OSETLJIVOST PROUZROKOVAČA PLAVE TRULEŽI PLODOVA JABUKE (*Penicillium expansum*) PREMA FLUDIOKSONILU

Vojin Puzić, Tatjana Dudaš, Mila Grahovac, Slavica Vuković, Marta Loc, Mladen Petreš, Dragana Budakov

Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet
E-mail: vojin.puzic@polj.edu.rs

Izvod

Plava trulež, prouzrokovana gljivama iz roda Penicillium, predstavlja jedno od najznačajnijih oboljenja uskladištenih plodova jabuke. Među vrstama koje prouzrokuju pojavu plave truleži, najzastupljenija je vrsta *P. expansum*. Prouzrokovači plave truleži dovode do propadanja plodova, a produkuju i mikotoksine koji narušavaju zdravstvenu bezbednost plodova. Usled ukidanja sve većeg broja dozvoljenih aktivnih supstanci sa tržišta, dolazi do izlaganja populacije patogena uskom krugu mehanizama delovanja fungicida, te je prisutan rizik od pojave rezistentnosti. S obzirom da su fungicidi na bazi aktivne supstance fludioksonil najčešće korišćeni u zaštiti od prouzrokovača plave truleži plodova jabuke u Republici Srbiji, u ovom radu je ispitana osetljivost 65 izolata *P. expansum* koji vode poreklo iz različitih skladišta jabuke u R. Srbiji. Nakon determinacije vrste kojoj pripadaju izolati, ispitana je osetljivost populacije *P. expansum* merenjem porasta micelije pri izlaganju koncentracijama od 0,5 i 1 µg/ml fludioksonila u hranljivoj podlozi. Rezultati ovog rada ukazuju na postojanje populacija *P. expansum* sa smanjenim nivoom osetljivosti prema aktivnoj supstanci fludioksonil u R. Srbiji.

Ključne reči: jabuka, *Penicillium expansum*, plava trulež, rezistentnost, fludioksonil

UVOD

Globalno gledano, domaća jabuka (*Malus domestica* L.) predstavlja jednu od najznačajnijih voćnih vrsta (Kljajić i Vuković, 2014; Bramel i Volk, 2019) i smatra se najznačajnijom vrstom u okviru roda Malus (Keserović i sar., 2016). Plodovi jabuke se, prvenstveno, konzumiraju sveži, ali su i vrlo značajna sirovina u prerađivačkoj industriji i industriji hrane (Petreš i sar., 2022). Od ukupne proizvodnje, oko 2/3 jabuke u R. Srbiji konzumira se u svežem stanju. Da bi se zadovoljile potrebe tržišta, postoji potreba za dužim čuvanjem plodova jabuke u svežem stanju, te se plodovi čuvaju u hladnjačama (Stevanović i sar., 2015;

Keserović i sar., 2016). Međutim, tokom skladištenja plodovi jabuke mogu da budu izloženi napadu mnogobrojnih patogena, koji na njima mogu da prouzrokuju značajne ekonomske štete (Trkulja i Bagi, 2022). Godišnji gubici u proizvodnji jabuke koji se javljaju kao posledica delovanja patogena u periodu nakon branja se u zemljama u razvoju procenjuju na 20-50%, dok se u razvijenim zemljama procenjuju na 5-35% (Porat i sar., 2018). Do sada je opisano više od 90 gljivičnih patogena koji mogu da prouzrokuju štete na plodovima za vreme skladištenja jabuke (Leibinger i sar., 1997). Prema Trkulja i Bagi (2022) neki od najznačajnijih prouzrokovača truleži uskladištenih plodova jabuke u R. Srbiji su fitopatogene vrste: *Penicillium* spp., *Botrytis cinerea*, *Monilinia* spp., *Colletotrichum* spp., *Neofabraea* spp., *Botryosphaeria obtusa*, *Mucor pyriformis* i dr.

Mnogobrojni autori posebno ističu značaj vrsta iz roda *Penicillium*, koje su odgovorne za pojavu simptoma plave truleži – *P. expansum, P. crustosum, P. solitum, P. digitatum, P. chrysogenum, P. commune, P. verrucosum i P. regulosum* (Habib i sar., 2021). Plava trulež širom sveta predstavlja jedno od najznačajnijih oboljenja plodova jabuke u periodu nakon berbe (Trkulja i sar., 2020). Thomidis i Prodromou (2020) su u svom istraživanju sprovedenom u Grčkoj utvrdili da su vrste iz roda *Penicillium* odgovorne za 78%, odnosno 84% simptoma truleži plodova jabuke u periodu nakon branja u 2016, odnosno 2017. godini. Prema procenama Luciano-Rosario i sar. (2020) godišnji gubici u SAD (Sjedinjene Američke Države) prouzrokovani pojavom plave truleži iznose 50-250 miliona dolara. Prouzrokovači plave truleži dovode do propadanja plodova jabuke, kao i kontaminacije plodova mikotoksinima (Morales i sar., 2007). Među mikotoksinima koje produkuju vrste iz roda *Penicillium*, najvažniji i najčešći je patulin, koji ima izraženo toksično i potencijalno kancerogeno dejstvo (Puel i sar., 2010).

Simptome plave truleži karakteriše pojava kružnih, vodenastih pega mrkožute boje koje se šire, kako po površini, tako i prema unutrašnjosti ploda, dok se između obolelog i zdravog tkiva ploda uočava jasna granica. U uslovima povoljnim za razvoj gljiva sporuliše, obrazujući masu plavo-zelenih konidija, što je karakteristično za kasnije faze zaraze. Zaraženi plodovi se prepoznaju po karakterističnom zemljanom, plesnjivom, ustajalom mirisu (Trkulja, 2003; Ivanović i Ivanović, 2017).

Prouzrokovači plave truleži smatraju se patogenima rana, te zarazu vrše preko rana koje nastaju u polju, u toku berbe ili u procesu manipulacije i skladištenja plodova (Grahovac i sar., 2011; Wenneker i Thomma, 2020). U epidemiologiji gljiva iz roda *Penicillium* najveći značaj imaju konidije. Konidije predstavljaju primarni izvor inokuluma i mogu da se pronađu u zemljištu, u organskim ostacima, na kori drveta, na plodovima, u vazduhu, vodi i na zidovima hladnjača (Sutton i sar., 2014). Konidije su okrugle, jednoćelijske, prečnika 4,5-5 μm, a formiraju se u nizovima na složeno razgranatim konidioforima koje se nazivaju penicilusi (Dudaš i sar., 2022).

Među vrstama roda *Penicillium* koje napadaju plodove jabuke i drugih jabučastih voćaka, posebno je važna vrsta *P. expansum*. Ova vrsta je, prema mišljenju mnogobrojnih autora, najčešći i ekonomski najznačajniji prouzrokovač plave truleži (Zhong i sar., 2018; Luciano-Rosario i sar., 2020; Habib i sar., 2021). U istraživanjima Amiri i Bompeix (2005) i Habib i sar. (2021) vrsta *P. expansum* se ističe kao najzastupljenija vrsta roda *Penicillium* na obolelim uskladištenim plodovima jabuke. Trkulja i sar. (2020) ukazuju na polifagnost vrste *P. expansum*, koja u prirodi, osim plodova jabuke, napada i plodove narandže, limuna, mandarine, jagode, breskve, paradajza, krastavca, luka i mnogih drugih voćnih i povrtarskih biljnih vrsta. Gljiva *P. expansum* se odlikuje prisustvom srednjeg rizika od pojave rezistentnosti (FRAC, 2024). Faktori koji doprinose riziku od pojave rezistentnosti kod *P. expansum* su kratak životni ciklus patogena, kao i veliki kapacitet sporulacije (Baraldi i sar., 2003). Podaci velikog broja naučnika govore o smanjenoj osetljivosti populacija fitopatogene gljive *P. expansum* prema različitim fungicidima, kao i fludioksonilu (Karaoglanidis i sar., 2011; Gaskins i sar., 2015; Amiri i sar., 2017; Samaras i sar., 2020).

Upotreba fungicida već dugo predstavlja najznačajniji i najčešći metod borbe protiv skladišnih patogena, pa tako i protiv pojave prouzrokovača plave truleži. Plava trulež se u proizvodnoj praksi kontroliše primenom fungicida koji su registrovani za suzbijanje većeg broja prouzrokovača truleži plodova u skladištima, aplikacijom u polju najkasnije 7-14 dana pre berbe (Kolektiv autora, 2022). Za razliku od pojedinih delova sveta, u R. Srbiji nijedan od preparata nije registrovan za tretiranje plodova posle berbe (Sekulić i Jeličić, 2011). Zbog evropskih regulativa koje se primenjuju i u R. Srbiji, Uprava za zaštitu bilja (Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede R. Srbije) revidira listu dozvoljenih aktivnih supstanci, zbog čega dolazi do smanjenja broja dostupnih fungicida. Sve se manji broj aktivnih supstanci primenjuje za suzbijanje prouzrokovača plave truleži plodova jabuke, što za posledicu ima izlaganje populacije patogena uskom krugu mehanizama delovanja fungicida, te postoji rizik od pojave rezistentnosti. U našoj zemlji su registrovani fungicidi na bazi aktivnih supstanci: tiofanat-metil, fludioksonil, tebukonazol, fluopiram, boskalid, piraklostrobin, ciprodinil, trifloksistrobin (Kolektiv autora, 2022). U R. Srbiji su preparati na bazi aktivne supstance fludioksonil najčešće korišćeni fungicidi u zaštiti od prouzrokovača plave truleži plodova jabuke (Ivanović i Ivanović, 2017). Prema podacima FRAC fludioksonil je svrstan u grupu E2, kod koje postoji nizak do srednji rizik od nastajanja rezistentnosti.

Prema definiciji FAO, rezistentnost predstavlja pojavu opadanja reakcije životinjskih i biljnih vrsta i biljnih patogena na pesticide ili druge agense, koja nastaje kao posledica njihove upotrebe. Rezistentnost se javlja kao rezultat mutacije genetičkog materijala patogena, te je nasledna (Brent i Hollomon, 2007). Prema Bagi i sar. (2012), poljska rezistentnost gljiva prema fungicidima se zapaža u trenutku kada se očekivani nivo zaštite od bolesti ne ostvaruje preporučenom dozom fungicida. Zbog pojave rezistentnosti, troškovi suzbijanja štetnih

organizama u svetu povećani su za par stotina miliona dolara godišnje (Janjić i sar., 2020). Monitoring predstavlja ključan deo u proučavanju rezistentnosti. Pod monitoringom rezistentnosti prema fungicidima podrazumeva se ispitivanje nivoa osetljivosti ciljanih patogena prema određenim fungicidima. Na osnovu monitoringa se može predvideti prelaz populacije patogena ka rezistentnosti i intezivno otpočeti sa primenom antirezistentne strategije u cilju njenog odlaganja (Brent i Hollomon, 2007). Kako bi se utvrdilo da li je određeni izolat fitopatogene gljive rezistentan na određen fungicid često se koristi diskriminativna koncentracija (Russell, 2004). Russell (2004) definiše diskriminativnu koncentraciju pesticida kao onu koncentraciju na osnovu koje je moguće utvrditi koji izolat patogena je osetljiv na određenu aktivnu supstancu, a koji je rezistentan. Kako bi zaštita jabuke od prouzrokovača plave truleži plodova bila što efikasnija, neophodno je sprovoditi monitoring osetljivosti populacije patogena prema fludioksonilu, kao i drugim dominantno korišćenim aktivnim supstancama (Kolektiv autora, 2022).

Cilj ovog rada bilo je utvrđivanje osetljivosti izolata *P. expansum*, prouzrokovača plave truleži plodova jabuke, prema fungicidu na bazi aktivne supstance fludioksonil, na osnovu izlaganja diskriminativnoj koncentraciji aktivne supstance (0,5 μg/ml), kao i koncentraciji od 1 μg/ml.

MATERIJAL I METOD RADA

Istraživanja su sprovedena u laboratorijama za fitopatologiju, na Departmanu za fitomedicinu i zaštitu životne sredine Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu. Plodovi jabuke sa simptomima plave truleži prikupljeni su tokom 2020. i 2021. godine iz skladišta na 26 lokaliteta u R. Srbiji. Plodovi jabuke sa simptomima plave truleži pripadali su sortama: fudži, zlatni delišes, crveni delišes, gala, ajdared, greni smit, breburn, jonagold i Red Jonaprince.

Izolacija patogena i formiranje kolekcije izolata. Izolacija patogena iz zaraženih plodova jabuke sa simptomima plave truleži vršena je standardnim fitopatološkim metodama u komorama za izolaciju, na hranljivu podlogu krompir dekstrozni agar (KDA). Plodovi su površinski dezinfikovani 70% alkoholom, a zatim su sterilnim skalpelom presečeni po sredini nekroze. Po tri fragmenta tkiva iz unutrašnjosti ploda, uzeta na prelasku zdravog u oboleli deo, postavljana su u Petri kutiju. Petri kutije su inkubirane u mraku pri temperaturi od 24±1 °C. Nakon sedam dana, fragmenti kolonija karakterističnog izgleda *P. expansum* prebačeni su u nove Petri kutije radi dobijanja čistih kultura. Monosporijalni izolati dobijeni su razmazom suspenzije konidija na površinu hranljive podloge vodeni agar (2,5%) i nakon inkubacije 16-18 h pri temperaturi 24±1 °C u sterilnim uslovima, pod mikroskopom su pomoću kopljaste igle isečeni pojedinačni fragmenti podloge sa po jednom konidijom koja klija i preneseni u nove Petri kutije sa podlogom KDA. Nakon 7 dana inkubacije u mraku pri temperaturi 24±1 °C, formirana je kolekcija

monosporijalnih izolata koji se čuvaju u formi suspenzije na temperaturi 4 °C i koji su korišćeni u istraživanju. U eksperimentima su korišćene suspenzije konidija izolata u sterilnoj destilovanoj vodi sa 0,05% Tween 20 (10^6 konidija/ml). Suspenzije su pripremljene od kolonija izolata sa KDA podloge nakon 7 dana inkubacije pri temperaturi 24±1 °C.

***In vitro* testiranje osetljivosti kolekcije izolata *P. expansum*.** Određivanje osetljivosti izolata zasnivalo se na poređenju porasta kolonija 65 izolata P. expansum pri razvoju na: KDA podlozi; KDA podlozi koja sadrži diskriminativnu koncentraciju aktivne supstance; na KDA podlozi koja sadrži koncentraciju aktivne supstance koja je duplo veća od diskriminativne. U ogledu je korišćena diskriminativna koncentracija za rezistenost vrste *P. expansum* prema fludioksonilu (0,5 µg/ml) koju su prethodno utvrdili Li and Xiao (2008), kako bi se utvrdilo prisustvo izolata *P. expansum* sa nižim nivoom rezistentnosti. Za utvrđivanje prisustva visoko rezistentnih izolata, korišćena je koncentracija od 1 µg/ml. U radu je korišćena SC formulacija aktivne supstance fludioksonil koncentracije 225 g/l. Kako bi se postigla koncentracija fludioksonila u hranljivoj podlozi KDA od 0,5 µg/ml, u 300 ml hranljive podloge KDA dodato je 66,67 µl preparata. Kako bi se postigla koncentracija fludioksonila u hranljivoj podlozi KDA od 1 µg/ml, u 300 ml hranljive podloge KDA dodato je 133,33 µl preparata.

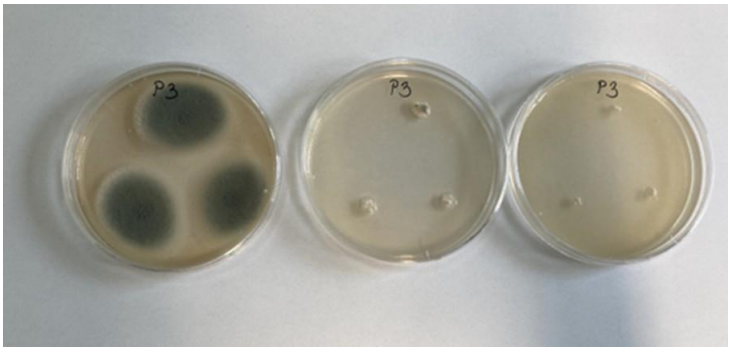
Za svaki izolat *P. expansum* ispitivana su 3 tretmana: netretirana kontrola (samo KDA), fludioksonil 0,5 µg/ml i fludioksonil 1 µg/ml. Za svaki tretman ispitivana su 3 ponavljanja. Inokulacija je za svako ponavljanje svakog tretmana izvršena Eppendorf pipetom na 3 mesta u Petri kutiji, sa po 1 µl suspenzije konidija koncentracije 10^6 konidija/ml. Petri kutije su stavljene na inkubaciju u mraku u periodu od 7 dana na temperaturi od 25 ± 1 °C (Slika 1). Nakon 7 dana inkubacije u mraku na temperaturi od 25 ± 1 °C, lenjirom su mereni prečnici kolonija. Za svako ponavljanje svakog tretmana na kolonijama *P. expansum* merena su po 2 prečnika (koji se seku u sredini kolonije pod pravim uglom), a zatim je računat prosek prečnika kolonije. Prosečne vrednosti prečnika kolonija svakog ponavljanja svakog tretmana su upoređivane kako bi se uočilo prisustvo rezistentnih izolata *P. expansum*.

Izračunat je i procenat inhibicije porasta micelije prema formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = (a-b)/a \times 100$$

a = prečnik kolnije u kontroli, b = prečnik kolonije u tretmanu fungicidom

Rezultati ogleda statistički su analizirani u programu STATISTICA 14.0.1.25 (TIBCO Software Inc) primenom dvofaktorskog ANOVA testa, a značajnosti između parova testirane su putem Tuckey HSD testa (p=0,05).



Slika 1. Izgled kolonija izolata P3 *P. expansum* u 3 ispitivana tretmana nakon 7 dana inkubacije u mraku na temperaturi od 25 ± 1 °C (foto: Puzić, 2023)

REZULTATI I DISKUSIJA

Prikupljanje izolata *P. expansum* i formiranje kolekcije. Iz plodova jabuke sa simptomima plave truleži izvršene su fitopatološke izolacije. Šezdeset i pet izolata identifikovano je kao *P. expansum*. Micelija koju su formirali izolati bila je plavkaste do zelenkaste boje, a posmatranjem pod mikroskopom uočeno je prisustvo karakterističnih konidija, koje su okrugle, jednoćelijske, formirane u nizovima na složeno razgranatim penicilusima. Dobijeni izolati su korišćeni u nastavku ogleda. Do sada su kao prouzrokovači plave truleži plodova jabuke u R. Srbiji identifikovane vrste: *P. expansum, P. crustosum, P. solitum i P. chrysogenum*, pri čemu se *P. expansum* navodi kao najdominantnija vrsta (Vico i sar.., 2014; Žebeljan i sar., 2021; Dudaš i sar., 2025).

***In vitro* testiranje osetljivosti kolekcije izolata *P. expansum*.** Osetljivost izolata prema fludioksonilu 0,5 µg/ml i 1 µg/ml prikazana je u Tabeli 1.

Tabela 1. Veličina kolonija i procenat inhibicije porasta kolonije izolata *P. expansum* na hranljivim podlogama sa 0,5 i 1 µg/ml fludioksonila posle 7 dana inkubacije u mraku na temperaturi 25 ± 1 °C.
(*vrednosti označene istim slovima su na istom nivou statističke značajnosti $p < 0,05$)

	Prečnik kolonije (cm)						% inhibicije porasta kolonije	
Izolat	Kontrola		Fludioksonil 0,5 µg/ml		Fludioksonil 1 µg/ml		Fludioksonil 0,5 µg/ml	Fludioksonil 1 µg/ml
P1	4.1	no	0.9	cde	0.3	abc	79.44	92.34
P2	4.0	mn	0.4	abc	0.3	abc	89.50	92.02

P3	4.6	op	0.7	bcd	0.4	abc	85.97	92.45
P4	4.9	p	0.6	bcd	0.3	abc	86.94	94.50
P5	4.0	mn	1.2	ef	0.5	bc	71.25	88.33
P6	3.9	lmn	1.1	e	0.8	bcd	72.46	78.81
P7	3.9	lmn	0.7	bcd	0.2	ab	81.39	94.37
P8	3.8	lmn	1.2	ef	0.6	bcd	68.14	84.96
P9	4.1	no	1.6	fg	0.6	bcd	60.48	86.29
P10	4.2	no	1.5	efg	0.5	bc	63.86	88.76
P11	4.0	mn	0.8	bcd	0.7	bcd	78.99	81.93
P12	3.8	lmn	1.3	efg	0.5	bc	65.78	88.00
P13	3.8	lmn	1.9	gh	1.1	e	49.78	72.00
P14	3.9	lmn	0.5	bc	0.2	ab	87.45	95.67
P15	3.6	klm	0.6	bcd	0.3	abc	84.79	92.17
P16	4.0	mn	1.1	e	0.7	bcd	73.53	83.61
P17	3.6	klm	0.4	abc	0.2	ab	88.32	94.39
P18	3.5	klm	0.7	bcd	0.0	a	79.52	99.05
P19	3.9	lmn	1.5	efg	1.1	ef	62.34	71.43
P20	3.8	lmn	0.5	bc	0.0	a	86.34	100.00
P21	3.9	lmn	1.4	efg	1.6	fg	65.24	59.66
P22	4.2	no	0.8	bcd	0.4	abc	82.21	89.72
P23	3.2	j	1.2	ef	0.3	abc	62.69	92.23
P24	3.1	j	1.2	ef	0.2	ab	60.33	92.39
P25	4.2	no	1.5	efg	0.5	bc	63.35	89.24
P26	3.5	klm	1.1	e	0.4	abc	69.05	88.57
P27	4.2	no	1.6	fg	0.3	abc	61.11	92.46
P28	3.8	lmn	1.1	e	0.3	abc	71.93	91.67
P29	4.1	no	0.5	bc	0.3	abc	87.90	93.95
P30	4.4	nop	0.8	bcd	0.0	a	81.95	100.00
P31	3.9	lmn	0.7	bcd	0.2	ab	81.47	94.83
P32	3.9	lmn	0.9	cde	0.1	ab	76.27	97.46
P33	3.4	j-m	1.0	de	0.0	a	72.06	100.00
P34	4.1	no	1.0	de	0.1	ab	75.51	96.73
P35	3.8	lmn	0.7	bcd	0.0	a	82.53	100.00
P36	4.2	no	0.7	bcd	0.0	a	83.27	100.00
P37	3.6	klm	0.8	bcd	0.0	a	77.57	100.00

P38	4.3	nop	1.0	de	0.0	a	77.69	100.00
P39	4.0	mn	0.7	bcd	0.5	bc	81.51	87.39
P42	4.0	mn	0.9	cde	0.1	ab	78.24	96.65
P43	4.3	nop	0.7	bcd	0.0	a	83.92	100.00
P44	4.0	mn	0.7	bcd	0.0	a	82.92	100.00
P45	4.2	no	1.3	efg	0.0	a	68.92	100.00
P46	4.2	no	1.4	efg	0.1	ab	67.60	96.80
P47	3.8	lmn	1.5	efg	0.1	ab	60.43	97.39
P48	3.9	lmn	1.1	e	0.0	a	71.91	100.00
P49	3.8	lmn	1.3	efg	0.2	ab	66.81	95.58
P50	3.3	j-m	1.5	efg	0.1	ab	56.50	97.50
P51	3.4	j-m	1.4	efg	0.0	ab	59.90	99.01
P52	3.8	lmn	1.5	efg	0.0	a	61.33	99.11
P53	4.0	mn	1.4	efg	0.0	a	65.00	100.00
P54	3.9	lmn	1.3	efg	0.1	ab	66.24	97.01
P56	3.9	lmn	1.4	efg	0.1	ab	64.96	98.29
P57	3.8	lmn	1.5	efg	0.3	abc	62.17	92.61
P58	3.9	lmn	1.5	efg	0.6	bcd	62.71	86.02
P59	4.2	no	0.6	bcd	0.2	ab	85.94	95.58
P60	3.5	klm	0.9	cde	0.4	abc	73.46	87.68
P61	3.6	klm	0.4	abc	0.0	a	89.25	100.00
P62	2.6	i	1.3	efg	0.4	abc	51.28	86.54
P65	3.2	j	0.6	bcd	0.2	ab	81.87	93.26
P66	3.9	lmn	0.7	bcd	0.0	a	82.76	100.00
P67	4.6	op	1.2	ef	0.7	bcd	74.37	85.56
P68	4.0	mn	0.6	bcd	0.0	a	85.77	99.16
P69	3.9	lmn	0.5	bc	0.0	a	88.09	100.00
P70	2.7	i	1.1	e	0.5	bc	58.49	79.87

Dvofaktorijalna analiza varijanse pokazala je da i izolat i tretmani fungicidom značajno utiču na veličinu kolonije *P. expansum*, kao i da postoje statistički značajne razlike između tretmana (p=0,05). Veličina kolonije u tretmanu sa fludioksonilom 1 µg/ml bila je od 0 do 1,6 cm. U tretmanu sa fludioksonilom 0,5 µg/ml veličina kolonija kretala se u opsegu od 0,4 do 1,9 cm, dok je u kontroli bila od 2,6 do 4,9 cm.

Najmanja inhibicija rasta kolonija (49,78%) zabeležena je za izolat P13 u tretmanu fludioksonil 0,5 µg/ml. U tretmanu fludioksonil 0,5 µg/ml ni za jedan izolat nije postignuta inhibicija rasta kolonija od 100%, dok je inhibicija manja od 80% zabeležena kod 42 izolata, a porast 5 izolata inhibiran je za manje od 60% (izolati P13, P50, P51, P62, P70). U tretmanu sa fludioksonilom 1 µg/ml, porast 15 izolata inhibiran je 100%, dok je porast 5 izolata inhibiran manje od 80%. U istom tretmanu, samo je porast jednog izolata inhibiran za manje od 60%, preciznije porast izolata P21 za 59,66%.

U istraživanju Li i Xiao (2008) sprovedenom u SAD, utvrđena je diskrimanitivna koncentracija za osetljivost vrste *P. expansum* prema fludioksonilu (0,5 µg/ml) pri kojoj je došlo do inhibicije rasta micelije kod 119 testiranih izolata *P. expansum*, dok je razvoj micelije zabeležen samo kod jednog izolata. Gaskins i sar. (2015) su testirali osetljivost 5 izolata *P. expansum* izlažući ih diskriminativnoj koncentraciji od 0,5 µg/ml. Zabeležen je rast micelije kod 4 izolata sa smanjenom osetljivošću prema fludioksonilu, dok je jedan izolat definisan kao osetljiv, odnosno, rast njegove micelije je bio u potpunosti inhibiran. U istraživanju Li i Xiao (2008) pri koncentraciji od 0,1 µg/ml zabeležena je potpuna inhibicija klijanja konidija i izduživanja klicine cevčice kod svih izolata, osim kod jednog izolata koji je pokazao smanjenu osetljivost i prilikom ispitivanja rasta micelije. Amiri i sar. (2017) su u svom istraživanju ispitivali osetljivost 1200 izolata *P. expansum*. Kako bi ispitali osetljivost, beležili su izduživanje klicine cevčice prilikom izlaganja izolata koncentracijama od 0,5 µg/ml i 1 µg/ml fludioksonila. Prilikom izlaganja koncentraciji od 0,5 µg/ml fludioksonila, zabeleženo je izduživanje klicine cevčice kod 10,6% testiranih izolata, dok je pri koncentraciji od 1 µg/ml došlo do potpune inhibicije.

U ovom radu je zabeležen razvoj micelije svih ispitivanih izolata *P. expansum* pri izlaganju koncentraciji fludioksonila od 0,5 µg/ml, dok je pri izlaganju koncentraciji od 1 µg/ml razvoj micelije zabeležen kod 76,9%, što je drastičan porast u poređenju sa rezultatima Li i Xiao (2008). Ovo ukazuje na postojanje izolata sa smanjenom osetljivošću prema fludioksonilu, što je zabeleženo i u istraživanjima drugih autora (Karaoglanidis i sar., 2011; Gaskins i sar., 2015; Amiri i sar., 2017; Samaras i sar., 2020). Kada se rezultati ovog rada uporede sa rezultatima gore navedenih autora može da se pretpostavi prisustvo rezistentnih populacija *P. expansum* u R. Srbiji. Ovo ukazuje na potrebu za dodatnim ispitivanjima osetljivosti populacije *P. expansum* na širem spektru koncentracija fungicida. Takođe, s obzirom na rezultate istraživanja Karaoglanidis i sar. (2011) i Samaras i sar. (2020) o postojanju unakrsne rezistentnosti izolata *P. expansum* prema fungicidima iz drugih hemijskih grupa koji se koriste za suzbijanje skladišnih patogena jabuke, nameće se potreba za daljim ispitivanjima izolata *P. expansum* u cilju otkrivanja ove pojave.

ZAKLJUČAK

Fitopatološkim izolacijama iz plodova jabuke iz skladišta na kojima su opisani karakteristični simptomi plave truleži, dobijena je kolekcija od 65 izolata za koje je putem morfoloških odlika utvrđeno da pripadaju vrsti *P. expansum*. Kada je u pitanju osetljivost izolata prema fludioksonilu, dokazano je da i izolat i tretmani fungicidom značajno utiču na veličinu kolonije *P. expansum*, kao i da postoje statistički značajne razlike između tretmana. U tretmanu sa 0,5 µg/ml fludioksonila kod izolata P13 zabeležena je najmanja inhibicija rasta kolonija (49,78%). Kod ove koncentracije, ni za jedan izolat nije postignuta inhibicija rasta kolonija od 100%. U tretmanu sa 1 µg/ml fludioksonila, porast 15 izolata inhibiran je 100%, dok je najmanja ihibicija zabeležena kod izolata P21 i iznosila je 59,66%. Osetljivost izolata *P. expansum* koji su ispitivani u ovom istraživanju se kretala u širokom rasponu 49,78-100% inhibicije porasta micelije, u zavisnosti od primenjene koncentracije fungicida. Rezultati ovog rada ukazuju na postojanje izolata *P. expansum* sa smanjenom osetljivošću prema fludioksonilu u R. Srbiji. Kako bi se dobili precizniji podaci o osetljivosti populacije, potrebno je da se buduća ispitivanja sprovedu na širem spektru koncentracija fludioksonila.

LITERATURA

Amiri, A., Bompeix, G. (2005): Diversity and population dynamics of Penicillium spp. on apples in pre-and postharvest environments: consequences for decay development. Plant pathology, 54(1), 74-81.

Amiri, A., Mulvaney, K. A., Pandit, L. K. (2017): First report of Penicillium expansum isolates with low levels of resistance to fludioxonil from commercial apple packinghouses in Washington State. Plant Disease, 101(5), 835-835.

Bagi, F., Konstantinović, B., Stojšin, V., Lazić, S., Inđić, D., Meseldžija, M., Bugarin, R., Sedlar, A., Budakov, D., Mile, L., Monoštri, T., (2012): Fitomedicina. Izd. Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet Novi Sad.

Baraldi, E., Mari, M., Chierici, E., Pondrelli, M., Bertolini, P., Pratella, G.C. (2003): Studies on thiabendazole resistance of Penicillium expansum of pears: pathogenic fitness and genetic characterization. Plant Pathology 52, 362–370.

Bramel P. J., Volk, G. (2019): A global strategy for the conservation and use of apple genetic resources. Global Crop Diversity Trust. Bonn, Germany.

Brent, K. J. i Hollomon, D. J. (2007): Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed. FRAC Monograph No.1. Brussels, Belgium: Fungicide Resistance Action Committee.

Dudaš, T., Cotugno, P., Budakov, D., Grahovac, M., Stojšin, V., Mihajlović, M., Ippolito, A., Sanzani, S. M. (2025): Diversity and Patulin Production of

Penicillium spp. Associated with Apple Blue Mold in Serbia. Journal of Fungi, 11(3), 175.

Dudaš, T., Todić, A., Budakov, D., Grahovac, M., Loc, M., Stojšin, V. (2022): Penicillium spp., Prouzrokovači plave truleži uskladištenih plodova jabuke. Biljni lekar, 50(2), 93.

FRAC (Fungicide Resistance Action Committee), 2024. Pathogen risk list. https://www.frac.info/. https://www.frac.info/docs/default-source/publications/pathogen-risk/frac-pathogen-list-2019.pdf.

Grahovac, M., Inđić, D., Tanović, B., Lazić, S., Vuković, S., Hrustić, J., Gvozdenac, S. (2011): Integralna zaštita jabuka od prouzrokovača truleži u skladištima. Pesticidi i fitomedicina, 26(4), 289-299.

Habib, W., Masiello, M., Chahine-Tsouvalakis, H., Al Moussawi, Z., Saab, C., Tawk, S.T., Piemontese, L., Solfrizzo, M., Logrieco, A.F., Moretti, A., Susca, A. (2021): Occurrence and characterization of Penicillium species isolated from post-harvest apples in Lebanon. Toxins, 13: 730Ivanović, M.S., Ivanović, M.M. (2017): Bolesti voćaka i vinove loze. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet. Beograd.

Janjić, V., Mitrić, S., Marčić, D., Stević, M. (2020): Zaštita biljaka i rezistentnost štetnih organizama. U: Janjić, V., Pržulj, N. (urednici). Ograničenja i izazovi u biljnoj proizvodnji. Akademija nauka i umjetnosti Republike Srpske, Banja Luka, Monografija LXII: 223–231; 297–322.

Karaoglanidis, G. S., Markoglou, A. N., Bardas, G. A., Doukas, E. G., Konstantinou, S., Kalampokis, J. F. (2011): Sensitivity of Penicillium expansum field isolates to tebuconazole, iprodione, fludioxonil and cyprodinil and characterization of fitness parameters and patulin production. International journal of food microbiology, 145(1), 195-204.

Keserović, Z., Magazin, N., Milić, B., Dorić, M. (2016): Voćarstvo i vinogradarstvo. Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet.

Kljajić, N. i Vuković, P. (2014): Fruit Production Analysis in Republic of Serbia in the Function of Rural Development. In D. Cvijanović, J. Subić, A. Vasile (Ed.), Sustainable agriculture and rural development in terms of the Republic of Serbia strategic goals realization within the Danube region – rural development and (un)limited resources. (pp. 444-460). Belgrade: Institute of Agricultural Economics.

Kolektiv autora (2022): Pesticidi u poljoprivredi i šumarstvu u Srbiji. Izd. Društvo za zaštitu bilja. 1-700.

Leibinger, W., Breuker, B., Hahn, M., Mendgen, K. (1997): Control of postharvest pathogens and colonization of the apple surface by antagonistic microorganisms in the field. Phytopathology 87: 1103–1110.

Li, H. X. i Xiao, C. L. (2008): Baseline sensitivities to fludioxonil and pyrimethanil in Penicillium expansum populations from apple in Washington State. Postharvest biology and technology, 47(2), 239-245.

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.

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.

Petreš, M., Grahovac, M., Budakov, D., Stojšin, V., Loc, M., Dudaš, T. i Došen, N. (2022): The causal agent of apple scab (Venturia inaequalis (Cooke) Winter). Biljni lekar, 50(6), 427-437.

Porat, R., Lichter, A., Terry, L. A., Harker, R., Buzby, J. (2018): Postharvest losses of fruit and vegetables during retail and in consumers' homes: Quantifications, causes, and means of prevention. Postharvest Biology and Technology 139: 135-149.

Puel, O., Galtier, P., Oswald, I.P. (2010): Biosynthesis and toxicological effects of patulin. Toxins, 2, 613–631.

Russell, P.E. (2004): Sensitivity baselines in fungicide resistance research and management. FRAC Monograph No. 3. Crop Life International, Brussels, Belgium.

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.

Sekulić, J. i Jeličić, S. (2011): Sredstva za zaštitu bilja u prometu u Srbiji. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.

Stevanović, S., Radojević, R., Kosi, F., Marković, D., Simonović, V., Milovančević, U. (2015): Optimalni režim za skladištenje jabuke u ULO hladnjačama. Zbornik 46. Međunarodnog kongresa o KGH, Beograd 02-04. decembar, 170-176.

Sutton, T.B., Aldwinckle, A., Agnello, A.M., Walgenbach, J.F. (2014): Compendium of apple and pear diseases and pests, 2nd edition. St Paul, MN: American Phytopathological Society.

Trkulja, V. (2003): Bolesti uskladištenih plodova jabuke. Glasnik zaštite bilja 6: 5–29, Zagreb.

Trkulja, V., Bagi, F. (2022): Patogeni uskladištenih plodova jabuke. Biljni lekar, 50(6), 462-492.

Trkulja, V., Predić, T., Zavišić, N., Simić, D., Miladinović, Z., Tanasić, B., Babić, G., Mihić Salapura, J., Cvijanović, T., Vuković, B., Nedić, B. (2020): Integralna proizvodnja jabučastog voća. JU Poljoprivredni institut Republike Srpske, Banja Luka.

Thomidis, T. and Prodromou, I. (2020): Evaluation of fungicides for the control of postharvest fruit rot pathogens of apple in Northern Greece. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 53(11-12), 581-590.

Vico, I., Gaskins, V., Duduk, N., Vasić, M., Yu, J. J., Peter, K. A., Jurick, W. M. (2014): First report of Penicillium crustosum causing blue mold on stored apple fruit in Serbia. Plant disease, 98(10), 1430-1430.

Wenneker, M. and Thomma B. P. H. J. (2020): Latent postharvest pathogens of pome fruit and their management: From single measures to a systems intervention approach. Eur. J. Plant Pathol. 156:663–681.

Zhong, L., Carere, J., Lu, Z., Lu, F., Zhou, T. (2018): Patulin in apples and apple-based food products: The burdens and the mitigation strategies. Toxins, 10(11), 475.

Žebeljan, A., Duduk, N., Vučković, N., Jurick, W. M., & Vico, I. (2021): Incidence, speciation, and morpho-genetic diversity of Penicillium spp. causing blue mold of stored pome fruits in Serbia. Journal of Fungi, 7(12), 1019.

Abstract

SENSITIVITY OF CAUSING AGENT OF APPLE BLUE MOLD (*Penicillium expansum*) TO FLUDIOXONIL

Vojin Puzić, Tatjana Dudaš, Mila Grahovac, Slavica Vuković, Marta Loc, Mladen Petreš, Dragana Budakov

Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet
E-mail: vojin.puzic@polj.edu.rs

Blue mold, caused by the fungi from the genus *Penicillium*, is one of the most important diseases of stored apple fruits. Among the species that cause the apple blue mold, the most common is *P. expansum*. The causal agents of blue mold lead to the decay of fruits, and they also produce mycotoxins which compromise the safety of the fruits. Due to the abolition of an increasing number of permitted active substances from the market, the population of pathogens is exposed to a limited range of fungicide action mechanisms, and hence there is a risk of resistance development. Given that fungicides based on the active substance fludioxonil are most frequently used to protect apple fruit against blue mold in the Republic of Serbia, sensitivity of 65 isolates of *P. expansum* originating from a various storage facilities in the Republic of Serbia was tested in this work. After determining the species of isolates, the sensitivity of the P. expansum population was tested by measuring the growth of mycelium when exposed to concentrations of 0,5 and 1 μg/ml of fludioxonil incorporated into the growth medium. The results of this work indicate the existence of populations of *P. expansum* with a reduced level of sensitivity to fludioxonil in the Republic of Serbia.

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