на подлози са додатим фунгицидом. Ова киселина инхибира активност АОХ током испитивања осетљивости према стробилуринима, инхибирајући пораст мицелије осетљивих изолата, те се на тај начин открива само она резистентност која је узрокована мутацијом у цитохрому б. (Avila-Adame i Köller, 2002; Avila-Adame i Köller, 2003)

За сваки изолат *P. expansum* испитивана су 3 третмана:

- нетретирана контрола (само хранљива подлога КДА),
- контрола + SHAM (хранљива подлога уз додатак салицилхидроксамичне киселине, 100 µg/ml)
- трифлуксистробин 0,1 µg/ml

Инокулација за сваки третман извршена Еppendorf пипетом на 3 места (3 понављања) у Петри кутији, са по 1 µl суспензије конидија (концентрације  $10^6$  конидија/ml). Петри кутије су стављене на инкубацију у мраку у периоду од 7 дана на температури од  $25 \pm 1$  °C.

Након 7 дана инкубације у мраку на температури од  $25 \pm 1$  °C, лењиром су мерени пречници колонија. За свако понављање сваког третмана на колонијама *P. expansum* рачунат је просечан пречник колоније, тако што су мерена по 2 пречника колоније који се секу у средини колоније под правим углом.



Слика 7. Мерење пречника колонија изолата *P. expansum*

(фото: Пузић, 2023)

Просечне вредности пречника колонија сваког понављања сваког третмана су упоређиване како би се уочило присуство резистентних изолата *P. expansum*.

Израчунат је и проценат инхибиције пораста мицелије према формули:

$$\% \text{ инхибиције} = \frac{a - b}{a} \times 100$$

a = пречник колоније у третману: контрола + SHAM, b = пречник колоније у третману фунгицидом

Резултати огледа статистички су анализирани у програму STATISTICA 14.0.1.25 (TIBCO Software Inc) применом двофакторског ANOVA теста. За процену разлика које су се појавиле током тестирања група, коришћен је Post hoc Tukey HSD тест ( $P < 0,05$ ).

## 5. РЕЗУЛТАТИ

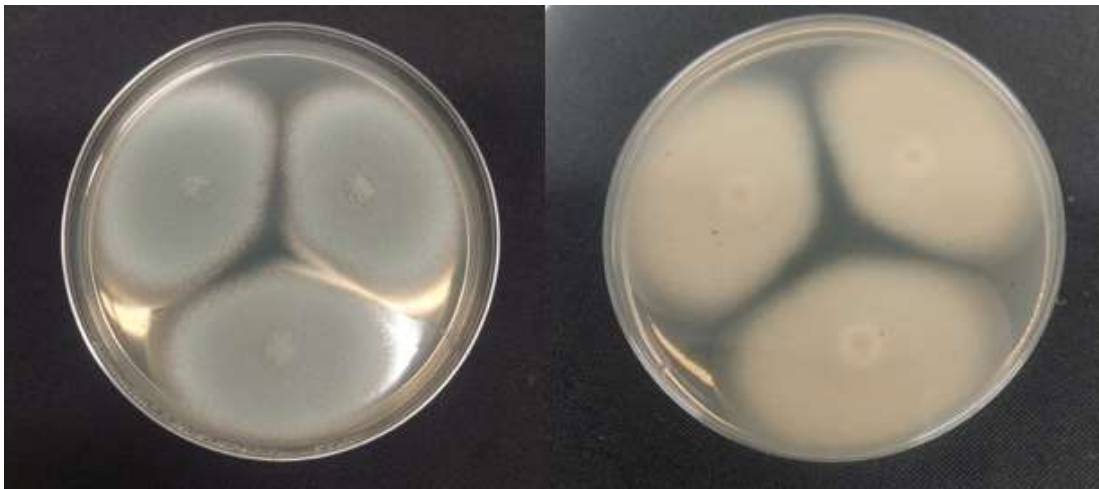
### 5.1. ПРИКУПЉАЊЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЈА ИЗОЛАТА *P. EXPANSUM*

Приликом испитивања сакупљених плодова јабуке са симптомима плаве трулежи извршене су фитопатолошке изолације. Тридесет шест изолата идентификовано је као *P. expansum* на основу морфолошких карактеристика колоније. Мицелија коју су формирали изолати била је плавкасте до зеленкасте боје. Микроскопским посматрањем уочено је присуство карактеристичних, округлих, једноћелијских конидија, које су формиране у низовима на сложено разгранатим пеницилусима. Добијени изолати су коришћени у даљим огледима.

### 5.2. УТВРЂИВАЊЕ МОРФОЛОШКИХ КАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛАТА

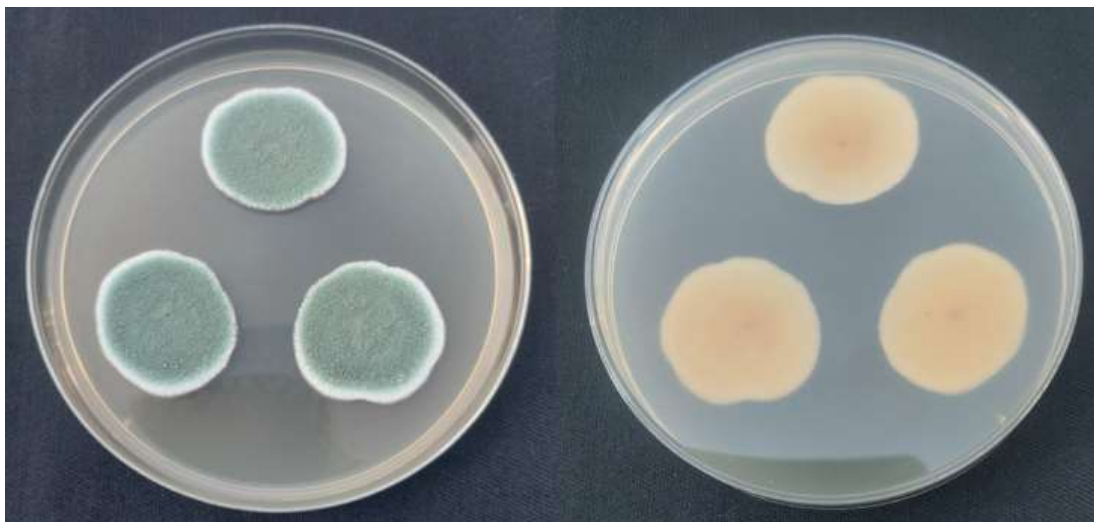
Изолати *P. expansum* формирали су белу мицелију са плаво-зеленим конидијама на свим подлогама.

На КДА, колоније су биле кружног, облика светло зелене боје, са правилним, равним рубом. Површина колонија била је уједначена, прашкаста. Није уочено присуство ексудата. Наличје колоније је било крем или жуте боје.

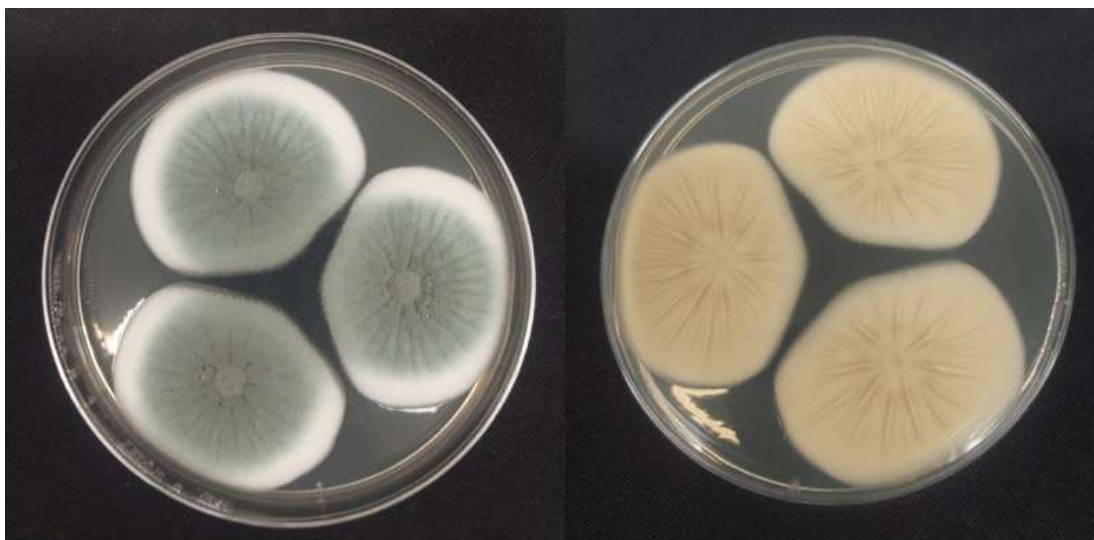


Слика 8. Изглед колоније *P. expansum* на КДА

На МЕА, колоније су биле кружног облика, благо радијално наборане, са правилним ивицама. Лице колонија било је баршунасто, зеленкасте боје услед интензивне спорулације. прозирним капљицама ексудата на ивицама. Наличје колоније је углавном било крем до жуте боје. Код појединих колонија уочено је присуство ситних капљица ексудата на површини.

Слика 9. Изглед колоније *P. expansum* на МЕА

На СYA, изолати *P. expansum* су, углавном, формирали густе кружне колоније, равне до благо испупчене са израженом концентричном зоналношћу. Боја колонија је била сивкасто зелена до светло зелена, зависно од изолата. Код појединих изолата је уочено присуство ексудата, у мањој или већој количини. Боја наличја колоније је варијала од крем, жућкасте, смеђе боје.

Слика 10. Изглед колоније *P. expansum* на CYA

На YES, колоније су биле кружног облика, сомотасте, радијално наборане са концентричним зонама. Боја колонија је варијала од светло зелене, сивкасто зелене до сиве са тамнијим централним делом. Наличје колонија је било жуто – наранџасто са интензивном пигментацијом у централном делу.

Слика 11. Изглед колоније *P. expansum* на YES

### 5.2.1. Утврђивање пречника колоније

Пораст колонија изолата *P. expansum* на различитим подлогама (КДА, МЕА, СУА, YES) приказан је у Табели 1. Велика варијабилност у порасту *P. expansum* изолата уочена је на свим хранљивим подлогама.

Просечна величина колоније изолата *P. expansum* на КДА била је 47,8 mm, међутим, најмање колоније развио је изолат P23 (просечна величина 34,2 mm), а највеће изолат P20 (55,7 mm). Када гледамо МЕА подлогу просечна величина колонија била је 27,39 mm. Сви изолати *P. expansum* најспорије су расли управо на МЕА подлози, међу којима је најспорије растао изолат P15 (23 mm), док је најбрже растао изолат P30 (35,3 mm). Што се тиче СУА подлоге, просечна величина колонија била је 44,3 mm. Изолати P23 и P24 формирали су најмање колоније (35 mm), а највеће изолат P2 (51,7 mm).

Најинтензивнији пораст свих изолата уочен је на хранљивој подлози YES, где је просечна величина колонија, била је 51,8 mm, најмање колоније формирао је изолат P33 (44,5 mm), а највеће колоније изолат P11 (60,8 mm) (табела 1).

Табела 1 Величина колонија изолата *P. expansum* на различитим хранљивим подлогама после 7 дана инкубације у мраку на температури  $24 \pm 2$  °C.(\*вредности означене истим словима су на истом нивоу статистичке значајности  $p < 0,05$ )

| Изолати | КДА  |    | MEA  |    | CYA  |    | YES  |    |
|---------|------|----|------|----|------|----|------|----|
| P1      | 50.7 | mn | 28.3 | c  | 45.5 | jk | 55.7 | op |
| P2      | 50.2 | m  | 26.8 | bc | 51.7 | n  | 52.0 | n  |
| P3      | 52.0 | n  | 25.7 | b  | 39.3 | gh | 51.2 | mn |
| P4      | 51.5 | mn | 25.2 | ab | 51.5 | mn | 54.7 | o  |
| P5      | 48.2 | l  | 31.2 | d  | 49.3 | lm | 53.5 | no |
| P6      | 47.3 | kl | 27.0 | bc | 48.0 | l  | 49.5 | lm |
| P7      | 48.2 | l  | 26.3 | b  | 41.5 | hi | 47.5 | kl |
| P8      | 44.0 | j  | 27.5 | bc | 38.7 | gh | 59.5 | q  |
| P9      | 52.2 | n  | 26.0 | b  | 47.8 | l  | 57.8 | pq |
| P10     | 53.7 | no | 25.2 | ab | 47.2 | kl | 59.8 | qr |
| P11     | 52.8 | no | 28.5 | c  | 45.8 | k  | 60.8 | r  |
| P12     | 52.0 | n  | 27.5 | bc | 46.2 | k  | 54.0 | no |
| P13     | 52.0 | n  | 26.8 | bc | 46.3 | k  | 56.7 | p  |
| P14     | 51.5 | mn | 28.7 | c  | 44.2 | j  | 52.7 | no |
| P15     | 36.7 | fg | 23.0 | a  | 35.5 | ef | 47.5 | kl |
| P16     | 49.7 | m  | 26.0 | b  | 41.2 | hi | 52.3 | n  |
| P17     | 39.5 | gh | 23.8 | a  | 36.2 | f  | 46.8 | kl |
| P18     | 48.3 | l  | 26.0 | b  | 46.7 | kl | 52.5 | n  |
| P19     | 37.2 | fg | 24.0 | a  | 35.7 | f  | 45.3 | jk |
| P20     | 55.7 | op | 35.0 | ef | 45.7 | k  | 59.0 | q  |
| P21     | 54.2 | o  | 32.0 | d  | 48.8 | l  | 62.5 | r  |
| P22     | 54.2 | o  | 31.3 | d  | 45.2 | k  | 49.2 | lm |
| P23     | 34.2 | e  | 24.2 | ab | 35.0 | ef | 45.8 | k  |
| P24     | 40.2 | h  | 23.2 | a  | 35.0 | ef | 45.2 | jk |
| P25     | 55.0 | o  | 23.8 | a  | 50.5 | m  | 52.0 | n  |
| P26     | 46.2 | k  | 27.8 | c  | 47.0 | kl | 50.3 | m  |
| P27     | 45.3 | jk | 26.8 | bc | 42.7 | ij | 51.3 | mn |
| P28     | 42.3 | i  | 27.3 | bc | 44.3 | j  | 46.8 | kl |
| P29     | 51.5 | mn | 24.0 | a  | 44.2 | j  | 51.2 | mn |
| P30     | 49.3 | lm | 35.3 | ef | 47.0 | kl | 50.7 | mn |
| P31     | 48.2 | l  | 24.2 | ab | 43.8 | j  | 51.5 | mn |
| P32     | 48.7 | lm | 28.5 | c  | 45.8 | k  | 53.0 | no |
| P33     | 42.0 | i  | 24.5 | ab | 43.7 | j  | 44.5 | j  |
| P34     | 48.2 | l  | 26.2 | b  | 44.8 | jk | 49.8 | m  |
| P35     | 48.3 | l  | 25.7 | b  | 51.5 | mn | 50.8 | mn |
| P36     | 52.7 | no | 25.5 | ab | 45.5 | jk | 49.2 | lm |

### 5.4. *IN VITRO* ТЕСТИРАЊЕ ОСЕТЉИВОСТИ КОЛЕКЦИЈЕ ИЗОЛАТА *P. EXPANSUM*

Осетљивост изолат *P. expansum* према трифлуксистробину 0,1 µg/ml приказана је у Табели 2.

Табела 2. Величина колонија и проценат инхибиције пораста колоније изолат *P. expansum* на хранљивим подлогама са 0, 1 µg/ml трифлуксистробина после 7 дана инкубације у мраку на температури  $25 \pm 1$  °C.

(\*вредности означене истим словима су на истом нивоу статистичке значајности  $p < 0,05$ )

|        | Пречник колоније (cm)                                    |     |                 |     |                      |     |                               |
|--------|----------------------------------------------------------|-----|-----------------|-----|----------------------|-----|-------------------------------|
| Изолат | Контрола                                                 |     | Контрола + SHAM |     | Трифлуксистробин 0,1 |     | % инхибиције пораста колоније |
| P1     | 4.1                                                      | lm  | 4.1             | lm  | 3.3                  | fg  | 20.08                         |
| P2     | 4.0                                                      | l   | 3.7             | ij  | 3.4                  | fg  | 8.56                          |
| P3     | 4.6                                                      | mn  | 4.8             | mn  | 3.4                  | fg  | 28.42                         |
| P4     | 4.9                                                      | n   | 4.6             | mn  | 4.0                  | l   | 13.77                         |
| P5     | 3.9                                                      | kl  | 4.0             | l   | 3.4                  | fg  | 15.00                         |
| P6     | 3.9                                                      | kl  | 3.8             | jk  | 2.9                  | cde | 24.02                         |
| P7     | 3.9                                                      | kl  | 3.9             | kl  | 3.3                  | fg  | 15.96                         |
| P8     | 3.8                                                      | jk  | 4.2             | m   | 3.6                  | hi  | 16.14                         |
| P9     | 4.2                                                      | m   | 4.2             | m   | 3.2                  | efg | 23.76                         |
| P10    | 4.1                                                      | lm  | 4.2             | m   | 3.4                  | fg  | 18.63                         |
| P11    | 4.0                                                      | l   | 4.1             | lm  | 2.7                  | c   | 34.98                         |
| P12    | 3.8                                                      | jk  | 3.8             | jk  | 2.9                  | cde | 23.48                         |
| P13    | 3.8                                                      | jk  | 3.9             | kl  | 3.5                  | gh  | 11.02                         |
| P14    | 3.9                                                      | kl  | 3.8             | jk  | 3.0                  | def | 21.05                         |
| P15    | 3.6                                                      | hi  | 3.7             | ij  | 2.9                  | cde | 20.09                         |
| P16    | 4.0                                                      | l   | 3.8             | jk  | 2.6                  | bc  | 31.11                         |
| P17    | 3.6                                                      | hi  | 3.6             | hi  | 2.6                  | bc  | 28.50                         |
| P18    | 3.5                                                      | gh  | 3.6             | hi  | 2.8                  | cd  | 21.86                         |
| P19    | 3.9                                                      | kl  | 3.7             | ij  | 3.1                  | def | 15.84                         |
| P20    | 3.8                                                      | jk  | 3.8             | jk  | 1.6                  | a   | 59.39                         |
| P21    | изолати су изостављени из истраживања због контаминације |     |                 |     |                      |     |                               |
| P22    | изолати су изостављени из истраживања због контаминације |     |                 |     |                      |     |                               |
| P23    | 3.2                                                      | efg | 3.2             | efg | 2.3                  | ab  | 26.98                         |
| P24    | 3.1                                                      | def | 3.2             | efg | 2.3                  | ab  | 29.69                         |
| P25    | 4.2                                                      | m   | 4.4             | m   | 3.5                  | gh  | 21.29                         |
| P26    | 3.5                                                      | gh  | 3.6             | hi  | 2.8                  | cd  | 23.50                         |
| P27    | 4.2                                                      | m   | 3.6             | hi  | 3.0                  | def | 16.90                         |
| P28    | 3.8                                                      | jk  | 3.7             | ij  | 2.4                  | b   | 33.33                         |
| P29    | 4.2                                                      | m   | 3.9             | kl  | 2.9                  | cde | 25.42                         |
| P30    | 4.5                                                      | mn  | 4.1             | lm  | 3.3                  | fg  | 21.37                         |
| P31    | 3.9                                                      | kl  | 4.1             | lm  | 1.7                  | a   | 58.70                         |
| P32    | 4.0                                                      | l   | 4.1             | lm  | 2.3                  | ab  | 45.12                         |
| P33    | 3.7                                                      | ij  | 3.2             | efg | 2.6                  | bc  | 19.59                         |

|     |     |    |     |    |     |     |       |
|-----|-----|----|-----|----|-----|-----|-------|
| P34 | 4.1 | lm | 4.1 | lm | 3.2 | efg | 23.17 |
| P35 | 3.8 | jk | 3.8 | jk | 3.3 | fg  | 12.72 |
| P36 | 4.2 | m  | 3.7 | ij | 3.5 | gh  | 4.98  |

Двофакторијална анализа варијансе показала је да и изолат и третман значајно утичу на величину колоније *P. expansum*, као и да постоје статистички значајне разлике између третмана ( $p < 0,05$ ).

У третману са трифлуксистрибином 0,1  $\mu\text{g/ml}$  ни за један изолат није постигнута инхибиција раста колонија од 100%, чак није забележена ни инхибиција раста од 80%, док је само код два изолата уочена инхибиција близу 60%.

Величина колоније у третману са трифлуксистрибином 0,1  $\mu\text{g/ml}$  кретала се у опсегу од 1,6 до 4 cm, док је у контроли била од 3,1 до 4,9 cm. У третману контрола + SHAM, величина колонија се кретала од 3,2 до 4,8 cm, што указује да SHAM (салицилхидроксамична киселина) нема значајног утицаја на развијање колонија патогена. Сличне вредности пречника колонија у контроли и у контроли са додатком SHAM-а, указују на то да инхибиција алтернативне оксидазе није значајно утицала на пораст колонија.

Најмања инхибиција раста колонија у третману са трифлуксистрибином 0,1  $\mu\text{g/ml}$  (4,98%) забележена је за изолат P36, док је највећи проценат инхибиције који је близу 60%, забележен код изолата P20 (59,39%) и P31 (58,70).

## 6. ДИСКУСИЈА

Од бербе до изношења на тржиште или употребе, плодови јабуке се чувају у складиштима краће или дуже време, током кога су често изложени нападу разних патогених микроорганизама (Тркуља и Баги, 2022). Један од најважнијих патогена након бербе јабучастих плодова широм света је *Penicillium expansum* који проузрокује плаву трулеж плодова. Развој плаве трулежи на ускладиштеним плодовима може довести до значајних економских губитака током складиштења, посебно код воћа намењеног за прераду, због производње канцерогеног микотоксина патулина (Vico *et al.*, 2014). Према подацима FRAC, врста *P. expansum* се налази на листи биљних патогена код којих постоји умерен ризик од појаве резистентности према фунгицидима. Samaras *et al.*, (2020) у својој студији потврђују постојање изолата *P. expansum* који испољавају вишеструку отпорност на више фунгицида који су коришћени за њихово сузбијање у воћњацима или објектима за паковање јабука.

Дугорочно складиштење, заједно са недостатком отпорности домаћина код јабуке, пружа ограничене могућности за управљањем плавом трулежи, осим ослањања на синтетичке фунгициде (Luciano Rosario *et al.*, 2020). Сузбијање плаве трулежи се за сада искључиво ослања на хемијске мере, односно на фунгициде који се могу се користити 7 до 14 дана пре бербе. У Србији су регистровани препарати на бази активне супстанце трифлуксистробин (каренца 14 дана), ципродинил + флудиоксонил (каренца 3 дана), флудиоксинил (каренца 3 дана), боскалид + пираклостробин (каренца 7 дана) (Тим припређивача, 2024).

Ризик од развоја отпорности често може проценити узимајући у обзир хемијску класу којој фунгицид припада. Ово се посебно односи на стробилурине, јер се развијена резистентност према било којој активној супстанци из групе QoI фунгицида, сматра релевантном и за трифлуксистробин, због унакрсне резистенције унутар групе FRAC11. Како је ризик од појаве резистенције код стробилурина оцењен као висок, доводи се у питање ефикасност трифлуксистробина (Brent and Hollomon, 2007).

Резистентност на стробилурине је последица три мутације у циљном протеину - цитохром b које узрокују различите нивое резистентности према QoI фунгицидима. Мутација G143A (која доводи до замене глицина са аланином на позицији 143 у цитохрому b), ређа мутација F129L (замена фенилаланина са леуцином на позицији

129 у цитохрому b) и такође ређа мутација G137R (замена глицина са аргинином на позицији 137 у цитохрому b) (Delgado *et al.*, 2012; Shcherbakova, 2018). Резистентност може бити и последица механизма адаптације, конкретно прекомерне експресије алтернативне оксидазе (АОХ) која омогућава заобилажење респираторног комплекса III (Shcherbakova, 2018). Међутим, Samaras *et al.* (2020) су спровели истраживање у ком су оцењивали осетљивост изолата *P. expansum* према више фунгицида, укључујући и пираклостробин. Приликом анализе резистентних изолата, нису пронађене циљне мутације G143A и F129L, уместо тога, резистенција је била последица повећане експресије MFS и ABC транспортера (Samaras *et al.*, 2020).

Резистенција према QoI фунгицидима (узрокована мутацијом G143A) први пут се појавила код проузроковача пепелнице пшенице *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* у северној Немачкој 1998. године, само две године након званичног увођења стробилурина у употребу. Убрзо су пријављени случајеви резистенције код и код других проузроковача обољења: проузроковач пегавости листа пшенице (*Mycosphaerella graminicola*), проузроковач пламењаче винове лозе (*Plasmopara viticola*), проузроковач чађаве краставости плодова јабуке (*Venturia inaequalis*) и проузроковач црне сигатокe, болести банана *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis* (Brent and Hollomon, 2007).

Резистентност према трифлуксистробину у Србији, пријављена је 2015. године код проузроковача сиве трулежи јагода *Botrytis cinerea* (син. *Botryotinia fuckeliana*). Анализа генетске основе резистентних изолата, показала је да је резистентност према трифлуксистробину и пираклостробину резултат мутације (G143A) која доводи до замене глицина са аланином (Тркуља, 2015).

Према ставу организације FRAC, одустајање фунгицида са специфичним механизмом деловања (тзв. single-site фунгициди) који носе висок или умерен ризик од развоја отпорности (укључујући стробилурине и триазоле) се не сматра оправданим, јер они обезбеђују веома ефикасно сузбијање широког спектра обољења (Shcherbakova, 2018).

Shcherbakova, (2018) истиче значај хемосензибилизације која се може постићи комбиновањем комерцијалног фунгицида са одређеном супстанцом која нема фунгицидно дејство или га има у занемарљивој мери, и то при концентрацијама при

којима ниједно од тих једињења самостално не би било ефикасно, док се њиховом заједничком применом постиже синергистички фунгицидни ефекат. Примена фунгицида у комбинацији са сензибилизаторима не доприноси селекцији резистентних популација патогена, а истовремено смањује негативан утицај на животну средину снижавањем ефективних доза фунгицида. Ово указује на то да би примена приступа хемосензибилизације у оквиру интегрисане заштите усева могла учинити мере заштите економичнијим и успешнијим, између осталог и у борби против резистентних облика фитопатогених гљива (Shcherbakova, 2018).

Biyüklioğlu et al., (2026) су истраживали могућност развијања фунгицида са двоструким дејством који комбинују SDHI фунгициде (инхибиторе сукцинат-деhidрогеназе) и QoI фунгициде (стробилурине), уз примену микробиолошких биофунгицида, чиме се повећава афинитет везивања фунгицида за циљна места код патогена, побољшава инхибиторна активност и одржава ефикасност против резистентних популација. Развој и употреба SDHI-стробилуринских фунгицида са двоструким дејством, у комбинацији са добром пољопривредном праксом, представљају добру стратегију за очување усева уз истовремено одлагање развоја резистенције код патогена, минимизирање негативног утицаја на животну средину и јавно здравље (Biyüklioğlu et al., 2026).

Осетљивост изолата *P. expansum* који су испитивани у овом истраживању се кретала у распону 4,98% - 59,39% инхибиције пораста мицелије, при концентracији 0,1 µg/ml трифлуксистеробина. Ни за један изолат *P. expansum* није постигнута инхибиција раста колонија од 100% или 80%, док је само код два изолата уочена инхибиција близу 60%. Ови резултати показују велику вероватноћу за постојање резистентних популација *P. expansum* према трифлуксистеробину у Р. Србији. Како би се добили прецизнији подаци о осетљивости популације *P. expansum*, потребно је да се испитивања спроведу на ширем спектру концентрација трифлуксистеробина.

С обзиром на резултате истраживања Samaras et al. (2020) о постојању унакрсне резистентности изолата *P. expansum* према фунгицидима из других хемијских група који се користе за сузбијање патогена јабуке, као и наводе Brent and Hollomon, (2007) о израженом смањеном ефикасности стробилурина уз потврђену унакрсну резистентност код патогена, на све активне супстанце из групе QoI фунгицида, намеће се потреба за даљим испитивањима осетљивости изолата *P. expansum* према трифлуксистеробину у циљу откривања резистенције.

## 7. ЗАКЉУЧАК

- Плодови јабуке са симптомима плаве трулежи сакупљани су током 2020. и 2021. године из складишта на 11 локалитета Републике Србије. Након фитопатолошких изолација, тридесет шест изолата идентификовано је као *P. expansum* на основу морфолошких карактеристика колоније.
- Велика варијабилност у порасту *P. expansum* изолата уочена је на свим хранљивим подлогама. Просечна величина колоније изолата *P. expansum* на КДА била је 47,8 mm, док су сви изолати *P. expansum* најспорије расли на МЕА подлози, где је просечна величина колонија била 27,39 mm. Што се тиче СУА подлоге, просечна величина колонија била је 44,3 mm. Најинтензивнији пораст свих изолата уочен је на хранљивој подлози YES, где је просечна величина колонија, била је 51,8 mm.
- Тестирањем осетљивости изолата *P. expansum* према трифлуксистеробину (0,1 µg/ml), двофакторијална анализа варијансе показала је да и изолат и третман значајно утичу на величину колоније *P. expansum*, као и да постоје статистички значајне разлике између третмана ( $p < 0,05$ ).
- У третману са трифлуксистеробином 0,1 µg/ml ни за један изолат није постигнута инхибиција раста колонија од 100% или 80%, док је само код два изолата уочена инхибиција близу 60%.
- Величина колоније у контроли се кретала од 3,1 до 4,9 cm, док је у третману контрола + SHAM, величина колонија била од 3,2 до 4,8 cm, што указује да SHAM (салицилхидроксамична киселина) нема значајног утицаја на развијање колонија патогена.
- Најмања инхибиција раста колонија у третману са трифлуксистеробином 0,1 µg/ml (4,98%) забележена је за изолат P36, док је највећи проценат инхибиције који је близу 60%, забележен код изолата P20 (59,39%) и P31 (58,70).
- Осетљивост изолата *P. expansum* који су испитивани у овом истраживању се кретала у распону 4,98% - 59,39% инхибиције пораста мицелије, при концентрацији 0,1 µg/ml трифлуксистеробина. Ови резултати показују велику вероватноћу за постојање резистентних популација *P. expansum*. Како би се добили прецизнији подаци о осетљивости популације, потребно је да се испитивања спроведу на ширем спектру концентрација трифлуксистеробина.

## 8. ЛИТЕРАТУРА

1. Avila-Adame, C. i Köller, W. (2002): Disruption of the alternative oxidase gene in *Magnaporthe grisea* and its impact on host infection. *Molecular plant-microbe interactions*, 15(5), 493-500.
2. Avila-Adame, C. i Köller, W. (2003): Characterization of spontaneous mutants of *Magnaporthe grisea* expressing stable resistance to the Qo-inhibiting fungicide azoxystrobin. *Current genetics*, 42(6), 332-338.
3. Baert, K., Devlieghere, F., Flyps, H., Oosterlinck, M., Ahmed, M., M., Rajković, Andreja, Verlinden, B., Nicolai, B., Debevere, J., De Meulenaer, B. (2007) Influence of storage conditions of apples on growth and patulin production by *Penicillium expansum*. *International Journal of Food Microbiology* 119, 170 – 181.
4. Büyüklüoğlu, O., Monajjemi, M., Mollaamin, F., Çeter, T. (2026) Necessity of Merging Dual-Action SDHI and Strobilurin Fungicides with Microbial Bio-Fungicides to Counter Genetic Resistance: A Molecular Docking Study. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 16 (3).
5. Бранковић, Д., Милица (2022) Развој и примена прелиминарних скрининг метода за процену садржаја резидуалних пестицида у јабукама техникама масене спектрометрије. Докторска дисертација
6. Brent, K. J., Hollomon, D. J. (2007): Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed. FRAC Monograph No.1. Brussels, Belgium: Fungicide Resistance Action Committee.
7. Brent, K. J., Hollomon, D. J. (2007): Fungicide resistance: The assessment of risk. FRAC Monograph No.2. second, (revised) edition, Brussels, Belgium: Fungicide Resistance Action Committee.
8. Vico, Ivana, Duduk, Nataša, Vasić, M., & Nikolić, Milica (2014): Identification of *Penicillium expansum* causing postharvest blue mold decay of apple fruit. *Pesticidi i fitomedicina*, 29(4), 257-266.
9. Visagie, C. M., Houbaken, 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 Mycology*, 78, pp.343-371.
10. Влаховић, Б., Пушкарић, А., Величковић, С. (2015): Извоз јабуке Републике Србије – Стање и тенденције. *Агроекономика*, 44(65), 10-21.

11. Вукотић, Јелена, Стојшин, Вера, Граховац, Мила, Петреш, М., Будаков, Драгана, Михајловић, Милица, Хрустић, Јована, Пешић, Бранкица (2025) Биково око – обољење ускладиштених плодова јабуке. Воћарство, 59, стр. 45-54.
12. Граховац, М., Инђић, Д., Тановић, Б., Лазић, С., Вуковић, С., Хрустић, Ј., Гвозденац, С. (2011): Интегрална заштита јабука од проузроковача трулежи у складиштима. Пестициди и фитомедицина, 26(4), 289-299.
13. Gisi, U., Chin, K., M., Knapova, G., Kung, Farber, R., Mohr, U., Parisi, S., Sierotzki, H., Steinfeld, U., (2000) Recent developments in elucidating modes of resistance to phenylamide, DMI and strobilurin fungicides. Novartis Crop Protection, Research Biology (19), 863-872.
14. Дудаш, Т., Тодић, А., Будаков, Д., Граховац, М., Лоц, М., Стојшин, В. (2022): *Penicillium spp.*, Проузроковачи плаве трулежи ускладиштених плодова јабуке. Биљни лекар, 50(2).
15. Delgado, J., A., Lynnes, T., C., Meinhardt, S., W., Wise, K., A., Gudmestad, N., C., Bradley, C., A., Markell, S., G., Goswami, R., S. (2012) Identification of the mutation responsible for resistance to QoI fungicides and its detection in *Ascochyta rabiei* (teleomorph *Didymella rabiei*). Plant Pathology, 62 (3), 688-697.
16. Ђуровић, Д., Миливојевић, Јасминка, Ђорђевић Б., Милатовић, Д., Радивојевић Д., Опарница, Ч., Зец, Г., Николић, Д., Фотирић, Акшић, Милица, Кесеровић, З., Магазин, Н., Бијелић, Сандра, Љубојевић, Мирјана, Пешаковић, Маријана, Вујовић, Тања, Марић, Слађана, Глишић, Ивана, Радичевић, Сања (2024) Стање и перспектива развоја воћарства у Републици Србији. 17. Конгрес воћара и виноградара Србије са међународним учешћем, Вршац
17. Kader, A. A. (2013): Postharvest Technology of Horticultural Crops – An Overview from Farm to Fork. Ethiopian Journal of Applied Science and Technology (No.1): 1- 8
18. Кесеровић, З., Милић, Бисерка, Магазин, Н., Радивојевић, Д., Милатовић, Д., Миливојевић, Јасминка, Опарница, Ч., Лепосавић, А., Радичевић, Сања (2022) Стање и перспективе производње воћа у Републици Србији. 16. Конгрес воћара и виноградара Србије са међународним учешћем, Врдник

19. Кесеровић, З., Врачевић, Б., Магазин, Н., Гвозденовић, Д., (2008) Утицај хемијског проређивања на квалитет плодова и потенцијалну родност јабуке. Зборник научних радова, 14(5).
20. Колектив аутора (2022): Пестициди у пољопривреди и шумарству у Србији. Изд. Друштво за заштиту биља. 1-700.
21. Luciano-Rosario, D., Keller, N. P., Jurick, W. M. (2020): *Penicillium expansum*: biology, omics, and management tools for a global postharvest pathogen causing blue mould of pome fruit. *Molecular Plant Pathology*, 21: 1391– 1404.
22. Magazin, N., Milić, Biserka, Keserović, Z. (2022): Production and assortment of apple in Serbia. *Biljni lekar*, 50(6), 411-426.
23. Muder, A., Garming, H., Dreisiebner-Lanz, S., Kerngast, K., Rosner, F., Kličková, K., Kurthy, G., Cimer, K., Bertazzoli, A., Altamura, V., De Ros, G., Zmarlicki, K., de Belém Costa Freitas, M., Duarte, A., Bravin, E., Kambor, J., Karamürsel, D., Pinar Öztürk, F. and Kaçal, E. (2022) Apple production and apple value chains in Europe. *European journal of horticultural science*. DOI:10.17660/eJHS.2022/059
24. Morales, H., Sanchis, V., Rovira, A., Ramos, A.J., Marin, S. (2007): Patulin accumulation in apples during postharvest: Effect of controlled atmospheres and fungicide treatments. *Food Control*, 18, 1443–1448.
25. Patočka, J., Bhardwaj, K., Klimova, B., Nepovimova, E., Wu, Q., Landi, M., Kuca, K., Valis, M., Wu, W. (2020) *Malus domestica*: A Review on Nutritional Features, Chemical Composition, Traditional and Medicinal Value. *Journal Plants*, 9 (11).
26. Пашалић, Б. (2009) Технологија складиштења јабучастог воћа. Зборник радова II Саветовања ”Иновације у воћарству”, Београд, 79-93.
27. Рабић, Белкиса (2025) Заштита јабука у складиштима. Пољопривредна саветодавна и стручна служба Нови Пазар, Билтен 155, четврти квартал 2025.
28. Russell, P.E. (2004): Sensitivity baselines in fungicide resistance research and management. FRAC Monograph No. 3. Crop Life International, Brussels, Belgium.
29. Samaras, A., Ntasiou, P., Myresiotis, C., Karaoglanidis, G. (2020): Multidrug resistance of *Penicillium expansum* to fungicides: whole transcriptome analysis of MDR strains reveals overexpression of efflux transporter genes. *International Journal of Food Microbiology*, 335, 108896.
30. Седлар, А., Радојчин, Д., Вишацки, В., Бугарин, Р., Туран, Ј., Поњичан, О., (2017) Послеубирајуће технологије производње јабуке: Основа напредног воћарства. *Савремена пољопривредна техника*, 43(2), 53-62.

31. Стевановић, Снежана, Марковић, Д., Милованчевић, У., Отовић, Милена (2022) Утицај чувања у контролисаној атмосфери на квалитет плодова јабуке. Зборник радова 35. Међународни конгрес о процесној индустрији, Београд, 55-59.
32. Стевановић, Снежана, Радојевић, Р., Коси, Ф., Марковић, Д., Симоновић, В., Милованчевић, У. (2015): Оптимални режим за складиштење јабуке у ULO хладњачама. Зборник 46. Међународног конгреса о КГХ, Београд, 170-176.
33. Стевић, М. (2019) Резистентност гљива на фунгициде. У: Шкорић, Д. и Анђелковић, М. (уредници) Коришћење пестицида у биљној производњи и заштита животне средине, књига 16, VIII Скуп Одељења хемијских и биолошких наука, Београд, стр. 181 – 195.
34. Shcherbakova, L., A. (2019) Fungicide resistance of plant pathogenic fungi and their chemosensitization as a tool to increase anti-disease effects of triazoles and strobilurines. *Agricultural biology*, 54 (5), 875 – 891.
35. Schirra, M., D'aquino, S., Palma, A., Angioni, A., Cabras, P., Migheli, Q. (2006) Residues of the Quinone Outside Inhibitor Fungicide Trifloxystrobin after Postharvest Dip Treatments To Control *Penicillium* spp. on Citrus Fruit. *Journal of Food Protection*, 69 (7), 1646-1652.
36. Тим приређивача (2024) Пестициди у пољопривреди и шумарству у Србији. Двадесет друго, измењено и допуњено издање, Друштво за заштиту биља Србије, Београд.
37. Тркуља, В., Баги, Ф. (2022): Патогени ускладиштених плодова јабуке. *Биљни лекар*, 50(6), 462-492.
38. Trkulja, N., Dolovac, E., Milosavljević, A., Bošković, J., Jović, J., Mitrović, M. and Toševski, I. (2015) First Report of QoI Resistance in *Botrytis cinerea* Isolates Causing Gray Mold in Strawberry Fields in Serbia. *Plant Disease*, 100 (1).
39. FAO. Code of Practice for the Prevention and Reduction of Patulin Contamination in Apple Juice and Apple Juice Ingredients in Other Beverages; In CAC/RPC; FAO: Rome, Italy, 2003; Volume 50, pp. 1–6.
40. FRAC (Fungicide Resistance Action Committee), 2024. Pathogen risk list. <https://www.frac.info/>.

Интернет адресе коришћене у раду:

<https://www.fao.org/home/en>.