

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Ajda MEDJEDOVIĆ

**ANTAGONISTIČNI POTENCIAL GLIV
POVZROČITELJIC SAJAVOSTI IN MUŠJE
PEGAVOSTI JABOLK IZ REDA *Capnodiales***

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Ajda MEDJEDOVIĆ

**ANTAGONISTIČNI POTENCIAL GLIV POVZROČITELJIC
SAJAVOSTI IN MUŠJE PEGAVOSTI JABOLK IZ REDA
*Capnodiales***

DOKTORSKA DISERTACIJA

**ANTAGONISTIC POTENTIAL OF FUNGI OF THE ORDER
Capnodiales CAUSING SOOTY BLOTCH AND FLY SPECK ON
APPLES**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2014

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa 20. seje Komisije za doktorski študij UL z dne 21. september 2011 (po pooblastilu Senata Univerze z dne 20. januarja 2009) je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Bioznanosti, znanstveno področje: biotehnologija.

Komisija za podiplomski študij je za mentorja doktorskega dela imenovala viš. znan. sod. dr. Hansa-Josefa Schroersa.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: Prof. dr. Branka Javornik

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: Prof. dr. Franci Celar

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: Viš. znan. sod. dr. Hans Schroers

Kmetijski inštitut Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin

Datum zagovora: 14. 5. 2014

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Ajda MEDJEDOVIĆ

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD	Dd
DK	UDK: 632.4:582.282:634.11(043.3)=163
KG	glive/SBFS glive/sajavost/mušja pegavost/biotično varstvo/Capnodiales/ varstvo rastlin/jabolka/bolezni sadja
AV	MEDJEDOVIĆ, Ajda
SA	SCHROERS, Hans-Josef (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101, Slovenija
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študij Bioznanosti, znanstveno področje: biotehnologija
LI	2014
IN	ANTAGONISTIČNI POTENCIAL GLIV POVZROČITELJIC SAJAVOSTI IN MUŠJE PEGAVOSTI JABOLK IZ REDA Capnodiales
TD	Doktorska disertacija
OP	XV, 110 str., 27 pregl., 64 sl., 22 pril., 119 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Vrste gliv sajavosti in mušje pegavosti (SBFS) iz redu Capnodiales se lahko razvijejo na površju jabolka, kjer ovirajo druga drugo. Njihova interakcija se izrazi v demarkacijski črti ali coni inhibicije, znotraj katere se glive drugih vrst ne morejo širiti. Antagonistični potencial gliv SBFS proti različnim rastlinskim patogenom smo določali <i>in vitro</i> s testom dvojnih kultur. Med izbranimi izolati različnih vrst in rodov gliv SBFS je samo gliva <i>Microcyclospora tardicrescens</i> (<i>M. tardicrescens</i>) pokazala antagonistični potencial proti patogeni glivi <i>Colletotrichum fioriniae</i> (<i>C. fioriniae</i>) (55,26 %). Rast patogene glive <i>Venturia inaequalis</i> je najbolj zavirala novo opisana vrsta <i>Peltaster cerophilus</i> (<i>P. cerophilus</i>) (50,39 %). Sekundarni metaboliti ekstrahirani iz kolonij gliv <i>Microcyclosporella mali</i> , <i>Schizothyrium pomi</i> , <i>P. cerophilus</i> , <i>Microcyclospora malicola</i> in <i>M. tardicrescens</i> so omejili rast primarnih hif ali popolnoma zavrli kalitev trosov glive <i>C. fioriniae</i> . Z agarim difuzijskim testom in preparativno tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti povezano z masnim spektrometrom smo iz glive <i>M. tardicrescens</i> prvič izolirali dve bioaktivni spojini in ju strukturno identificirali z jedrsko magnetno resonanco. Spojino 1 smo identificirali kot znan mikotoksin trihotekolon acetat – C ₁₇ H ₂₂ O ₅ in spojino 2 kot nov in prvič opisan metabolit 7-hidroksitrihotekolon acetat – C ₁₇ H ₂₂ O ₆ . Obe spojini sodita v skupino trihotecenov tipa B. Spojini sta v testu minimalne inhibitorne koncentracije pokazali zmerno bioaktivnost proti <i>C. fioriniae</i> in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , šibko proti <i>Pichia anomala</i> in <i>Candida tenuis</i> ter nobene bioaktivnosti proti <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> in <i>Staphylococcus aureus</i> . Testiran izolat <i>M. tardicrescens</i> je prav tako pokazal antagonistično aktivnost proti <i>C. fioriniae</i> , ko smo z njim inokulirali obrana jabolka sort Gala, Gloster in Zlati delišes ter zmanjšal bolezenska znamenja antraknoze za 10 – 27 %. <i>M. tardicrescens</i> je bila identificirana kot tvorka škodljivih in potencialno nevarnih mikotoksinov trihotecenov, zato bi bilo smotno nadaljevati raziskave na teh glivah. Možno je, da gliva <i>M. tardicrescens</i> s tvorbo trihotecenov zavira druge SBFS glive in/ali rastlinske glivne patogene v tekmovanju za isto ekološko nišo na površju jabolka.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN Dd
DC UDC: 632.4:582.282:634.11(043.3)=163
CX fungi/SBFS fungi/sooty blotch/flyspeck/biological control/Capnodiales/plant protection/apples/fruit diseases
AU MEDJEDOVIĆ, Ajda
AA SCHROERS, Hans-Josef (mentor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101, Slovenija
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biosciences, Scientific Field: Biotechnology
PY 2014
TI ANTAGONISTIC POTENTIAL OF FUNGI OF THE ORDER Capnodiales CAUSING SOOTY BLOTCH AND FLY SPECK ON APPLES
DT Doctoral Dissertation
NO XV, 110 p., 27 tab., 64 fig., 22 ann., 119 ref.
LA Sl
AL sl/en
AB Species of sooty blotch and fly speck (SBFS) fungi (Capnodiales) co-colonizing apple fruits and inhibiting each other on apple fruits were isolated. A representative strain of *Microcyclospora tardicrescens* (*M. tardicrescens*) reduced the colony growth of the plant pathogenic fungus *Colletotrichum fioriniae* (*C. fioriniae*) by 55,26 % in dual culture tests; a strain of *Peltaster* sp. (described in the context of this study as *Peltaster cerophilus* sp. nov.), reduced the apple scab agent *Venturia inaequalis* by 50,39 %. Secondary metabolites extracted from colonies of *Microcyclosporella mali*, *Schizothyrium pomi*, *P. cerophilus*, *Microcyclospora malicola* and *M. tardicrescens* reduced or fully suppressed the germination of conidia of *C. fioriniae*. Agar diffusion assays and preparative high pressure liquid chromatography coupled with mass spectrometry identified for the first time two biologically active compounds from a strain of *M. tardicrescens* that were characterized structurally by nuclear magnetic resonance as trichothecolone acetate (empirical formula, $C_{17}H_{22}O_5$) and 7-hydroxytrichothecolone acetate ($C_{17}H_{22}O_6$). Both represent type B trichothecenes; the latter is a novel metabolite that was isolated and described for the first time. Minimum inhibitory concentration assays suggested that these trichothecenes were not active against the bacteria *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, weakly active against the fungi *Pichia anomala* and *Candida tenuis* and moderately active against *C. fioriniae* and *Saccharomyces cerevisiae*. The tested *M. tardicrescens* strain also showed antagonistic activity against *C. fioriniae* when it was inoculated on harvested apples of cultivars Gala, Gloster and Golden delicious. It reduced anthracnose symptoms caused by *C. fioriniae* by 10–27 %. *M. tardicrescens* was identified as a producer of hazardous trichothecene type mycotoxins, which should give reason to monitor these food-borne fungi more carefully in the future; it is also possible, that these trichothecenes are formed by *M. tardicrescens* in order to suppress other SBFS and/or plant pathogenic fungi that compete for the same or similar ecological niches on the apple fruits.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO SLIK	X
KAZALO PRILOG	XII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIII
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 GLIVE SBFS	3
2.1.1 Ekologija gliv SBFS	4
2.2 GLIVIČNE BOLEZNI SADNEGA DREVJA	6
2.2.1 Jablanov škrlup (<i>Venturia inaequalis</i>)	6
2.2.1.1 Gostitelj jablanovega škrlupa	6
2.2.1.2 Bolezenska znamenja jablanovega škrlupa	6
2.2.1.3 Razvojni krog jablanovega škrlupa	7
2.2.2 Grenka sadna gniloba (<i>Colletotrichum</i> spp.)	8
2.2.2.1 Pomen bolezni	8
2.2.2.2 Bolezenska znamenja grenke sadne gnilobe	8
2.2.2.3 Življenjski cikel grenke sadne gnilobe	9
2.2.3 Gniloba peščišča	9
2.2.3.1 Bolezenska znamenja gnilobe peščišča	9
2.2.3.2 Povzročitelji gnilobe peščišča	9
2.3 BIOLOŠKA KONTROLA BOLEZNI SADJA	10
2.3.1 Vir in tipi biotičnih agensov	10
2.3.1.1 Bakterije	11
2.3.1.2 Kvasovke	11
2.3.1.3 Filamentozne glive	12
2.3.2 Mehanizmi antagonističnega delovanja	12
2.3.2.1 Neposredni antagonizem	12
2.3.2.2 Posredni antagonizem	15
2.3.3 Epidemiologija in biološka kontrola glivnih bolezni z mikrobnimi antagonisti	16
2.3.3.1 Jablanov škrlup	16
2.3.3.2 Grenka sadna gniloba	18
2.4 UPORABNOST ANTAGONISTIČNIH ORGANIZMOV NA POLJU	18
2.4.1 Odpornost na stres v okolju	18
2.4.2 Kolonizacija površja plodov	19
2.5 SEKUNDARNI METABOLITI	19
2.5.1 Mikotoksini	20
2.5.1.1 Trihoteceni	21
2.5.1.2 Strupenost	21

3	MATERIALI IN METODE	23
3.1	MATERIALI	23
3.1.1	Testni mikroorganizmi	23
3.1.2	Splošna mikrobiološka gojišča	23
3.1.2.1	PDA	23
3.1.2.2	Krompirjev glukozni agar z antibiotiki	23
3.1.2.3	Razredčen PDA	24
3.1.2.4	Sintetično hranilno gojišče (SNA)	24
3.1.3	Gojišče za določanje biokontrolne aktivnosti gliv in njihovih ekstraktov	24
3.1.4	Kemikalije in reagent	25
3.1.5	Naprave in drugi pripomočki	25
3.1.6	Začetni oligonukleotidi potrebni za DNA amplifikacijo	26
3.2	METODE	26
3.2.1	Vzorčenje gliv SBFS	26
3.2.1.1	Izolacija in trajno shranjevanje gliv SBFS	27
3.2.2	Vzorčenje rastlinskih patogenih gliv	27
3.2.2.1	<i>Colletotrichum fiorinae</i> R.G. Shivas & Y.P. Tan	27
3.2.2.2	<i>Fusarium avenaceum</i> Sacc.	28
3.2.2.3	<i>Venturia inaequalis</i> G. Winter	28
3.2.2.4	<i>Botrytis cinerea</i> Pers.	29
3.2.2.5	Izolacija patogenih gliv	29
3.2.3	Taksonomske analize	30
3.2.3.1	Morfološke analize	30
3.2.3.2	Osnovne molekularne metode	30
3.2.3.3	Filogenetska analiza	33
3.2.4	Test dvojnih kultur	33
3.2.4.1	Določanje skupnega števila trosov v suspenziji trosov	34
3.2.4.2	Priprava suspenzije trosov patogenih gliv	34
3.2.4.3	Test dvojnih kultur med izolati gliv povzročiteljic SBFS in glivami <i>C. fiorinae</i> , <i>F. avenaceum</i> in <i>B. cinerea</i>	35
3.2.4.4	Test dvojnih kultur med izolati gliv povzročiteljic SBFS in glivo <i>V. inaequalis</i>	35
3.2.5	Test določitve inhibitornih učinkov ekstraktov na kalitev trosov	36
3.2.5.1	Priprava ekstraktov	36
3.2.5.2	Priprava inokuluma patogene glive	36
3.2.5.3	Izvedba poskusa	36
3.3	ANALIZE SEKUNDARNIH METABOLITOV	37
3.3.1	Analitske tehnike	37
3.3.1.1	HPLC-DAD	37
3.3.1.2	ESI-IT-MS	37
3.3.1.3	ESI-TOF-MS	37
3.3.2	Analitski postopki	38
3.3.2.1	Ekstrakcija sekundarnih metabolitov	38
3.3.2.2	Difuzijski test	38
3.3.2.3	Ločba spojin v glivnem ekstraktu z RF-UHPLC-DAD	38
3.3.2.4	Frakcioniranje spojin glivnega ekstrakta s preparativno HPLC	39

3.3.2.5	Test bioaktivnosti frakcij	40
3.3.2.6	Ločitev spojin v bioaktivnih frakcijah s preparativno (NF) HPLC	40
3.3.2.7	Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) bioaktivnih spojin	40
3.3.2.8	Strukturna identifikacija spojin	40
3.4	<i>IN VIVO</i> TEST	41
3.4.1	Priprava inokuluma gliv sajavosti za <i>in vivo</i> test	42
3.5	<i>SEMI IN VIVO</i> TEST	42
3.5.1	Priprava pogojev za <i>semi in vivo</i> testiranje	42
3.5.2	Izvedba <i>semi in vivo</i> testiranja	43
4	REZULTATI	45
4.1	MORFOLOŠKE ZNAČILNOSTI UPORABLJENIH GLIV SBFS V ČISTI KULTURI	45
4.1.1	<i>Microcyclospora malicola</i> J. Frank, Schroers & Crous	45
4.1.2	<i>Microcyclospora tardicrescens</i> J. Frank, Schroers & Crous	46
4.1.3	<i>Microcyclosporella mali</i> J. Frank, Schroers & Crous	47
4.1.4	<i>Schizothyrium pomi</i> Arx	49
4.1.5	<i>Peltaster cerophilus</i> J. Frank & Schroers, Mycologia 2014 v tisku	49
4.2	FILOGENETSKO DREVO ITS RDNA	52
4.3	TEST DVOJNIH KULTUR	53
4.4	VPLIV EKSTRAKTOV NA KALITEV TROSOV	62
4.4.1	Vpliv dodanega etil acetata na kalitev trosov	62
4.4.2	Vpliv ekstraktov na kalitev trosov	64
4.5	SEKUNDARNI METABOLITI	67
4.5.1	Analitske tehnike	67
4.5.1.1	Ločba spojin v glivnem ekstraktu z RF-UHPLC-DAD	67
4.5.2	Analitski postopki	68
4.5.2.1	Difuzijski test glivnega ekstrakta	68
4.5.2.2	Preparativna RF-HPLC	69
4.5.2.3	Difuzijski test spojin iz dvojnega vrha	71
4.5.2.4	Identifikacija bioaktivnih spojin dvojnega vrha	72
4.5.2.5	Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) bioaktivnih spojin	74
4.5.2.6	Strukturna identifikacija spojin (NMR)	76
4.6	<i>IN VIVO</i> TEST	77
4.6.1	Pogoji testiranja	77
4.6.2	Rezultati za glivo <i>Microcyclospora malicola</i>	80
4.6.3	Rezultati za glivo <i>Microcyclospora tardicrescens</i>	80
4.6.4	Rezultati za glivo <i>Peltaster cerophilus</i>	80
4.6.5	Zaključki <i>in vivo</i> testiranja	81
4.7	<i>SEMI IN VIVO</i> TEST	82
4.7.1	Rezultati testiranja pri sorti Gala	82
4.7.2	Rezultati testiranja pri sorti Gloster	83
4.7.3	Rezultati testiranja pri sorti Zlati delišes	83
4.7.4	Zaključki <i>semi in vivo</i> testiranja	84
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	88
5.1	RAZPRAVA	88
5.1.1	Antagonistični potencial gliv v <i>in vitro</i> testu	88
5.1.2	Filogenetski odnosi znotraj rodu glive <i>Peltaster</i>	89

5.1.3	Antagonistični potencial gliv v <i>semi in vivo</i> test	90
5.1.4	<i>In vivo</i> test	91
5.1.5	Vpliv ekstraktov gliv SBFS na kalitev trosov glive <i>Colletotrichum fioriniae</i>	93
5.1.6	Sekundarni metaboliti	94
5.2	SKLEPI	96
6	POVZETEK (SUMMARY)	98
6.1	POVZETEK	98
6.2	SUMMARY	100
7	VIRI	100

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Biokontrolni agensi, njihova aplikacija pri zatiranju glivičnih boleznih pri jablanah (Zhou in sod., 2007)	10
Preglednica 2:	PDA+	24
Preglednica 3:	rPDA	24
Preglednica 4:	SNA	24
Preglednica 5:	CYA	24
Preglednica 6:	Tekoče kvasno gojišče s sladom	25
Preglednica 7:	MYC gojišče	25
Preglednica 8:	BAC gojišče	25
Preglednica 9:	Uporabljene kemikalije	25
Preglednica 10:	Začetni oligonukleotidi pri PCR reakciji	26
Preglednica 11:	Priprava lestvic in vzorcev	31
Preglednica 12:	Skupno število izolatov različnih vrst gliv SBFS vključenih v test dvojnih kultur	34
Preglednica 13:	Inhibicija rasti micelija glive <i>C. fiorinae</i> v <i>in vitro</i> testu dvojnih kultur z antagonistično glivo <i>M. tardicrescens</i> na CYA gojišču	54
Preglednica 14:	Izbrani izolati z večjo inhibitorno aktivnostjo znotraj vrst proti <i>V. inaequalis</i> in <i>C. fiorinae</i>	59
Preglednica 15:	Ekstrakti različnih vrst SBFS gliv	62
Preglednica 16:	Opisna statistika učinka različnih volumnov dodanega etil acetata na kalitev trosov patogene glive <i>C. fiorinae</i>	63
Preglednica 17:	Opisna statistika primerjave kontrol in ekstraktov	65
Preglednica 18:	Aktivnost ekstrakta glive <i>M. tardicrescens</i> iz CYA gojišča v difuzijskem testu	68
Preglednica 19:	Aktivnost ekstrakta in izoliranih metabolitov glive <i>M. tardicrescens</i> iz CYA gojišča v difuzijskem testu	72
Preglednica 20:	Retencijski časi (tR), molske mase in m-z vrednosti posameznih bioaktivnih spojin	74
Preglednica 21:	Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) spojine 1 in spojine 2 ...	75
Preglednica 22:	Struktura izoliranih spojin	77

Preglednica 23:	Pregled stopnje okuženosti plodov s tremi različnimi vrstami gliv	81
Preglednica 24:	Opisna statistika za vpliv glive vrste <i>M. tardicrescens</i> na rast nekroze glive <i>C. fioriniae</i> na treh sortah jabolk.....	84
Preglednica 25:	Razlika med inhibicijama pri nanosu glive <i>C. fioriniae</i> 3 ure za glivo <i>M. tardicrescens</i> (I3) in pri sočasnem nanosu gliv <i>M.</i> <i>tardicrescens</i> in <i>C. fioriniae</i> (I4).....	85
Preglednica 26:	Ocena parametrov pri inhibiciji I4 (sočasni nanos gliv <i>M.</i> <i>tardicrescens</i> in <i>C. fioriniae</i>)	85
Preglednica 27:	Ocena parametrov pri inhibiciji I3 (nanos glive <i>C. fioriniae</i> 3 ure za <i>M. tardicrescens</i>)	86

KAZALO SLIK

Slika 1:	Razvojni krog glive <i>V. inaequalis</i> (Carisse in Jobin, 2006).....	8
Slika 2:	Štirje tipi trihotecenov (tip A, B, C, D) (McCormick in sod., 2011)	22
Slika 3:	Naravno okuženo jabolko z glivami SBFS	26
Slika 4:	Okuženo jabolko z glivo <i>C. fioriniae</i>	28
Slika 5:	Gniloba peščišča.....	28
Slika 6:	Jablanov škrlup.....	29
Slika 7:	Trosonosci in trosi glive <i>B. cinerea</i> na grozdju	29
Slika 8:	Delež posameznih vrst gliv uporabljenih v testu dvojnih kultur.....	34
Slika 9:	Potek ločevanja in izolacija dveh bioaktivnih spojin	39
Slika 10:	Okolje <i>in vivo</i> poskusa	41
Slika 11:	Plodovi pripravljeni za semi <i>in vivo</i> poskus.....	43
Slika 12:	Morfološke značilnosti glive <i>M. malicola</i>	45
Slika 13:	Kolonija glive <i>M. tardicrescens</i> na PDA gojišču.....	46
Slika 14:	Micelij glive <i>M. tardicrescens</i> na SNA gojišču	47
Slika 15:	Kolonija glive <i>M. mali</i> na PDA gojišču	48
Slika 16:	Micelij na SNA gojišču	48
Slika 17:	Kolonija <i>S. pomi</i> na PDA gojišču.....	49
Slika 18:	Izolat 045/02 (A39) na PDA gojišču.....	49
Slika 19:	Izolat 045/02 (A39) na SNA gojišču.....	50
Slika 20:	Izolat 121/03 (A55) na PDA gojišču.....	50
Slika 21:	Izolat 121/03 (A55) na SNA gojišču.....	51
Slika 22:	Sporulacija na SNA gojišču	51
Slika 23:	Filogenetsko drevo vrst gliv <i>Peltaster</i>	52
Slika 24:	Rezultat testa dvojnih kultur med antagonistično glivo <i>M. tardicrescens</i> in patogeno glivo <i>C. fioriniae</i> po 7 dneh inkubacije	53
Slika 25:	Inhibitorni učinek posameznih vrst gliv potencialnih antagonistov na rast micelija patogene glive <i>V. inaequalis</i> (%).....	55
Slika 26:	Inhibitorni učinek posameznih izolatov vrste <i>S. pomi</i> na rast micelija patogene glive <i>V. inaequalis</i> (%)	56

Slika 27:	Inhibitorni učinek posameznih izolatov vrste <i>Peltaster cerophilus</i> na rast micelija patogene glive <i>V. inaequalis</i> (%).....	57
Slika 28:	Inhibitorni učinek posameznih izolatov vrste <i>M. malicola</i> na rast micelija patogene glive <i>V. inaequalis</i> (%)	58
Slika 29:	Inhibitorni učinek posameznih izolatov vrste <i>Microcyclosporella mali</i> na rast micelija patogene glive <i>V. inaequalis</i> (%).....	58
Slika 30:	Izbrani izolati z največjim inhibitornim učinkom na rast micelija patogene glive <i>V. inaequalis</i>	60
Slika 31:	Izolat A12 <i>S. pomi</i> in <i>V. inaequalis</i> na sredini petrijeve plošče.....	60
Slika 32:	Izolat A55 <i>P. cerophilus</i> in <i>V. inaequalis</i> na sredini petrijeve plošče	61
Slika 33:	Izolat A46 <i>M. mali</i> in <i>V. inaequalis</i> na sredini petrijeve plošče	61
Slika 34:	Izolat A76 <i>D. pseudoamericana</i> in <i>V. inaequalis</i> na sredini petrijeve plošče.....	61
Slika 35:	Vpliv etil acetata na kalitev trosov patogene glive <i>C. fiorinae</i>	64
Slika 36:	Vpliv ekstraktov gliv na kalitev trosov patogene glive <i>C. fiorinae</i>	66
Slika 37:	Kromatogrami glivnega ekstrakta	67
Slika 38:	+ESI LC-TOF-MS kromatogram	67
Slika 39:	Vpliv ekstrakta glive <i>M. tardicrescens</i> na filter diskov na glivo <i>C. fiorinae</i>	68
Slika 40:	Vpliv ekstrakta glive <i>M. tardicrescens</i> na filter diskov na glivo <i>Mucor hiemalis</i>	69
Slika 41:	Zbiranje frakcij ekstrakta glive <i>M. tardicrescens</i>	70
Slika 42:	Preparativni RF-UHPLC kromatogram iz ekstrakta glive <i>M. tardicrescens</i>	70
Slika 43:	Vpliv spojin iz dvojnega vrha pri <i>M. tardicrescens</i> proti <i>C. fiorinae</i>	71
Slika 44:	Vpliv spojin iz dvojnega vrha pri <i>M. tardicrescens</i> proti <i>M. hiemalis</i>	71
Slika 45:	Kromatografski ločba spojine 1	72
Slika 46:	UV spekter in +ESI-TOF-MS spekter spojine 1, tr 7,0 min	73
Slika 47:	Kromatografska ločba spojine 2.....	73
Slika 48:	Masni spekter spojine 2.....	74
Slika 49:	Test MIK pri <i>P. anomala</i>	75

Slika 50:	Test MIK pri <i>C. fioriniae</i>	76
Slika 51:	Povprečne temperature pri izvajanju <i>in vivo</i> testiranja	78
Slika 52:	Povprečna relativna zračna vlaga pri izvajanju <i>in vivo</i> testiranja	78
Slika 53:	Merilec temperature in relativne vlage.....	79
Slika 54:	Začetek <i>in vivo</i> poskusa.....	79
Slika 55:	Jabolka v <i>in vivo</i> poskusu po treh tednih od začetne okužbe	79
Slika 56:	Okužbe z glivo <i>M. malicola</i> na koncu <i>in vivo</i> poskusa	80
Slika 57:	Okužbe z glivo <i>M. tardicrescens</i> na koncu <i>in vivo</i> poskusa	80
Slika 58:	Okužbe z glivo <i>P. cerophilus</i> na koncu <i>in vivo</i> poskusa.....	81
Slika 59:	Okolje za <i>semi in vivo</i> testiranje.....	82
Slika 60:	Antagonistični učinek glive <i>M. tardicrescens</i> na rast nekroze glive <i>C. fioriniae</i> pri sorti Gala	82
Slika 61:	Antagonistični učinek glive <i>M. tardicrescens</i> na rast nekroze glive <i>C. fioriniae</i> pri sorti Gloster.....	83
Slika 62:	Antagonistični učinek glive <i>M. tardicrescens</i> na rast nekroze glive <i>C. fioriniae</i> pri sorti Zlati delišes	83
Slika 63:	Distribucija za inhibicijo pri tretiranju I4 (SAS ..., 1999).....	86
Slika 64:	Distribucija za inhibicijo pri tretiranju I3 (SAS ..., 1999).....	87

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Naprave in pripomočki
- Priloga B: Zbirka vseh izolatov
- Priloga C: Izbrani izolati za test dvojnih kultur
- Priloge D: Meritev radialne rasti patogenih gliv proti izbranim izolatom
- Priloga D1: Meritev radialne rasti glive *C. fioriniae* proti izbranim izolatom
- Priloga D2: Meritev radialne rasti glive *V. inaequalis* proti izbranim izolatom
- Priloga D3: Meritev radialne rasti glive *C. fioriniae* proti izbranim izolatom
- Priloge E: Meritev radialne rasti glive *V. inaequalis* po 14, 21 in 35 dnevih inkubacije
- Priloga E1: Meritev radialne rasti glive *V. inaequalis* po 14 dnevih inkubacije
- Priloga E2: Meritev radialne rasti glive *V. inaequalis* po 21 dnevih inkubacije
- Priloga E3: Meritev radialne rasti glive *V. inaequalis* po 35 dnevih inkubacije
- Priloge F: Opisna statistika učinka etil acetata in ekstraktov na kalitev trosov patogene glive *C. fioriniae*
- Priloga F1: Opisna statistika učinka različnih volumnov (10, 20, 30, 40 µl) dodanega etil acetata na kalitev trosov patogene glive *C. fioriniae*
- Priloga F2: Opisna statistika učinka različnih glivnih ekstraktov na kalitev trosov patogene glive *C. fioriniae*
- Priloge G: Meritve in izračuni *in vivo* testiranja
- Priloga G1: Meritve in izračuni *in vivo* testiranja za *M. malicola*
- Priloga G2: Meritve in izračuni *in vivo* testiranja za *M. tardicrescens*
- Priloga G3: Meritve in izračuni *in vivo* testiranja za *P. cerophilus*
- Priloge H: Testiranja na različnih sortah jabolk
- Priloga H1: Rezultati testiranja pri sorti Gala
- Priloga H2: Rezultati testiranja pri sorti Gloster
- Priloga H3: Rezultati testiranja pri sorti Zlati delišes

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

CBS	Centralna zbirka glivnih kultur (nl. Centraalbureau voor Schimmelcultures)
CYA	Czapekov kvasni agar (ang. Czapek Yeast Agar)
dH ₂ O	destilirana voda
DIC	nefluorescentna mikroskopija (ang. differential interference contrast)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksinukleotid trifosfat
ESI	elektrosprej ionizacija
Glive SBFS	glive sajavosti in mušje pegavosti (ang. sooty blotch and fly speck)
HPLC	visokotlačna tekočinska kromatografija (ang. high pressure liquid chromatography)
HR	preobčutljivostni odgovor (ang. hypersensitive response)
ITMS	masni spektrometer z ionsko pastjo (ang. ion trap mass spectrometry)
ITS	distančniki; zaporedja, ki ločujejo rDNA različnih ribosomskih podenot (ang. internal transcribed spacer)
ITS1	oligonukleotidni začetnik, ki nalega na 5' koncu
ITS4	oligonukleotidni začetnik, ki nalega na 3' koncu
KCl	kalijev klorid
KH ₂ PO ₄	kalijev dihidrogenfosfat (V)
KNO ₃	kalijev nitrat
MgSO ₄ * 7H ₂ O	magnezijev sulfat (IV) heptahidrat
MS	masna spektrometrija
NCBI	Nacionalni center za informacijsko biotehnologijo (ang. The National Center for Biotechnology Information)
NMR	jedrna magnetna resonanca (nuclear magnetic resonance)
PDA	krompirjev glukozni agar (ang. potato dextrose agar)
PDA+	krompirjev glukozni agar z antibiotikom
PIRM	delež inhibicije rasti micelija
RF-HPLC	reverzno fazna HPLC
rPDA	razredčen PDA
RZV	relativna zračna vlažnost
SAR	Sistemska pridobljena odpornost (ang. systemic-acquired resistance)
SNA	sintetično hranilno gojišče (ang. synthetic nutrient poor agar)
TOF	masni analizator glede na čas preleta ionov (ang. time of flight)
UHPLC	tekočinska kromatografija ultra visoke ločljivosti

1 UVOD

Biotično varstvo postaja na področju sodobnega kmetijstva eno od najbolj aktualnih in obetavnih strategij za zatiranje patogenih mikroorganizmov. V zadnjih letih potekajo pospešene raziskave v smeri iskanja potencialnih biozatravnih agensov in zdi se, da je bil na tem področju storjen velik napredek, toda do širše komercialne rabe biotičnih pripravkov na trgu še ni prišlo. Do uspešnega biotičnega varstva prihaja zaradi številnih različnih oblik antagonističnih interakcij med antagonističnimi agensi in patogenimi organizmi. Biotično varstvo, kot hitro razvijajoča se disciplina, predstavlja s svojimi prednostmi in pomanjkljivostmi možno alternativo danes množično uporabljenim kemičnim fitofarmacevtskim sredstvom. Ta so lahko v previsokih odmerkih okolju neprijazna in škodljiva ter bi utegnili ogroziti zdravje potrošnikov.

Mikroorganizmi, ki se jih uporablja kot biotične agense, so del naravno prisotne mikroflore in so splošno znani kot varni ljudem in živalim. Njihove prednosti so predvsem: biorazgradljivost, prijaznost do okolja, specifično delovanje na ciljne organizme, enostavna genetska modifikacija, možnost razvoja v komercialne namene in manjša verjetnost za pojav odpornosti pri patogenu. Po drugi strani je njihova uporaba v naravi omejena, saj so mikrobni biotični agensi občutljivi na neugodne vremenske pogoje (vročina, mraz, ekstremna suhost). Poleg tega je njihova biotična aktivnost manjša v primerih, ko so patogeni že okužili rastline (Droby in sod., 1993). Neučinkovitost biotičnega varstva se pojavi v primeru uporabe biotičnega agensa zunaj lastne ekološke niše. Le-ti so povezani z njihovo učinkovitostjo in sposobnostjo delovanja. Talnim glivam je npr. omejena sposobnost biotične aktivnosti na nadzemnih rastlinskih organih (filosfera) zaradi UV sevanja, izpostavljenosti sončni svetlobi, mrazu in drugim vremenskim pogojem. Zato imajo lahko biotični agensi, adaptirani na filosfero, prednost pred tistimi, ki niso prilagojeni na razmere na površju rastline (Leibinger in sod., 1997).

Rastlinski voski predstavljajo ekstremno neugodno okolje, saj sestojijo iz terpenoidov in n-alkanov, ki lahko delujejo fungistatično ali fungicidno. Večina rastlinskih patogenih organizmov na voskih ne raste, vosek pa lahko naseljuje nepričakovano veliko število specializiranih epifitskih gliv, ki pa so slabo poznane ali še neopisane. Le-te na površju sadežev, npr. na jabolkih, povzročajo temne madeže in jih zato imenujemo glive sajavosti in mušje pegavosti (glive SBFS). Glive SBFS ne povzročajo gnitja plodov, vendar pa zaradi pojava temnih zabarvanj zmanjšujejo tržno vrednost pridelka (Williamson in Sutton, 2000).

Glive SBFS so navzoče na površju zrelih plodov jablane, najdemo jih pa tudi na listih, steblih ter plodovih mnogih drugih rastlinskih vrst. Na površju substratov se lahko razvijejo kolonije različnih gliv SBFS, ki ponavadi mejijo druga na drugo. Nekatere vrste gliv SBFS so sposobne ostro omejiti svoja območja rasti od drugih. Predpostavljali smo, da medsebojno vplivajo druga na drugo bodisi neposredno z antibiozo ali posredno preko tekmovanja za hranila.

Na osnovi opaženih antagonističnih interakcij med glivami SBFS na površju substratov smo raziskovali uporabo gliv SBFS za namene biotičnega varstva rastlin pred patogenimi glivami. V *in vitro* pogojih smo testirali antagonistične sposobnosti izbranih gliv SBFS proti pomembnim rastlinskim patogenom, kot so: jablanov škrlup *Venturia inaequalis* (*V. inaequalis*), gniloba peščišča *F. avenaceum* (*F. avenaceum*), siva plesen *Botrytis cinerea* (*B. cinerea*) ter antraknoza *Colletotrichum fioriniae* (*C. fioriniae*). Izolat glive *Microcyclospora tardicrescens* je pokazal največji antagonistični potencial proti patogeni glivi *C. fioriniae*, zato so nadaljnja testiranja potekala v smeri izolacije in identifikacije tistih sekundarnih metabolitov, ki so povzročili inhibicijo rasti patogene glive *C. fioriniae*.

Cilji doktorske disertacije

1. Osamiti glive iz kompleksa SBFS, ki pri medsebojni interakciji oblikujejo demarkacijske cone, v čistih kulturah in jih taksonomsko in filogenetsko okarakterizirati.
2. Izolirati tiste SBFS glive, ki izkazujejo inhibitorne učinke proti drugim SBFS glivam ter testirati njihove antagonistične sposobnosti proti izbranim patogenim glivam.
3. Preučiti vpliv glivnih ekstraktov na kalitev trosov patogene glive in fitotoksične učinke ekstraktov na listih.

Delovne hipoteze

1. Predvidevamo, da SBFS glive izločajo v okolje sekundarne metabolite, ki lahko inhibirajo rast drugih gliv.
2. Predvidevamo, da bo identifikacija teh sekundarnih metabolitov pokazala njihovo uporabnost pri zatiranju in preprečevanju rastlinskih bolezni.

2 PREGLED OBJAV

2.1 GLIVE SBFS

Prva gliva, povzročiteljica SBFS je bila opisana na plodu jablane na začetku 19. stoletja. Schweinitz (1832) je menil, da sindrom SBFS povzroča le ena gliva - *Dothidea pomigena*. Slabo desetletje pozneje je Colby (1920) odkril dve povzročiteljici: *Leptodontium pomi*, povzročiteljico mušje pegavosti, in *Gloeodes pomigena*, povzročiteljico sajavosti. V naslednjih desetletjih so bile raziskave usmerjene predvsem v preučevanje različnih fenotipskih oblik sajavosti in mušje pegavosti, zato so bile do leta 1997 identificirane zgolj 4 vrste gliv povzročiteljic sindroma SBFS.

Opisovanje novih vrst ni bilo v ospredju, posvetili so se bolj definiranju različnih fenotipskih micelijskih tipov: razvejan (ang. ramosae), pikčast (ang. punctate), razpokan (ang. rimate), sajast (ang. fuliginous) in brazdasto satjast (ang. ridged honeycomb) (Groves, 1933; Batzer in sod., 2005). Ime *Gloeodes pomigena* je za glive sajavosti ostalo v rabi do 90-tih let prejšnjega stoletja, ko so raziskovalci v Severni Karolini popisali tri nove vrste povzročiteljic sajavosti, in sicer *Geastrumia polystigmatis* (*G. polystigmatis*), *Leptodontium elatius* (*L. elatius*) in *Peltaster fruticola* (*P. fruticola*) ter tudi novo vrsto povzročiteljice mušje pegavosti (*Zygophiala jamaicensis* (telomorf *Schizothyrium pomi*)) (Johnson in sod., 1994; Johnson in sod., 1997). Te štiri vrste so veljale za povzročiteljice SBFS do leta 2005, ko je bilo ugotovljenih približno 30 novih vrst gliv SBFS iz zbirke izolatov iz ZDA. Morfološkim študijam so pri identifikaciji dodali molekularne analize ribosomske DNA, in sicer regije notranjega prepisovalnega distančnika (ITS) in regijo 28 S velike ribosomalne podenote (LSU) (Batzer in sod., 2005). Obširno vzorčenje in uporaba molekulskih metod sta pozneje privedla do prepoznavanja približno 50 novih vrst gliv na območju Severne Amerike, vendar je bila večina izmed njih le preliminarno identificirana (Batzer in sod., 2005). Danes poznamo že več kot 60 vrst gliv SBFS. Večino so odkrili v ZDA, vse več vrst pa najdejo in identificirajo tudi v drugih državah (Díaz Arias in sod., 2010). Raziskave se približujejo skupni oceni, da pripadajo glive SBFS večinoma redu Capnodiales (Batzer in sod., 2005; Díaz Arias in sod., 2010; Frank in sod., 2010; Gleason in sod., 2011).

Sindrom gliv SBFS se pojavlja v predelih z visoko zračno vlago (Batzer in sod., 2008). Na SBFS naletimo predvsem na površju zrelih plodov, pa tudi na listih in steblih. Glavnina do sedaj opisanih povzročiteljic SBFS je bila izolirana iz površja zrelih plodov jabolk, zasledili pa so jih tudi pri drugih sadnih vrstah (hruška, banana, pomaranča, papaja, kaki ter pri drugih gojenih in samoniklih rastlinskih vrstah) (Williamson in Sutton, 2000). Glive naseljujejo le voskasto kutikulo in ne prodirajo globlje v plod (Johnson in sod., 1997). Bolezen povzroča madeže, zaradi katerih postane sveže sadje neprimerno za prodajo (Belding in sod., 2000; Batzer in sod., 2002, 2008). Čeprav povzročiteljice SBFS niso zdravju škodljive, se tržna vrednost sadja zmanjša tudi za 90 % (Williamson in Sutton, 2000; Batzer in sod., 2002). Bolezen povzroča največjo gospodarsko škodo pri pridelavi in prodaji jabolk, zato je razumljivo, da je bila večina opisanih povzročiteljic SBFS izolirana iz površja zrelih plodov jabolk (Gleason in sod., 2011).

2.1.1 Ekologija gliv SBFS

Na pojav sajavosti vplivajo temperatura, stopnja relativne zračne vlažnosti (RZV) in količina padavin (Sutton in Sutton, 1994). Sharp in Yoder (1985) sta dokazala pozitivno korelacijo med trajanjem visoke RZV in pojavom sajavosti. Ugotovila sta, da je za nastanek sajavosti potrebnih med 50 do 100 ur pri 95 % relativni zračni vlažnosti (Sharp in Yoder, 1985).

Sutton in Sutton (1994) sta odkrila, da različni micelijski tipi povzročiteljic SBFS različno reagirajo na količino padavin, stopnjo RZV in temperaturo. Prva sta dokazala, da pojavnost in stopnja okuženosti plodov variira glede na okoljske pogoje. Stopnja okuženosti pikastega tipa se je namreč zmanjšala z zvišanjem temperature, z večanjem števila ur izpostavljenosti visoki RZV pa sta se pojavnost in stopnja okuženosti povečali. Pri razvejanem tipu sta se povečali z zvišanjem temperature ter količine padavin, medtem ko je vpliv stopnje RZV variiral. Niti temperatura niti stopnja RZV pa nimata bistvenega vpliva na razvoj sajastega micelijskega tipa.

Stopnja okuženosti in pojavnosti razpokanega tipa ima šibko negativno korelacijo s temperaturo in šibko pozitivno korelacijo s stopnjo RZV. Raziskovanje gliv sajavosti je potekalo tudi *in vitro*. Johnson in Sutton (2000) sta dokazala, da glivi *P. fructicola* in *L. elatius* tudi v *in vitro* okolju reagirata različno na vplive temperature in stopnje RZV. Za rast micelija glive *P. fructicola* je bilo optimalno okolje med 12 in 24 °C, za *L. elatius* pa med 16 in 28 °C. Pri 88 % relativni zračni vlažnosti ni rasla nobena izmed gliv, medtem ko so v intervalu od 95 % do 88 % zračne vlažnosti meritve pokazale inhibitoren učinek. Sporulacija na parafilmu je bila največja pri 97 do 99 % stopnji RZV (Johnson in Sutton, 2000). Trosi glive *L. elatius* so kalili pri večjem temperaturnem razponu (12 do 32 °C) kot trosi glive *P. fructicola* (12 do 24 °C), a trosi *L. elatius* so bili bolj občutljivi na nižjo relativno vlažnost kot trosi glive *P. fructicola*. Slednji so vzklili tudi pri manj kot 95 % stopnji RZV, medtem ko so meritve pokazale, da so trosi *L. elatius* pri 93 % in 95 % vlažnosti kalili le v manjšem obsegu (Johnson in Sutton, 2000). Batzer in sod. (2010) poročajo o šestih vrstah SBFS gliv (*Dissoconium aciculare*, *Colletogloeum* sp. FG2, *Peltaster* sp. PD2, *Sybren* sp. CS1, *Pseudocercospora* sp. RH1, *P. fructicola*). Njihova optimalna rast je med 20 in 25 °C, med 10 in 15 °C rastejo počasneje, nobene rasti pa ni bilo zaznati med 30 in 35 °C.

Raziskovali so tudi vpliv različnih koncentracij jabolčnega soka na morfologijo kolonij gliv v *in vitro* poskusu. Jabolčni sok z 0,6 % fruktoze, 0,25 % glukoze in 3 % saharoze so filtrirali ter sterilizirali, ga dodali k ohlajenemu gojišču v odmerkih 0; 0,01; 0,05 in 0,5 % (Batzer, 2010). Ti odmerki predstavljajo razpon koncentracij sladkorjev zaznanih na kutikuli zrelega ploda jabolka (Wrona in Grabowski, 2004). Razlike v dodanih odmerkih jabolčnega soka so bile jasno razvidne, kazale so se kot spremembe v barvi kolonije, ob tem da so bile nekatere vrste gliv bolj občutljive na spremembe v koncentraciji jabolčnega soka kot druge (Batzer, 2010).

Belding in sod. (2000) poročajo, da glive sajavosti rastejo samo na kutikuli plodu in da ne prodirajo v epidermalne celice skozi kutikulo.. Za rast in razmnoževanje teh gliv morajo biti prisotne na kutikuli vse hranilne snovi. Epifitsko rast gliv lahko omogočajo:

- sestave kutikule (na primer vosek ali kutin),
- zunanji viri: snovi iz okolja, ki se naknadno prilepijo na kutikulo,
- notranji viri: izločene snovi iz ploda, ki prodirajo skozi kutikulo na površje, in so odvisne od prepustnosti kutikule.

Wrona in Grabowski (2004) sta čas nastanka SBFS madežev ali bolezenskih znamenj, ki jih povzročata *P. fructicola* in *Phialophora sessilis*, povezala s povečanjem koncentracije na kutikuli prisotnih sladkorjev. Meritve so izvajali tri zaporedne sezone (med junijem in oktobrom) z naslednjimi parametri: delež sladkorja v jabolčnem soku, pH jabolčnega soka ter koncentracija fruktoze in glukoze na kutikuli. Istočasno so ocenjevali tudi razširjenost okužb na plodu: na 14 dni so iz 50 dreves naključno odvzeli 25 jabolk in popisali njihove stopnje okužb.

Wrona in Grabowski (2004) sta dokazala, da na rast gliv povzročiteljic sajavosti vpliva prisotnost sladkorjev na kutikuli jabolka. Prvi madeži so se pojavili pri koncentraciji fruktoze in glukoze na kutikuli 0,37 mg/dl, pri 10,1 % deležu sladkorja v jabolčnem soku in pH jabolčnega soka 4,4. Pri nadaljnjih meritvah se je delež sladkorjev bistveno povečeval tako v soku kot tudi na kutikuli. Vzrok temu je bila sprememba pH jabolčnega soka. Že Tetlov in Mathew (2004) sta odkrila, da pri vrednosti pH okoli 4,0 bistveno naraste aktivnost encima beta amilaze, ki povzroča razgradnjo kompleksnih sladkorjev v glukozo in fruktozo. Delovanje tega encima je ob ustrezni vrednosti pH (okoli 4,0) povzročilo, da je koncentracija glukoze in fruktoze v obdobju, ko so se pojavili prvi simptomi (med 30. julijem in 15. avgustom), narasla ne le v plodu, ampak tudi na kutikuli (Wrona in Grabowski, 2004).

Schreiber (2001) dokazuje odvisnost koncentracije sladkorjev od okoljskih vplivov (stopnja RZV, temperature) in od pH kutikule. Višja stopnja RZV in temperature povzroča večjo prepustnost kutikule in s tem višjo koncentracijo sladkorjev na njej. Na prepustnost vplivajo tudi sami mikroorganizmi, saj tvorijo ionizirane karboksilne skupine, ki znižujejo pH kutikule. S tem pa se poveča prepustnost kutikule za vodo in v njej razstopljenih hranil (Knoll and Schreiber 1998).

Wrona in Gleason (2005) sta na kutikuli zaznala aminokisline. Pri glivi *P. fructicola* je klitje trosov povzročila 0,1 % koncentracija fruktoze in glukoze; za razvoj micelija pa so bile potrebne aminokisline.

Naso in Kunoh (1987) sta z elektronskim mikroskopom (SEM) preučevala rast glive *Z. jamaicensis* na kutikuli jabolk, hrušk, japonskih kakijev in papaji podobnega tropskega sadeža »pawpaw«. Belding in sod. (2000) so prav tako uporabili elektronski mikroskop za opazovanje rasti gliv *Z. jamaicensis* in *Peltaster fructicola* na kutikuli jabolk. V obeh študijah so ocenili, da je gliva *Z. jamaicensis* ob hifah raztapljala voskaste kristale (vosek). Rast hif je potekala znotraj kutikule, medtem ko je gliva *Peltaster fructicola*

rasla le na površju, raztapljanja kutikule pa ni bilo zaznati (Belding in sod., 2000). Njihove raziskave so dokazale, da glive sajavosti za osnovni vir ogljika ne izkoriščajo epikutikularnih voskov ali aminokislin, temveč bolj verjetno sadne izcedke. Tako so Nasu in Kunoh (1987) ter Belding in sod. (2000) ugotovili, da glive SBFS hranilne snovi pridobivajo iz jabolčnega voska ali iz hranil, ki iz ploda penetrirajo skozi kutikulo. Nadalje so Belding in sod. (2000) glivi *P. fructicola* in *Leptodontidium elatius* kultivirali v petih različnih čistih spojinah, epikutikularnih komponentah jabolčnega voska: heksakozanol, lignocerilni alkohol, nonakosan, oktakozanol in ursolna kislina. Nobena izmed gliv ni rasla, če ni bil dodan razredčen jabolčni sok. Na podlagi tega so zaključili, da so hranila, ki iz plodu prodirajo skozi kutikulo, osnovni vir hrane za glive SBFS.

2.2 GLIVICNE BOLEZNI SADNEGA DREVJA

Pomemben omejitveni dejavnik v sadjarstvu so glivične bolezni. Zmanjšujejo pridelek in kakovost sadja ter povzročajo izgubo tržne vrednosti v času njegovega skladiščenja. Veliko gospodarsko škodo v času dozorevanja plodov v večini sadovnjakov povzroča jablanov škrlup (*Venturia Inaequalis*), medtem ko sta modra (*Penicillium expansum*) in siva plesen (*Botrytis cinerea*) najpomembnejši skladiščni bolezni pečkatega sadja.

2.2.1 Jablanov škrlup (*Venturia inaequalis*)

Andrews in sod. (1983) so testirali antagonistične učinke filofernih mikrobov na *V. inaequalis* in nato izbrali glivo *Chaetomium globosum* (*C. globosum*) kot morebitnega biotičnega kontrolnega agensa. V dvoletnem poskusu v nasadu so Cullen in sod. (1984) v rastni sezoni poškropili listje jablan z glivo *C. globosum* in ugotovili le delno zmanjšanje okužb s škrlupom. Isto strategijo je pred okužbo listov uporabil tudi Burr in sod. (1996). Zatiranje glive *V. inaequalis* na listju je težavno zaradi dolgotrajnega razvoja patogena na listju in plodovih in zaradi neugodnih razmer za ohranitev aktivne populacije nanesenih antagonistov (Burr in sod., 1996).

2.2.1.1 Gostitelj jablanovega škrlupa

Gliva *V. inaequalis* okužuje jablano, samonikle jabolke, glog, okrasne rastline iz rodu *Malus*, japonsko nešpljo in druge rastline. Večjo škodo povzroča le pri rastlinah iz rodu *Malus*. Občutljivost na okužbo z jablanovim škrlupom se lahko razlikuje med sortami jablan, vendar z izjemo novih kultivarjev nanjo ni odporna nobena sorta (Agrios, 2005).

2.2.1.2 Bolezenska znamenja jablanovega škrlupa

Najbolj očitna bolezenska znamenja se kažejo kot pege na listih in plodovih, manj pogosto pa na poganjkih. Jakost bolezenskih znamenj se lahko razlikuje, glede na občutljivost sorte jablane in izolata glive *V. inaequalis*. Gliva okuži obe strani listov, vendar so pege običajno bolj očitne na zgornji (adaksialni) površini lista. Barva peg je olivno-zelena ali rjavo-črna. Žameten videz peg je posledica obilne tvorbe trosonoscev in trosov na okuženem tkivu. V tem času gliva uniči listno tkivo znotraj pege. Pega je izbočena nad površje lista, rahlo nagubana in jo na tej stopnji zlahka prepoznamo. Ob

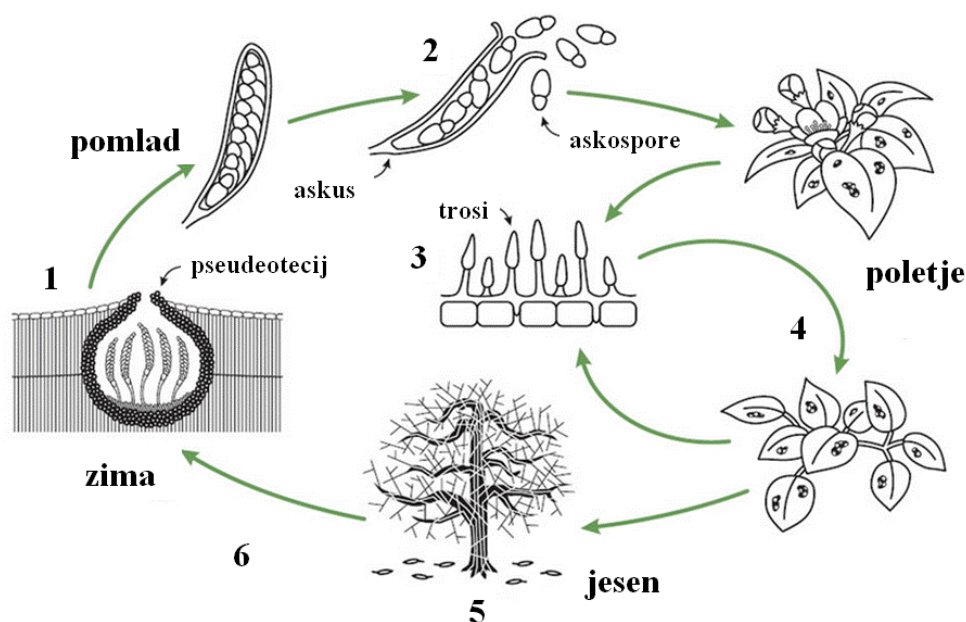
odprtju cvetnih popkov postanejo mladi lističi dovzetni za okužbo z jablanovim škrlupom. Kutikula plodov na področju peg opluteni, s čimer se prepreči izgubo vlage iz plodu (Slika 6). Okužbe zgodaj v rastni dobi lahko uničijo mlado meristemsko tkivo pod kutikulo plodu, kar povzroči njihovo neenakomerno rast in deformiranost (Agrios, 2005).

2.2.1.3 Razvojni krog jablanovega škrlupa

Gliva *V. inaequalis* ima v svojem razvojnem krogu dve fazi. Saprofitska faza poteka v odpadlem okuženem listju. Gliva tvori pozimi na odmrlem listju psevdotecije, v katerih se razvijejo askusi z askosporami. Psevdoteciji so drobna rjavo-črna vrčasta trosišča, ki segajo nad odmrlo povrhnjico odpadlih listov. So hruškaste oblike in imajo na vrhu odprtino (ostiolum). Znotraj vsakega psevdotecija se tvori od 50 do 100 askusov. V vsakem askusu je 8 dvoceličnih askospor. Spomladanske okužbe, ki jih povzročajo askospore, imenujemo primarne okužbe (Agrios, 2005).

Prve zrele askospore bruhajo iz trosišč ob času odpiranja cvetnih popkov. Askospore v peritecijah ne dozoriyo hkrati, zato se bruhanje askospor lahko nadaljuje od 3 do 5 tednov po cvetenju. Veter jih raznese od vira primarne okužbe v razdalji 100 do 200 m. Askospore pristanejo na občutljivih zelenih tkivih in povzročijo okužbo (primarno okužbo) le v primeru, če so listi dovolj časa mokri. Potreben čas omočenosti listja pri posameznih temperaturah sta raziskovala ameriška fitopatologa Mills in La Plante in na tej podlagi sestavila tabelo, s katero se lahko napove čas okužbe in predvidi ustrezen čas škropljenja (Agrios, 2005).

Parazitska faza življenja glive nastopi z okužbo, ko infekcijska hifa askospore prodre v povrhnjico in začne micelij rasti ter tvoriti tanko subkutikularno stromo. Približno 8 do 15 dni po okužbi trosonosci anamorfne faze glive *Spilocaea pomigena* prebijejo povrhnjico in tvorijo velike količine trosov (konidijev), imenovanih tudi sekundarni inokulum, in se širijo z dežjem na druge liste ali majhne plodove v različnih razvojnih fazah ter povzročajo sekundarne okužbe. Vsaka sekundarna okužba bo nato proizvajala več generacij trosov. Hitro in ponavljajoče se nespolno razmnoževanje zagotavlja patogeno, da doseže in poškoduje največjo možno količino listov in tako zmanjša fotosintetsko aktivnost. Vlažnost in temperatura sta najpomembnejša dejavnika pri uravnavanju dozorevanja pseudotecijev, bruhanju askospor in pri kalitvi askospor ter konidijev (Agrios, 2005).



Slika 1: Razvojni krog glive *V. inaequalis* (Carisse in Jobin, 2006)

Figure 1: Disease cycle of *V. inaequalis* (Carisse and Jobin, 2006)

Legenda: 1 - Zreli psevdotečiji bruhajo askospore (primarni inokulum), 2 - Askospore povzročajo primarne okužbe na listih in plodovih, 3 - Tvorba konidijev na škrlupni pegi (nespolna faza), 4 - Širjenje konidijev, ponovne okužbe listov in plodov (sekundarni inokulum), 5 - Začetek spolnega razvojnega cikla v odpadlem listu (spolna faza), 6 - Prezimev glive v nezrelem psevdotečiju.

Legend: 1 - Ripe pseudothecium disseminating ascospores (primary inoculum), 2 - Ascospores causing primary infections on (leaves and apples), 3 - Conidia produced on scab lesions (imperfect stage), 4 - Conidia disseminating to infect more leaves and apples (secondary inoculum), 5 - Two different mycelia mating within dead leaf (perfect stage), 6 - Overwintering of the fungus as immature pseudothecia.

2.2.2 Grenka sadna gniloba (*Colletotrichum* spp.)

2.2.2.1 Pomen bolezni

Bolezni povzročajo glive iz rodu *Colletotrichum*. Rod vključuje več patogenih gliv, povzročiteljic številnih gospodarsko pomembnih bolezni na različnih lesnatih in zelnatih rastlinah. Razširjene so v zmernem, tropskem in subtropskem pasu, kjer prizadenejo številne sadne vrste, vrtnine in žita. Visoka gospodarska škoda nastaja zlasti pri sadnih vrstah z visoko tržno vrednostjo, kot so jagode, mango, citrusi, avokado in banane, pa tudi pri pridelavi kavnih zrn, sladkornega trsa in sirka. Na osnovi njihovega znanstvenega in gospodarskega pomena jih uvrščajo med najpomembnejše fitopatogene glive na svetu (Dean in sod., 2012).

2.2.2.2 Bolezenska znamenja grenke sadne gnilobe

Vrste iz rodu *Colletotrichum* povzročijo značilna bolezenska znamenja, imenovana antraknoza, z značilnim udrtim nekrotičnim tkivom, kjer nastajajo oranžne mase konidijev. Bolezenska znamenja se lahko razvijejo še pred obiranjem, v času zorenja plodov, ali pa na obranih plodovih v skladišču. Zaradi sposobnosti povzročanja

latentnih okužb sodijo te glive med najpomembnejše povzročiteljice skladiščnih bolezni. Prizadenejo predvsem nadzemne rastlinske dele, vendar pa so lahko okuženi tudi podzemni organi (Freeman in sod., 1998).

2.2.2.3 Življenjski cikel grenke sadne gnilobe

Na okuženih plodovih se v trosiščih (acervuli) razvijejo velike množine trosov. Trosi se z vodnimi kapljami raznesejo na še nedozorele plodove, kjer kalijo, tvorijo apresorije in opravijo okužbe. Pri večini sadnih vrst se patogen tekom zime ohrani na odmrlih okuženih poganjkih ter v spečih brstih v obliki micelija in apresorijev. Spomladi se na teh delih razvijejo trosišča s trosi, ki izvršijo primarno okužbo mladih tkiv. Trosi, se pozneje med rastno dobo razvijejo na okuženih rastlinskih delih, in služijo kot vir kužila za sekundarne okužbe plodov. Sklepa se, da lahko patogen preživi in se reproducira epifitsko ali endofitsko, podobno kot v primeru epifitskega nekrotrofičnega življenjskega kroga (Peres in sod., 2005).

2.2.3 Gniloba peščišča

Glive iz rodu *Fusarium* so razširjeni patogeni koruze in malih zrnatih žit (mehka in trda pšenica, ječmen, oves, rž in tritikala) v vseh območjih sveta. Fuzarioza klasov pšenice je ena od najpomembnejših bolezni žit in je povezana z več vrstami gliv iz rodu *Fusarium*, vključno s *Fusarium graminearum* (telomorf: *Gibberella zeae*), *Fusarium culmorum*, prav tako *Fusarium poae*, *Fusarium avenaceum* (*F. avenaceum*), *Fusarium sporotrichoides* in *Microdochium nivale*. Gliva *F. avenaceum* (Nectriaceae, *Gibberella avenacea*) se pojavlja tudi na plodovih jablane, kjer povzroča gnilobo peščišča.

2.2.3.1 Bolezenska znamenja gnilobe peščišča

V Sloveniji so jo med preučevanjem jablanovih nasadov med letoma 2004 - 2006 prepoznali kot edino povzročiteljico gnilobe peščišča. Bolezensko znamenje je bel, roza ali rdeč micelij v peščišču jabolka. Znamenja te bolezni je pokazalo približno 5 % jabolk pri obiranju 21 jablanovih dreves. Z gnilobo peščišča so se v Sloveniji srečevali tudi pri drugih sortah, kot sta na primer Fuji in Jonagold (Schroers in sod., 2008).

Okužbe z glivo *F. avenaceum* predstavljajo gospodarski problem za pridelovalce jabolk in ogroženost za ljudi in živali. Gliva *F. avenaceum* tvori v času širjenja gnilobe velike količine mikotoksinov, ki predstavljajo potencialno tveganje za potrošnike jabolk in njenih predelanih proizvodov. Z optimizirano metodo masne spektrometrije so identificirali 13 metabolitov glive *F. avenaceum*, med njimi na primer moniliformin (Sørensen in sod., 2009). Nekaj let pozneje so tudi v drugih evropskih državah identificirali glivo *F. avenaceum* kot povzročiteljico te bolezni.

2.2.3.2 Povzročitelji gnilobe peščišča

Na Hrvaškem so z vrstno specifično metodo PCR in morfološko identifikacijo potrdili dominantnost vrste *F. avenaceum* kot povzročiteljice gnilobe peščišča na jabolkih.

Hrvaški rezultati so podobni poročilu iz Slovenije (Schroers in sod., 2008) in Grčije (Konstantinou in sod., 2011), le da na Hrvaškem (Sever in sod., 2012) poročajo o večjem številu vrst povzročiteljic gnilobe peščišča. Poleg *F. avenaceum* so identificirali glive *F. crookwellense*, *F. semitectum*, *F. compactum* in *F. pseudograminearum*. Grška študija omenja dve povzročiteljici gnilobe peščišča *F. avenaceum* in *F. proliferatum*, medtem ko slovenska študija in italijansko prvo poročilo opisujeta samo vrsto *F. avenaceum*.

2.3 BIOLOŠKA KONTROLA BOLEZNI SADJA

2.3.1 Vir in tipi biotičnih agensov

Mikroorganizmi se pojavljajo v različnih habitatih. Na rastlinah jih najdemo na površju korenin, stebel, listov, cvetov in plodov. Za opis mikroorganizmov na določeni rastlinski površini se uporabljajo različna imena. Termina kot sta rizosfera in filosfera opredeljujeta mikrofloro, ki jo najdemo na specifičnih delih rastlin, v tem primeru na koreninah in na listih. Izolacija in identifikacija teh mikrobov ter ovrednotenje njihovih antagonističnih lastnosti proti rastlinskim patogenom potencialno predstavlja veliko število biotičnih agensov (Kapooria, 2007).

Baker in Cook (1974) cit. po Zhou in sod. (2007) sta predlagala, da je treba antagoniste iskati tam, kjer so patogeni prisotni oziroma na mestu, kjer se bolezen začne razvijati, a se ne razvije v polnem razmahu. Pozneje so mnogi raziskovalci iz zdravih plodov izolirali ekološko sprejemljive organizme z antagonističnim delovanjem proti patogenom sadja. Preglednica 1 prikazuje izbrane biotične agense in način ter mesto njihove aplikacije za nadzor glivičnih bolezni na jablanah. Izbrani biotični agensi za nadzor sadnih bolezni so bakterije, kvasovke, filamentozne glive in kvasovkam podobne glive.

Preglednica 1: Biokontrolni agensi, njihova aplikacija pri zatiranju glivičnih bolezni pri jablanah (Zhou in sod., 2007)

Table 1: Biocontrol agents, application in control of fungal diseases on apples (Zhou et al., 2007)

Patogen	Biotični agens	Habitat biotične - ga agensa	Metoda	Mesto delo - vanja	Čas inokulacije	Koncen- tracija	Vir
<i>Penicillium expansum</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>						
<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i>	Površina jabolk	Škropljenje	Sadež	Pred obiranjem	10 ⁷ celic kvasovk/ml	Leibinger in sod., 1997
<i>Pezicula malicorticis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>					10 ⁸ celic bakterij/ml	
<i>Penicillium expansum</i>	<i>Candida sake</i> CPA-1	Površina jabolk	Škropljenje/ Pomakanje	Sadež	Pred obiranjem Po obiranju	3x10 ⁶ CFU/ml	Teixido in sod., 1999
<i>Penicillium expansum</i>	<i>Candida sake</i> CPA-1	Površina jabolk	Potapljanje/ Oblivanje	Sadež	Po obiranju	1,6x10 ⁴ ali 1,6 x10 ⁶ CFU/ml	Usall in sod., 2001

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednice 1: Biokontrolni agensi, njihova aplikacija pri zatiranju glivičnih bolezni pri jablanah

Patogen	Biotični agens	Habitat biotične - ga agensa	Metoda	Mesto delo - vanja	Čas inokulacije	Koncen- tracija	Vir
<i>Venturia inaequalis</i>	<i>Chaetomium globosum</i> <i>Aureobasidium pullulans</i>	Površina listov jablane	Škropljenje	Sadež	Začetek v aprilu v eno do dvo tedenskem intervalu	10 ⁶ trosov/ml	Cullen in sod., 1984
<i>Penicillium expansum</i> <i>Botrytis cinerea</i>	<i>Cryptococcus infirmo- miniatus</i> YY6 <i>Cryptococcus laurentii</i> HRA5 <i>Rhodotorula glutinis</i> HRB6	Površina hrušk	Oblivanje/ linijsko škropljenje	Sadež	Po obiranju	4x10 ⁹ celic kvasovk/ml	Chand- Goyal in Spotts, 1997
<i>Botrytis cinerea</i> <i>Penicillium expansum</i> <i>Alternaria</i> sp. <i>Monilia</i> sp.	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Površina jabolk	Pomakanje	Sadež	Po obiranju	4x10 ⁷ celic kvasovk/ml	Spadaro in sod., 2002
<i>Venturia inaequalis</i>	<i>Microsphaeropsis</i> sp.	Odpadli listi jablane	Škropljenje	Padlo listje	Jeseni	4,5x10 ⁵ trosov/ml	Carisse in sod., 2000

2.3.1.1 Bakterije

Najbolj znana primera bakterij za zatiranje skladiščnih glivičnih bolezni sta *Pseudomonas syringae* (*P. syringae*) izolata ESO-10 in ESO-11 (Janisiewicz in Jeffers, 1997), ki predstavljata osnovo biofungicida Bio-Save (EcoScience Corp., ZDA), in se uporabljata za varstvo plodov pečkatega in koščicastega sadja. Bakterija *P. syringae* MA-4, izolirana iz listov jablane, je bila učinkovita proti skladiščnima patogenoma *P. expansum*, povzročitelju jablanove modre plesni, in *B. cinerea*, povzročitelju sive plesni (Zhou in sod., 2002). Poleg vrste *P. syringae* pa je učinkovit bakterijski biotični agens proti povzročiteljem jabolčne gnilobe po obiranju tudi *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) (Leibinger in sod., 1997).

2.3.1.2 Kvasovke

Poleg bakterij so se tudi kvasovke izolirane iz površja sadja izkazale kot dobri biotični agensi. Za namen biotičnega varstva rastlin se uporablja več vrst kvasovk iz rodu *Candida*. *Candida oleophila* (*C. oleophila*) izolat I-182 je biokontrolni agens v pripravku Aspire (Ecogen, INC, ZDA in Izrael). Uporablja se za zatiranje sive in zelene plesni na citrusih in pečkatem sadju. Kvasovki *C. guilliermondii* in *C. saitoana* sta učinkoviti pri nadzoru skladiščnih bolezni (Wisniewski in sod., 1991).

Aureobasidium pullulans je zelo pogosta v filozofiji in je edina kvasovkam podobna gliva poznana kot biotični kontrolni agens na sadju v zmernih podnebnih področjih. Več izolatov *A. pullulans* učinkovito zavira patogene glive na jabolkih, češnjah, jagodah in

namiznem grozdju. V to skupino patogenih gliv spadajo *B. cinerea*, *P. expansum* in *V. inaequalis* (Ippolito in sod., 2000).

2.3.1.3 Filamentozne glive

Nitaste glive se kot biotični agensi pogosto uporabljajo pred obiranjem za zatiranje bolezni sadja v zmernih podnebnih področjih. Bakterije in kvasovke se večinoma uporabljajo za nadzor bolezni po obiranju. Primeri gliv, ki so učinkovite proti pepelovkam na jablani, vinski trti in jagodah so *Ampelomyces quisqualis* (*A. quisqualis*), *Sporothrix flocculosa* sinonim *Pseudozyma flocculosa* (*P. flocculosa*) in *Tilletiopsis* spp. (Grove in Boal, 1997). Biofungicid AQ10 je bil razvit na podlagi glive *A. quisqualis*, *P. flocculosa* pa je osnova biofungicida Sporodex. Pri zatiranju jablanovega škrlupa se v rastni dobi uporablja biotično kontrolni agens *Chaetomium globosum*, kar povzroči zmanjševanje sekundarnih okužb z glivo *V. inaequalis* (Andrews in sod., 1983). Jesenski nanos *Athelia bombacina* in *Microshaeropsis ochracea* je učinkovit pri zmanjševanju spomladanskega primarnega inokuluma *V. inaequalis*, s čimer se zmanjša pojavnost jabolčnega škrlupa (Carisse in Dewdeney, 2002).

2.3.2 Mehanizmi antagonističnega delovanja

Antagonistično delovanje je posledica različnih tipov interakcij med organizmi, pri čemer prisotnost določenih organizmov, poimenovanih biotični kontrolni agensi, deluje antagonistično na patogeni organizem, s katerim vstopajo v različne interakcije. Biotični agensi uporabljajo pri nadzorovanju bolezni rastlin različne mehanizme, ki jih razvrščamo v neposredne in posredne mehanizme antagonističnega delovanja (Krishma in McSpadden, 2006).

2.3.2.1 Neposredni antagonizem

Neposredni antagonizem lahko, glede na mehanizem delovanja, razvrstimo v dve skupini. V prvo skupino uvrščamo mehanizme, ki za svoje delovanje zahtevajo kontakt med antagonistom in patogenim organizmom. Ta kontakt imenujemo mikoparazitizem. V drugo skupino pa uvrščamo mehanizme, ki delujejo na daljavo. Primeri teh mehanizmov so tekmovanje za hranila in prostor, tvorba antibiotikov in toksinov in izločanje encimov, ki negativno vplivajo na razvoj patogena (Krishma in McSpadden, 2006).

Mikoparazitizem

Mikoparazitizem je najbolj neposredna in najbolj raziskana vrsta antagonizma. Obstaja več oblik združenj z neposrednim kontaktom med antagonistično in patogeno glivo. Nekateri mikoparaziti, na primer vrste iz rodu *Arthrobotrys*, uničijo patogeno glivo *Rhizoctonia solani* z neposrednim hifnim prepletom. Drugi mikoparaziti, na primer glive iz rodov *Trichoderma* in *Gliocladium* spp. prodrejo v hife gostiteljskih gliv s kombinacijo mehanskega pritiska preko apresorija, specializiranih hifnih struktur, in

delovanjem litičnih encimov, ki deloma razgradijo celično steno gostiteljske glive in s tem olajšajo penetracijo (Pal in sod., 2006).

Mikoparazitske glive, ki vstopajo v celice gostiteljskih gliv, so invazivne nekrotrofne glive. *Nectria inventa* je invazivna vrsta, napada trose, vegetativne in reproduktivne strukture številnih gliv. V celice vstopi najprej z izločanjem lepljivih snovi, s katerimi se pritrdi na celice, in nato prodre vanje z mehanskim pritiskom preko apresorija. Še en primer invazivne parazitske glive je *Phytium oligandrum*, ki penetrira in raste v notranjosti hif gostiteljev kot sta na primer *B. cinerea* in *Sclerotinia sclerotiorum* (Jeffries in Young, 1994).

Glive rodov *Trichoderma* in *Gliocladium* spp. tvorijo različne hidrolitične encime za razgradnjo celičnih sten, kot so hitinaze, β 1,3-glukanaze in proteaze. Ti encimi imajo pomembno vlogo pri mikoparazitizmu (Schirmbock in sod., 1994). Tvorba teh encimov pri vrstah *T. harzianum* in *G. virens* zavira kalitev trosov glive *B. cinerea* *in vitro* (Lorito in sod., 1994). Vloga endohitinaze pri *T. harzianum* je bila raziskana z uporabo rekombinantnih izolatov glive z več kopijami gena, ki kodira ta encim in s pomočjo genskih motilcev. Raven aktivnosti hitinaze se močno poveča pri izolatih z več kopijami gena, medtem ko genski motilci niso imeli nobenega vpliva na aktivnost encima. Učinkovitost različnih transgenih izolatov glive *T. harzianum* za biotično kontrolo patogenov *Rhizoctonia solani* in *Sclerotium rolfsii* ni pokazala pomembnih razlik v mikoparazitski aktivnosti v primerjavi z običajnimi, netransgenimi izolati (Carsolio in sod., 1999).

A. quisqualis, *T. harzianum* in *M. ochracea* so mikoparazitske glive, ki se uporabljajo kot antagonisti proti pepelastim plesnim (Kiss, 2003). Pritrditev celic antagonistične glive na micelij patogene glive je povezana z razgradnjo celične stene patogena. Encimi za razgradnjo celične stene, zlasti β 1-3 glukanaze, so poznani kot biotični kontrolni mehanizmi tudi pri različnih kvasovkah. Raziskovalci so poročali o lizi celične stene *B. cinerea* z encimom β 1-3 glukanazo, ki ga izločata kvasovki *Pichia guelliermondii* (Wisniewski in sod., 1991) in *Pichia anomala* (*P. anomala*) na jabolkih (Jijakli in Lepoivre, 1998). Do podobnih rezultatov so prišli pri raziskavah o mehanizmu delovanja encima pri glivi *Aureobasidium pullulans* (*A. pullulans*) na jabolkih, namiznem grozdju in drugem sadju (Ippolito in sod., 2000).

V veliki meri je izločanje litičnih encimov pogojeno predvsem s potrebo po razgradnji kompleksnih polimerov za pridobitev hranil, predvsem ogljika. Nekateri izolati bakterij iz rodov *Lysobacter* in *Myxobacteria* tvorijo velike količine litičnih encimov in so učinkoviti pri zaviranju glivičnih rastlinskih patogenov (Bull in sod., 2002).

Tekmovanje za prostor in hranila

Biotični agens v ali na gostiteljski rastlini tekmuje s patogenimi in ostalimi mikroorganizmi za hranila ali prostor. Če antagonist hitreje naseli površje rastline ali uspešneje tekmuje za hranila kot patogeni organizem, potem slednji ne more uspevati v določenem habitatu. Ta vrsta mehanizma ima preventivni učinek, ki zavira razvoj

patogena, vendar ga ne more odstraniti (Fokkerna in sod., 1981). Tudi mikorizna združenja imajo lahko biotični učinek, v kontekstu preprečevanja vstopa patogenov preko korenin (Hooker in sod., 1994). Bakterije, kvasovke in druge nitaste glive lahko inhibirajo patogene glive preko kompeticije za hranila (dušik, ogljik, makroelementi, mikroelementi). Do tega prihaja, po vsej verjetnosti, zaradi boljšega izkoriščanja substrata na gostitelju s strani antagonista v primerjavi s patogenom (Baker, 1991). Mikroorganizmi različno hitro izkoriščajo hrano ali zasedajo prostor. To posledično vodi v rast in razmnoževanje enega mikroorganizma in zaradi pomanjkanja hranil hiranje drugega. Pomanjkanje hranil za rast mikroorganizma se kaže v zmanjšanju hitrosti kaljenja spor patogene glive in v počasnejši rasti micelija, kar posledično pomeni manj okužb in nekroz rastlinskega tkiva (Elad in Steward, 2004).

Hitrost izrabe hranil se med antagonističnimi in fitopatogenimi glivami razlikuje. Celar (2000, 2003) je dokazal, da so antagonistične glive (*Trichoderma* spp., *Gliocladium roseum*) v večini primerov v prvih šestih dneh inkubacije statistično hitreje izrabljale iz gojišča amonijsko obliko dušika, medtem ko so patogene glive iz rodu *Fusarium* hitreje izrabljale nitratno. Poleg tega so bile razlike med antagonisti in fitopatogeni tudi v hitrosti izrabe glukoze. *Fusarium* spp. porabljajo glukozo dosti hitreje kot antagonistične glive, v nasprotju s fitopatogenima glivama *S. sclerotiorum* in *R. solani*, ki porabljata glukozo statistično počasneje od antagonističnih gliv.

Mnogo mikrobov tvori nizkomolekularne kelatorje železovih ionov, imenovani siderofori. Njihov cilj je vezati železove ione iz okolja in jih pretvoriti v obliko, ki je esencialna in dostopna za mikrobo celico. Poleg tekmovanja za hranila in prostor, kot enega izmed mehanizmov delovanja v biotičnem varstvu, pa gre pri tvorbi sideroforov za tekmovanje za železo. V primeru omejene vsebnosti železa v okolju začnejo bakterije tvoriti siderofore z visoko afiniteto za železo. Na ta način železo zasežejo in tako ni več na voljo patogeni glivi, ki posledično omeji svojo rast. Siderofor pioverdin pri rodu bakterij *Pseudomonas* se je izkazal uspešno pri biotičnem varstvu gliv *Pythium* in *Fusarium* (Rosas, 2007).

Tekmovanje za prostor in hranila je eno od najpogostejše citiranih mehanizmov pri biotični kontroli bolezni sadja, zlasti med kvasovkami in patogeni v času skladiščenja. V literaturi je omenjena interakcija med vrstama *S. roseus* in *P. expansum* ter glivo *B. cinerea* na jabolkih (Janisiewicz in sod., 1994).

Antibiotiki in toksini

Antibioza je pojav, ko določen mikroorganizem tvori specifične ali nespecifične metabolite, litične agense in encime, ki preprečujejo rast ter razmnoževanje patogenega mikroorganizma. Antibiotiki so mikrobní toksini. Večina mikroorganizmov tvori in izloča eno ali več spojin z antibiotičnim delovanjem. V nekaterih primerih so se antibiotiki izkazali za še posebno učinkovite pri zatiranju rastlinskih patogenov in bolezni, še zlasti pri zatiranju rasti ciljnega patogena predvsem v *in vitro* ali *in situ* pogojih. Biokontrolni učinek nastopi, ko so v bližini patogenega organizma prisotne zadostne količine proizvedenih antibiotikov (Krishma in McSpadden, 2006).

Večina gliv tvori antimikrobne sekundarne metabolite bodisi kot del njihove normalne rasti in razvoja bodisi kot odziv na biotični stres (parazitizem). Nastajanje toksinov in antibiotikov pri glivah zelo preprosto dokažemo v *in vitro* pogojih. Številni testi z uporabo agarnih plošč so bili razviti za odkrivanje hlapnih in nehlapnih antibiotikov pri potencialnih biokontrolnih agensih ter za njihovo kvantitativno ovrednotenje za uporabo na rastlinskih patogenih. Vrste iz rodu *Trichoderma* so zelo dobro poznani antagonisti in tvorijo številne antibiotike, ki delujejo proti patogenom v *in vitro* pogojih (Ghisalberti in Sivasithamparam, 1991). Sem sodijo na primer peptidni antibiotiki imenovani peptaiboli. Peptaiboli so amfipatični in tvorijo napetostno odvisne ionske kanale v lipidni dvoslojni membrani. Ti so odgovorni za prepustnost membrane oziroma za uhajanje znotrajcelične vsebine, in sicer za izgubo topnih proteinov iz hif, kar posledično vodi v celično smrt (Chugh in Wallace, 2001).

Iskanje biotičnih agensov, ki tvorijo sekundarne metabolite z antibiotično aktivnostjo predstavlja velik izziv za proizvajalce antibiotikov. Pomembno vlogo pri biotičnem varstvu rjave gnilobe koščičastega sadja imajo protiglivni peptidi imenovani iturini, izolirani iz bakterijskega izolata *B. subtilis* B-3 (Gueldner in sod., 1988). Ti so inhibirali micelijsko rast patogena. Antibiotik pirolnitrin, izoliran iz bakterije *Pseudomonas cepacia* izolata LT-4-12W inhibira tako vzklitje kot rast micelija dveh glivnih povzročiteljev bolezni jabolk, in sicer *B. cinerea* in *P. expansum* (Janisiwicz in sod., 1991).

2.3.2.2 Posredni antagonizem

Posredni antagonizem izhaja iz dejavnosti, ki ne vključujejo neposrednega zatiranja patogena z antagonistom. Najbolj posredna oblika posrednega antagonizma je stimulacija obrambnih mehanizmov rastline z nepatogenim biotičnim kontrolnim agensom.

Inducirana odpornost gostiteljske rastline

Rastline se aktivno odzovejo na okužbo s patogenim organizmom, saj imajo lastne obrambne mehanizme. Ti vključujejo tako imenovani preobčutljivostni odgovor (HR), ki povzroči celično smrt v neposredni bližini okuženega mesta. Rastline, namreč, preprečijo nadaljnje širjenje patogenih mikroorganizmov tako, da na okužena območja nalagajo spojine iz svoje celične stene (kaloze in fenole). S tem ustvarijo fizično oviro za nadaljnje širjenje patogena. Poleg tega tvorba posebnih kemikalij s strani rastlin in zvišana encimska aktivnost hitinaz in peroksidaz zavre rast in razvoj patogenih organizmov. Ti obrambni mehanizmi so aktivirani lokalno na mestih okužbe ali v celi rastlini in skupaj tvorijo sistemsko pridobljeno odpornost (SAR), ki predstavlja nespecifični obrambni mehanizem rastline. SAR se sproži preko signalnih molekul, ki se tvorijo med okužbo (Dangl in Jones, 2001). Prisotnost gliv, kot so *Trichoderma* spp., *Pythium oligandrum*, ali nepatogenih izolatov *Fusarium oxysporum* sprožijo nespecifični obrambni mehanizem rastline (Benhamou in sod., 2002).

Poročali so tudi o inducirani odpornosti na povzročitelje sadne gnilobe. Ugotovljeno je bilo, da kvasovka *C. saitoana* povzroča sistemsko odpornost proti patogeni glivi *B. cinerea*. To je razvidno iz zmanjšanja premera nekroz. Gliva *C. saitoana* poveča inducirano odpornost s povišano encimsko aktivnostjo hitinaze in β -1,3-glukanaze v svežih kot skladiščenih jabolkih (El-Ghaouth in sod., 2001).

2.3.3 Epidemiologija in biološka kontrola glivnih bolezni z mikrobnimi antagonisti

2.3.3.1 Jablanov škrup

Pri ekološkem kmetovanju je obvladovanje jablanovega škrupa odvisno od fungicidov na podlagi bakra ali žvepla (Holb in sod., 2003). Uporaba bakra je v Evropski uniji omejena (Council Regulation..., 1991) in pogosto ne daje zadovoljivega varstva. Uporaba bakra lahko privede do fitotoksičnosti, zato so nujno potrebni alternativni varstveni ukrepi. Uporaba mikrobnih antagonistov je lahko alternativa fungicidom za zatiranje jablanovega škrupa (Köhl in sod., 2008).

Raziskave biotičnega zatiranja glive *V. inaequalis* so se osredotočale na zmanjševanje števila askospor v listih, kjer prezimijo kot primarni inokulum. Andrews in sod., (1983) so med prvimi raziskovalci uporabili antagoniste za varstvo pred jablanovim škrupom. Njihov prvi korak je bila izolacija mikroorganizmov iz jablanovih listov, vzpostavitev nove zbirke izolatov ter ocena učinkov teh izolatov na vegetativno rast in kalitev trosov *V. inaequalis*. Skupno so ocenjevali 50 mikroorganizmov in med njimi so se kot najbolj antagonistične glive v *in vitro* testu na agarnih ploščah izkazale: *A. pullulans*, *Trichoderma viride*, *Chaetomium globosum* (*C. globosum*), *Microsphaeropsis olivacea* in dve neznani aktinomiceti. Serije *in vitro* in *in vivo* poskusov (rast na hranilnem agarju, mikroskopsko merjenje dolžine primarne klične hife na agarozno obloženem objektu stekelcu, merjenje velikosti pege in tvorbo trosov na okuženih listih) so dokazale, da je najbolj učinkovit antagonist *C. globosum*. Predvidevali so, da sta glavna mehanizma antagonizma kompeticija za hranila in antibioza.

Študija Burra in sod. (1996) zajema kvasovke in izolate bakterije *Pseudomonas syringae* izolirane iz zelenih brstov v začetku rasti in zdrave ter s škrupom okužene liste. Pobrli in izbrali so tudi listje iz tal sadovnjaka. Majhne listne koščke so zdrobili s skalpelom in jih sprali z destilirano vodo. Pseudotecij glive *V. inaequalis*, ki je prisoten na listih, se je suspendiral v vodi. Različne redčitve suspendiranega pseudotecija so nacepili na PDA gojišče. Biokontrolno aktivnost različnih vrst oziroma izolatov kvasovk na rast glive so spremljali na trdem PDA gojišču. Princip enostavnega testa je na določeni razdalji, na agarni plošči, nacepiti oba mikroorganizma (Spadaro in sod., 2002). Na 90 mm petrijevo ploščo so v ravni črti s cepilno zanko nanесли kvasovko in jo inkubirali 24 ur pri 28 °C. Potem so na piko 5 mm stran od linije kvasovk s pipeto nanесли kapljico (10 μ l) suspenzije trosov glive *V. inaequalis* (10⁵ trosov/ml). Po 24 urni inkubaciji pri 20 °C so pod mikroskopom opazovali, če imajo izolati kvasovk vpliv na kalitev trosov patogene glive (Burr in sod., 1996).

Tudi študija Fissa in sod. (2003) zajema izolirane izolate kvasovk iz zdravega ali s jablanovim škrlupom okuženega lista ali plodu jablane. Izolate so nacepili na gojišče HA (10 g sladni ekstrakt, 4 g kvasni ekstrakt, 4 g glukoze in 15 g agar) in jih inkubirali pri 27 °C. Izolate so ohranili s precepljanjem na vsakih 6 tednov. Tudi povzročitelja jablanovega škrlupa so izolirali iz okuženih jablanovih listov. Okužene regije so suspendirali v 10 µl destilirane vode in dodali 2,5 ml istega medija. 50 µl so nacepili na PDA gojišče in inkubirali 2 meseca pri 18 °C. *In vitro* testiranje potencialnih antagonistov so izvedli s testiranjem inhibitorne aktivnosti kvasnih izolatov na kalitev trosov *V. inaequalis* na mikrotitrski plošči. Najbolj obetavne izolate epifitske kvasovke vrste *Rhodotorula glutinis* so uporabili za *in vivo* poskuse.

Bakterije in kvasovke, ki so dokazale *in vitro* antagonistično aktivnost pri študiji Burra in sod. (1996) so testirali na zmožnost kontrole jablanovega škrlupa. *In vivo* kontrola jablanovega škrlupa se je izvajala na sadikah jablane. Semena, ki so vzkalila, so posadili v lončke, kjer so rasla 3 tedne v rastlinjaku pri 21 °C. Sledila je inokulacija bakterij in kvasovk, ki so v *in vitro* testu dokazale kontrolo pri zaviranju jablanovega škrlupa. Suspenzija inokuluma je vsebovala koncentracijo 10⁹ CFU/ml za bakterije in 10⁷ CFU/ml za kvasovke. Članek Burra in sod. (1996) ne navaja, za katere vrste kvasovk gre. Izolat 508 bakterije *Pseudomonas syringae* se je izkazal za najboljšega pri inhibiciji kalitve trosov glive *V. inaequalis*.

Philion in sod. (1997) so pridobili izolate iz zbirke gliv, katere so vzorčili s površine jabolčnih listov v zgodnje pomladanskem času in pozni jeseni. V *in vitro* poskusu so testirali njihovo sposobnost inhibicije nastajanja askospor. Potencialni biotični agensi so bili izbrani tudi na podlagi njihove sposobnosti koloniziranja listov jablane pod razmeroma hladnimi pogoji, običajno značilnimi za jesenski čas. Izbranih je bilo pet glivnih izolatov glede na njihovo sposobnost inhibicije tvorbe askospor in glede na nadaljnje teste izvedene v sadovnjaku (*Microsphaeropsis* sp., *M. arundinis*, *Ophiostoma* sp., *Diplodia* sp., *Trichoderma* sp.). Najbolj dosledno je zmanjšal tvorbo askospor izolat *Microsphaeropsis* sp.

Gessler in sod. (2000), cit. po Köhl in sod. (2008), so prišli do spoznanja, da lahko *Acremonium strictum* naseli stare škrlupove poškodbe. Ko je bil antagonist pod nadzorovanimi pogoji nanešen na poškodbe jablanovega škrlupa, je zmanjšal sporulacijo *V. inaequalis*. Nanašanje v sadovnjakih ni imelo nobenega učinka na patogena.

Poročilo Köhla in sod. (2008) navaja uporabo antagonistov za biotično zatiranje glive *V. inaequalis*. Potencialni antagonisti so bili izolirani iz okuženega listja z jablanovim škrlupom, nato pa je bil ocenjen njihov potencial za zmanjševanje tvorbe trosov *V. inaequalis* na sadikah jablan pod nadzorovanimi pogoji. Štirje izolati *Phoma pinodella* H3, *Coniothyrium cereale* H33, *Cladosporium sphaerospermum* H35 in *Cladosporium cladosporioides* H39 so povzročili bistveno zmanjšanje sporulacije *V. inaequalis* na mladih ali starejših listih, vendar je učinkovitost teh antagonistov variirala v poznejših eksperimentih. Zmanjšanje tvorbe trosov glive *V. inaequalis* ni bilo statistično značilno v vseh ponovitvah eksperimenta, zato so sklepali, da utegne imeti *C. cladosporioides* H39 obetaven potencial za zatiranje jablanovega škrlupa.

2.3.3.2 Grenka sadna gniloba

Biotično varstvo dosega lepe uspehe z uporabo antagonističnih mikroorganizmov za obvladovanje skladiščnih bolezni (Wilson in sod., 1993). Grenko gnilobo je po obiranju moč obvladovati s kvasovkam podobnimi glivami, npr. *Cryptococcus laurentii* (*C. laurentii*). Blum in sod. (2005) so preizkušali učinkovitost *C. laurentii* za preprečevanje gnitja jabolk Fuji in Gala. Potem ko so sadeže z imerzijo obdelali, so jih skladiščili v laboratoriju (15-20 °C / 60-70 % vlage). Patogeno glivo *Glomerella cingulata* so nanegli v koncentraciji 10^2 trosov ml^{-1} , kvasovke pri 10^7 celic ml^{-1} in fungicide v odmerku 150 mg/l. *C. laurentii* je bil enako učinkovit pri zmanjševanju gnitja jabolk kot fungicida tiabendazol in iprodion. Uporaba *C. laurentii* ni vplivala na čvrstost mesa niti na skupno vsebnost topnih trdnih snovi sadja (Blum in sod., 2005).

Ugotovljena je bila učinkovitost izolatov vrst kvasovk *A. pullulans* in izolata kvasovke *Metchnikowia pulcherrima* (*M. pulcherrima*) proti glivi *Colletotrichum acutatum* (*C. acutatum*). Izolati kvasovk, ki so jih nabrali v sadovnjakih na Novi Zelandiji, so inhibirali nastanek poškodb grenke sadne gnilobe na jabolkih. Jabolka so obrisali s 96 % etanolom, potem pa so sadje ranili s sterilno iglo 4 mm globoko. Na rano so s pipeto nanegli 10 μl alikvotirane suspenzije kvasovk in 10 μl izolata patogena. Štirje izolati kvasovke *A. pullulans* so zmanjšali bolezen jabolk po obiranju, medtem ko izolat kvasovke *M. pulcherrima* ni pokazal antimikrobne aktivnosti. Povečevanje koncentracije izbranih kvasovk je zmanjšalo velikost poškodb. Kvasovke, ki so bile nanešene pred patogenom, so zmanjšale velikost poškodb, kot v primeru nanosa po patogenu. Največje zmanjšanje razvoja poškodb so dosegli z živimi celicami kvasovk, opranimi in uporabljenimi v sterilni vodi brez dodatkov hranil. Ekstrakti celic kvasovk niso zmanjšali nastajanja poškodb (Boyd- Wilson in sod., 2006).

Antagonistični izolat kvasovk *M. pulcherrima* T5-A2 je bil uporabljen v kombinaciji s toploto in obdelavo z 1-metilciklopropen (1-MCP), inhibitorjem etilenskega receptorja, ki upočasnjuje zorenje jabolk in predvidoma podaljšuje delovanje naravnih obrambnih mehanizmov za zatiranje grenke sadne gnilobe (*C. acutatum*) in modre plesni (*P. expansum*) na jabolkih sorte Zlati delišes pod nadzorovanimi atmosferskimi pogoji. Tretiranje z 1-MCP je povečala širjenje nekroze grenke gnilobe in modre plesni, medtem ko je bila obdelava okuženih plodov z 1-MCP skupaj z antagonistom in toploto bolj učinkovita. Grenko gnilobo je učinkovito zatrl antagonist, modro plesen pa termična obdelava (Leverentz in sod., 2003).

2.4 UPORABNOST ANTAGONISTIČNIH ORGANIZMOV NA POLJU

2.4.1 Odpornost na stres v okolju

Uspešen potencialni biotični agens mora biti sposoben prenašati pomanjkanje hranil, UV sevanje, izsušitve, hitre klimatske spremembe in prisotnost agrokemičnih sredstev (Leibinger in sod., 1997). Epifitske filamentozne glive ali kvasovke so najprimernejši antagonisti, ki se uporabljajo v filiosferi in karposferi. V primerjavi s kvasovkami in glivami bakterije težje prenašajo težke okoljske pogoje (Andrews, 1992), vendar nekatere bakterije (npr. *Pseudomonas* spp., *B. subtilis*) lahko ob prisotnosti vode ali z

zelo visoko stopnjo vlažnosti nadzorujejo nekrotrofne patogene v sadovnjaku in med skladiščenjem (Leibinger in sod., 1997). Običajno se populacija bakterij na gostiteljski rastlini hitro zniža in je nezadostna za nadzor bolezni, zato so potrebne pogostejše, tedenske aplikacije bakterij (Fokkema, 1993). Poleg tega bakterije hitreje rastejo na poškodovanih rastlinskih tkivih kot na nepoškodovanem sadnem površju (Smilanick in sod., 1993). Ultravijolično sevanje je škodljiv dejavnik za mikrobno kolonizacijo rastlinskega površja, saj izpostavljenost spor neposrednemu UV sevanju na listnem površju zmanjša njihovo sposobnost preživetja (Rotem in sod., 1985).

Zaščita pred UV žarki je prisotna predvsem pri kvasovkah in bakterijah, in sicer s tvorbo zunajceličnih polisaharidov, ki tvorijo celične kapsule ali se kopičijo okoli kolonije kot sluzi, prav tako pa tudi s tvorbo pigmentov. Izveden poskus na namiznem grozdju je pokazal, da se je naravna populacija bakterij in kvasovk (vključno s kvasovkam podobnimi glivami), obsevanih z nizkim odmerkom UV-C žarkov povečala, medtem ko pri nitastih (filamentoznih) glivah tega ni bilo zaznati (Nigro in sod., 1998). Zelo zanimiv primer uporabe manipuliranega mikrobnega antagonista za boljšo adaptacijo na polju in v hladnih skladiščnih razmerah je populacija celic kvasovke *C. sake*, tolerantne na nizko vodno aktivnost v okolju. Med spremljanjem na terenu se je koncentracija le-teh povečala, medtem ko je koncentracija nemodificiranih celic po nanosu na jablane ostala relativno nespremenjena (Teixido in sod., 1998).

2.4.2 Kolonizacija površja plodov

Bistvena lastnost dobrega biotičnega agensa je njegova sposobnost koloniziranja in preživetja na ciljnem gostiteljskem tkivu. Kolonizacija gostiteljskega površja je pomemben in večplasten proces. To pomeni, da se mora uspešen biotičen agens bodisi dobro razviti v karposferi preden tja prispe patogen, bodisi morajo biti ob upadu populacije antagonista, produkti, ki sprožijo okužbo (npr. hranila, v primeru *B. cinerea*) odstranjeni iz gostiteljskega površja (Ippolito in Nigro, 2000).

Slab komercialni uspeh biotičnih agensov je verjetno povezan z njihovo nezadostno sposobnostjo koloniziranja površja gostitelja. Antagonisti morajo doseči visoko stopnjo rasti tako pod ugodnimi pogoji vlažnosti, temperature in hranilnih snovi kot tudi v mejnih pogojih (npr. pri nizki temperaturi ali pri nizkem vodnem potencialu). Glivi *A. pullulans* in *Rhodotorula glutinis*, nanešeni na jabolka, sta pokazali veliko prilagodljivost v času dozorevanja plodov in v času dolgotrajnega, šest mesečnega skladiščenja. V nasprotju s temi opažanji je populacija *B. subtilis* sprva dobro preživela v sadovnjaku, vendar se je populacija po 24 dneh zmanjšala in naposled je po pet mesečnem skladiščenju ni bilo več zaznati na površju jabolk (Leibinger in sod., 1997).

2.5 SEKUNDARNI METABOLITI

Sekundarni metaboliti so spojine, ki niso nujno potrebne za rast organizmov, lahko pa zagotovijo glivi ekološko prednost v določenih okoljih. Poznamo dva tipa mikrobnega metabolizma. Primarni metabolizem je metabolizem v času eksponentne rasti celice, medtem ko se tvorijo sekundarni metaboliti v tako imenovani idiofazi. To je faza rasti, ki sledi fazi pospešene rasti (eksponentna faza). Nastopi pa zaradi pomanjkanja hranil,

npr. dušika ali fosforja in lahko presnovljivega vira ogljika. Sekundarni metaboliti so med najbolj kompleksnimi in pomembnimi metaboliti, vključujejo regulatorje rasti pri rastlinah (npr. giberilini), farmacevtsko uporabne spojine (npr. penicilin, lovastatin), barvila (npr. karotenoidi) in mikotoksine (npr. trihoteceni, fumonizini, aflatoksini, ohratoksini) (Keller in sod., 2005).

Njihova dejanska vloga je še vedno predmet razprav med znanstveniki, verjetno pa je pri različnih skupinah organizmov lahko zelo raznolika. Pozornost privabljajo zaradi zanimive in značilne strukture, predvsem pa zaradi praktične pomembnosti, tako v pozitivnem (antibiotiki) kot v negativnem smislu (toksini). Za tvorbo sekundarnih metabolitov organizmi uporabljajo predvsem spojine, ki izhajajo iz primarnega metabolizma. (Martin in sod., 2005).

Sekundarni metaboliti so produkti mikroorganizmov, živali in rastlin. Predpostavlja se, da je razpon bioloških aktivnosti sekundarnih metabolitov zelo širok. Služijo lahko kot signali »quorum« zaznavanja, ki sprožijo diferenciacijo celic ali tvorbo patogenih determinant (Martin in sod., 2005). Sekundarni metaboliti izvirajo kot derivati iz različnih intermediatov primarnega metabolizma.

Večina teh spojin nastane iz petih glavnih metabolnih virov (Vey in sod., 2001):

- aminokislin,
- pot šikiminske kisline za biosintezo aromatskih aminokislin,
- poliketidna biosintezna pot iz acetil koencima A (CoA),
- pot mevalonske kisline iz acetil koencima A in
- polisaharidi in peptidopolisaharidi.

Glivni metaboliti imajo različne naloge, odvisno od ekološke niše glive. Metaboliti so lahko antibiotiki za zaščito biotičnega agensa proti antagonističnim mikroorganizmom. Nekateri pa preprečijo rast saprofitskih mikrobov na gostitelju, tako da ga uničijo, in s tem izboljšajo preživetje biotičnega agensa. Zlasti mikoparaziti lahko izkoristijo to strategijo za izpodrivanje rastlinskih patogenov ali skladiščnih bolezni. Nekateri bioaktivni presnovki so prav tako pomembni dejavniki patogenosti (Vey in sod., 2001).

2.5.1 Mikotoksini

Mikotoksini so strukturno raznolika skupina spojin z majhno molekulsko maso. Nastajajo predvsem pri sekundarnem metabolizmu nekaterih filamentoznih gliv. Ob primernih pogojih, kot sta temperatura in vlaga, se lahko razvijejo na različnih živilih in krmi, kar pa povzroči resna tveganje za zdravje človeka in živali. Mikotoksini so sekundarni metaboliti, ki nimajo biokemičnega pomena pri rasti in razvoju gliv, vendar pa se razlikujejo od preprostih C₄ spojin, npr. moniliformin do kompleksnih snovi kot so fomopsini (Dinis in sod., 2007). Izraz mikotoksin izhaja iz leta 1962, ko je pri odpravljanju posledic nenavadne veterinarske krize blizu Londona v Angliji umrlo približno 100.000 puranov. Skrivnostno X bolezen puranov so raziskovalci povezali s kikirikijevim (arašidovim) obrokom kontaminiranim s sekundarnim metabolitom iz glive *Aspergillus flavus* (aflatoksin) in tako prišli do spoznanja, da bi lahko bil ta glivni metabolit smrtonosen (Bennett in Klich, 2003).

Poznanih je več kot 300 mikotoksinov, raziskovalna pozornost je usmerjena predvsem na tiste mikotoksine, ki so se izkazali za rakotvorne in/ali toksične. Ljudje so lahko izpostavljeni mikotoksinom prvenstveno z uživanjem živil pridobljenih iz rastlin, kontaminiranih s toksini, posledično s prenosom mikotoksinov v proizvode živalskega izvora (meso, jajca, mleko) (Mycotoxins..., 2003). Mikotoksini lahko preidejo v organizem skozi kožo, s fizičnim kontaktom z glivo ter preko dihalnih poti, z vdihavanjem toksigenih trosov v zraku. Bolezni, ki jih povzročajo mikotoksini pri ljudeh in živalih, imenujemo mikotoksikoze (Richard, 2007).

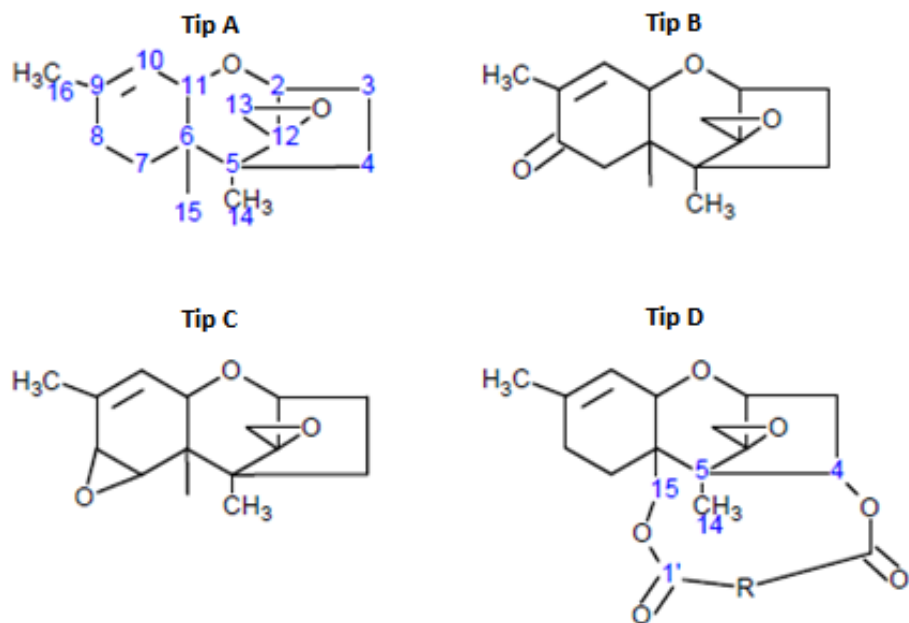
2.5.1.1 Trihoteceni

Trihoteceni spadajo v skupino seskviterpenoidov, ki jih tvorijo glive iz rodov *Fusarium*, *Myrothecium*, *Phomopsis*, *Stachybotrys*, *Trichoderma*, *Trichothecium* in še nekaterih drugih. Izoliranih je bilo več kot 200 različnih trihotecenov. Izraz trihotecen prihaja iz trihotecina, ki je bil eden prvih identificiranih spojin iz skupine seskviterpenoidnih sekundarnih metabolitov. Glede na različno biosintezo se trihoteceni delijo v štiri različne skupine. Trihoteceni tipa A, B, C in D imajo skupno osnovno strukturo, ki je sestavljena iz treh cikličnih obročev in dodatne epoksidne skupine na mestu C-12. Trihoteceni tipa A so najpreprostejši in imajo na mestu C-8 vezan atom vodika ali stransko verigo z estrsko skupino. Tip B se od tipa A razlikuje po tem, da ima na mestu C-8 vezano ketonsko skupino. V skupini tipa A in B trihotecenov spada okoli 100 dobro poznanih različnih toksinov. T-2 toksin, neosolaniol (NEO) in diacetoksiscirpenol (DAS) sodijo v skupino tipa A in fusarenon-X, nivalenol (NIV) in deoksinivalenol (DON) v skupino tipa B. Za trihotecene tipa C je značilna dodatna epoksidna skupina na mestih C-7,8. Trihoteceni tipa D so makrociklični trihoteceni. Vsebujejo makrociklični obroč povezan z dvema estrskima verigama na mestih C-4 in C-15 (McCormick in sod., 2011).

2.5.1.2 Strupenost

Strupenost mikotoksinov trihotecenov se razlikuje glede na njihovo molekulsko strukturo, še posebej glede na število in vrsto toksičnih skupin. Toksičnost trihotecenov narašča z naraščanjem števila estrskih skupin. Npr. T-2 toksin (izjemno toksičen, 3 estrske skupine) je veliko bolj strupen kot trihotecin (1 estrska skupina), trihotecin pa je bolj toksičen kot trihotecolon, ki nima nobene estrske skupine (Nishie, 1989).

Trihoteceni sodijo v skupino toksičnih spojin s številnimi inhibitornimi učinki na eukariotske celice (Rocha in sod., 2005), saj gre za močne inhibitorje sinteze proteinov, DNA in RNA (Rocha in sod., 2005). T-2 toksin je najbolj toksičen trihotecen, medtem ko je deoksinivalenol (DON) najbolj razširjen mikotoksin po vsem svetu v pridelkih namenjenih prehrani ljudi in živali (Hymery in sod., 2006).



Slika 2: Štirje tipi trihotecenov (tip A, B, C, D) (McCormick in sod., 2011)
 Figure 2: Four types of trichothecene metabolites (A, B, C, D) (McCormick et al., 2011)

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Testni mikroorganizmi

Pri našem delu smo uporabljali izolate gliv SBFS, ki smo jih vzorčili in trajno shranili v glivni zbirki na Kmetijskem inštitutu Slovenije. Poleg teh smo uporabili še referenčne izolate *Microcyclospora pomicola* (*M. pomicola*), 1 izolat, *Devriesia pseudoamericana* (*D. pseudoamericana*), 1 izolat in *Microcyclosporella mali* (*M. mali*), 4 izolati, iz tuje centralne zbirke glivnih kultur (CBS) in referenčne zbirke glivnih kultur na Kmetijskem inštitutu Slovenije.

V naši raziskavi smo prav tako uporabili patogene izolate trajno shranjene v zbirki na Kmetijskem inštitutu, in sicer patogene glive *C. fioriniae*, *V. inaequalis*, *B. cinerea* in *F. avenaceum*.

Druge uporabljene izolate *B. subtilis*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *P. anomala*, *Mucor hiemalis* (*M. hiemalis*), *Candida tenui* (*C. tenui*) in *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) smo pridobili iz zbirke kultur na inštitutu HZI (Helmholtz Centre for Infection Research, Department Microbial Drugs) v Nemčiji.

3.1.2 Splošna mikrobiološka gojišča

Splošna, neselektivna gojišča, kot so krompirjev glukozni agar (PDA), razredčen PDA (rPDA), PDA z dodanim antibiotikom in sintetično hranilno gojišče smo uporabili za izolacijo gliv iz biološkega materiala, za trajno shranjevanje, za makro in mikro morfološke opise kultur, za pridobivanje glivne biomase potrebne za izolacijo DNA in za pridobivanje inokuluma gliv. Hranilna gojišča smo pripravili po spodaj navedenih recepturah ter jih sterilizirali v avtoklavu 20 minut pri 121 °C in pritisku 1,1 bar.

3.1.2.1 PDA

Gojišče smo pripravili po recepturi proizvajalca Difco (ZDA). V tehtalni posodici smo natehtali 42 g krompirjevega glukoznega agarja. V reagenčno steklenico smo prenesli natehtano sestavino, ji dopolnili do 1 l deionizirane vode in mešalni magnet. S segrevanjem in mešanjem na mešalnem grelcu smo raztopili krompirjev glukozni agar v vodi. Avtoklaviranje je potekalo 20 minut pri 121 °C in pritisku 1,1 bar.

3.1.2.2 Krompirjev glukozni agar z antibiotiki

Gojišče, krompirjev glukozni agar z antibiotiki (PDA+), smo pripravili tako kot zgoraj opisano PDA gojišče, z razliko v tem, da smo predhodno zatehtali v spodnji preglednici zapisana antibiotika in jih raztopili v 10 ml destilirane vode. Sterilnemu gojišču PDA ohlajenemu na 45-50 °C smo skozi sterilni filter premera 0,22 µm dodali 10 ml raztopine.

Preglednica 2: PDA+ (Gams in sod., 1998)

Table 2: PDA+ (Gams et al., 1998)

Sestavina	Proizvajalec	g/l d H ₂ O
PDA	Difco, ZDA	42
penicillin G	Sigma, Nemčija	12,1 mg/l
streptomycin sulphate	Sigma, Nemčija	54,2 mg/l

3.1.2.3 Razredčen PDA

Razredčeno gojišče (rPDA) nismo pripravili po recepturi proizvajalca Difco (ZDA). Uporabili smo 14 g/l dH₂O gojišča PDA, namesto 42 g kot priporoča proizvajalec, in 10 g/l dH₂O tehničnega agarja proizvajalca Biolife (Italija).

Preglednica 3 rPDA

Table 3: dPDA

Sestavina	Proizvajalec	g/l d H ₂ O
PDA	Difco, ZDA	14
Tehnični agar	Biolife, Italija	10

3.1.2.4 Sintetično hranilno gojišče (SNA)

Recepturo in postopek priprave sintetičnega hranilnega gojišča (SNA) smo povzeli po Gams in sod. (1998).

Preglednica 4: SNA (Gams in sod., 1998)

Table 4: SNA (Gams et al., 1998)

Sestavina	Proizvajalec	g/l dH ₂ O
KH ₂ PO ₄	Merck, Nemčija	1
KNO ₃	Merck, Nemčija	1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	Merck, Nemčija	0.5
KCl	Merck, Nemčija	0.5
Glukoza	Kemika, Hrvaška	0.2
Saharoza	Kemika, Hrvaška	0.2
Tehnični agar	Biolife, Italija	15

3.1.3 Gojišče za določanje biokontrolne aktivnosti gliv in njihovih ekstraktov

Za testiranje biotične aktivnosti gliv in njihovih ekstraktov smo uporabili naslednja gojišča: Czapekov kvasni agar (CYA), MYC in BAC gojišče. Poleg teh pa smo uporabili za pridobivanje inokuluma bioaktivne glive še tekoče kvasno gojišče s sladom. Gojišča smo avtoklavirali 20 minut pri 121 °C in pritisku 1,1 bar. Pri nekaterih gojiščih smo pred avtoklaviranjem uravnali pH gojišč s 1M HCl ali 1M NaOHna predpisano vrednost.

Preglednica 5: CYA

Table 5: CYA

Sestavina	Proizvajalec	g/l dH ₂ O
Czapek – Dox – Broth	Difco, ZDA	35
Kvasni ekstrakt	Biolife, Italija	5
Tehnični agar	Biolife, Italija	15
pH = 6,0-6,5		

Preglednica 6: Tekoče kvasno gojišče s sladom
Table 6: Liquid yeast malt agar

Sestavina	Proizvajalec	g/l dH ₂ O
Kvasni ekstrakt	Carl Roth, Nemčija	4
Sladni ekstrakt	Carl Roth, Nemčija	10
Glukoza	Cerestar, Nemčija	4

pH = 6,3

Preglednica 7: MYC gojišče
Table 7: MYC medium

Sestavina	Proizvajalec	g/l dH ₂ O
Pepton	Difco, ZDA	10
Glukoza	Cerestar, Nemčija	10
Pufer HEPES (*)	Roth, Nemčija	11,9
Tehnični agar	BD Bacto™	18

(*) HEPES 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetan sulfonska kislina

pH = 7,0

Preglednica 8: BAC gojišče
Table 8: BAC medium

Sestavina	Proizvajalec	g/l dH ₂ O
Pepton	Difco, ZDA	5
Glukoza	Cerestar, Nemčija	5
Kvasni ekstrakt	Carl Roth, Nemčija	1
Mesni ekstrakt	Carl Roth, Nemčija	1
Pufer HEPES (*)	Roth, Nemčija	11,9
Tehnični agar	BD Bacto™	16

(*) HEPES 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetan sulfonska kislina

pH = 7,0

3.1.4 Kemikalije in reagent

Uporabljene kemikalije in reagent so prikazani v Preglednici 9.

Preglednica 9: Uporabljene kemikalije
Table 9: Chemicals used in the study

Reagenti	Proizvajalec in izvor
Agaroz	SeaKem® LE, ZDA
Destilirane voda, DNase/RNase Free	Gibco, ZDA
dNTP	Promega, ZDA
Etanol 96 %	Merck, Nemčija
Taq PCR pufer brez MgCl ₂ , z (NH ₄) ₂ SO ₄ ⁻	Fermentas, ZDA
Taq DNA polimeraza	Fermentas, ZDA
ethyl acetate for organic residue analyses	J.T. Baker, Nemčija
Gene Ruler™ 100bp Plus DNA lestvica	Fermentas, Nemčija
Tween 80	Biolife, Italija
Natrijev hipoklorit (13 % Cl)	Kemika, Hrvaška

3.1.5 Naprave in drugi pripomočki

Pri delu smo uporabljali standardno laboratorijsko opremo, naprave in pripomočke. Seznam naprav in pripomočkov je v Prilogi A.

3.1.6 Začetni oligonukleotidi potrebni za DNA amplifikacijo

Preglednica 10: Začetni oligonukleotidi pri PCR reakciji (White in sod., 1990; de Hoog in Gerrits van den Ende, 1998; Vilgalys in Hester, 1990)

Table 10: Primers used in PCR reactions (White et al., 1990; de Hoog in Gerrits van den Ende, 1998; Vilgalys and Hester, 1990)

Ime oligonukleotidnega začetnika	Sekvenca začetnega oligonukleotida (5'-3')	Ta *	Orientiranost	Vir
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	55 °C	Levi	White in sod. (1990)
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	55 °C	Desni	
V9G	TTAAGTCCCTGCCCTTTGTA	58 °C	Levi	de Hoog in Gerrits van den Ende (1998)
LR5	ATCCTGAGGGAAACTTC	58 °C	Desni	Vilgalys in Hester (1990)

Ta * - Temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov

3.2 METODE

3.2.1 Vzorčenje gliv SBFS

Jabolka, okužena z glivami SBFS, smo vzorčili septembra in oktobra leta 2009, 2010 in 2011. Zrela jabolka s simptomi SBFS (Slika 3) smo vzorčili predvsem iz neškropljenih domačih vrtov in zapuščenih dreves na različnih lokacijah po Sloveniji, nekaj vzorcev pa smo prejeli iz Črne gore. Kraji vzorčenja so bili različni (Bertoki, Brdo pri Lukovici, Filovci, Limbarska gora, Morača, Nova Gorica, Podbrezje, Podutik, Poljanska dolina ob Kolpi, Predgrad, Sostro, Stari trg pri Ložu, Trbovlje, Trebnje, Čepље, Vesela gora, Želimlje itd.). Nahajališča vzorcev so podana v Prilogi B. Vzorce smo prinesli na Kmetijski inštitut Slovenije in pričeli z izolacijo gliv, ali pa smo plodove shranili do uporabe na 4 °C za največ en mesec.



Slika 3: Naravno okuženo jabolko z glivami SBFS

Figure 3: Natural infected apple with SBFS fungi

3.2.1.1 Izolacija in trajno shranjevanje gliv SBFS

Izolirali smo bolezenska znamenja SBFS, ki v paru tvorijo razmejitveno črto ali jasni linijski stik na površju jabolka. Pred tem smo koloniji SBFS sterilizirali s 70 % alkoholom namočenim v sterilno bombažno gazo. Najmanjši možni košček kolonije smo prenesli na PDA + agarno ploščo. Po petih dneh inkubacije smo košček micelija iz kolonije, ki je zrastle na hranilnem gojišču, precepili na SNA gojišče (Gams in sod., 1998) in inkubirali sedem dni pri 23 °C. Iz kolonij, ki so zrastle na gojišču, smo pripravili enotrosne izolate ali izolate iz vršičkov posameznih hif. Vsi izolirani in trajno shranjeni izolati so prikazani v Prilogi B. Seznam 83 izbranih izolatov SBFS uporabljenih v študiji pa je prikazan v Prilogi C.

Priprava enotrosnih izolatov

Po sedmih dnevih inkubacije gliv na SNA gojišču smo pod lupo z iglo odstranili trose in jih prenesli z linijsko inokulacijo na novo PDA+ gojišče. Pod mikroskopom smo poiskali posamezne trose in jih točkovno označili. Petrijevo ploščo smo inkubirali pri 23 °C pet ur in nato pod lupo preverili kalitev trosov, jih izrezali skupaj s koščkom gojišča in prenesli na novo ploščo s PDA hranilnim gojiščem. Čez dva dni smo iz posameznih kolonij s skalpelom izrezali košček micelija in ga trajno shranili na poševno SNA, rPDA in PDA hranilno gojišče v epruvetah, ki se uporabljajo za trajno shranjevanje kultur.

Priprava izolatov iz vršičkov posameznih hif

Po sedmih dnevih inkubacije nekateri izolati gliv SBFS na SNA gojišču niso sporulirali, zato smo pod lupo izrezali vršiček posamezne hife in ga prenesli na novo agarno ploščo s PDA gojiščem. Čez dva dni smo s skalpelom izrezali košček micelija in ga trajno shranili na poševno SNA, rPDA in PDA hranilno gojišče v epruvetah, ki se uporabljajo za trajno shranjevanje kultur.

3.2.2 Vzorčenje rastlinskih patogenih gliv

V naši raziskavi smo uporabili izolate trajno shranjene v zbirki na Kmetijskem inštitutu, in sicer vrst *C. fioriniae*, *V. inaequalis*, *B. cinerea* in *F. avenaceum*.

3.2.2.1 *Colletotrichum fioriniae* R.G. Shivas & Y.P. Tan

Septembra 2011 smo iz sadovnjaka na Brdu pri Lukovici vzorčili plodove jablane z znamenji antraknoze. Povzročiteljica antraknoze na jabolkih so glive iz rodu *Colletotrichum*. Značilno bolezensko znamenje na plodovih so udrte nekrotične pege z oranžnimi skupki trosov, ki so koncentrično razporejeni po površju pege.



Slika 4: Okuženo jabolko z glivo *C. fioriniae*
Figure 4: Apple infected with fungus *C. fioriniae*

3.2.2.2 *Fusarium avenaceum* Sacc.

Septembra 2011 smo iz sadovnjaka na Brdu pri Lukovici vzorčili plodove jablane z znamenji gnilobe peščišča. Gnilobo peščišča povzroča tudi gliva *F. avenaceum*. Značilno bolezensko znamenje gnilobe peščišča je bel do rožnat micelij v predelu peščišča. Od tu se gniloba širi proti površju ploda.



Slika 5: Gniloba peščišča
Figure 5: Core rot

3.2.2.3 *Venturia inaequalis* G. Winter

Septembra 2009 smo iz sadovnjaka na Brdu pri Lukovici vzorčili zrela, z jablanovim škrlupom okužena jabolka. Povzročiteljica bolezni jablanovega škrlupa je gliva *V. inaequalis*. Bolezenska znamenja so motne črne pege.



Slika 6: Jablanov škrlup
Figure 6: Apple scab

3.2.2.4 *Botrytis cinerea* Pers.

Septembra 2010 smo v Ljubljani iz domače trte vzorčili zrelo grozdje okuženo s sivo plesnijo, ki jo povzroča gliva *B. cinerea*. Sivo rjava bolezenska znamenja prekriva gost sivo bel micelij s trosi. Vzorec smo shranili v hladilniku na 4 °C in naslednji dan izolirali povzročiteljico bolezni.



Slika 7: Trosonosci in trosi glive *B. cinerea* na grozdju
Figure 7: Conidiophores and conidia of *B. cinerea* on grape

3.2.2.5 Izolacija patogenih gliv

C. fioriniae, *V. inaequalis* in *B. cinerea*

V laboratoriju smo pod lupo s konico skalpela prenesli skupek trosov na gojišče PDA+ in izolirali posamezne trose kot je opisano v poglavju 3.2.1.1 (Priprava enotrosnih izolatov).

Fusarium avenaceum

Košček zračnega micelija glive smo prenesli na PDA+ agarno ploščo. Po enem dnevu inkubacije pri 23 °C smo košček micelija iz kolonije, ki je nastala na umetnem gojišču, precepili na SNA gojišče (Gams in sod., 1998) in inkubirali 10 dni pri 23 °C. Po tem času je gliva začela tvoriti sporodohije. Pod lupo smo s konico skalpela prenesli malo inokuluma trosov iz trosišč, v kapljico vode na objektu stekelcu. Nadaljnji postopek je enak zgoraj opisanemu.

3.2.3 Taksonomske analize

Taksonomske analize smo izvedli na morfološkem in molekularnem nivoju.

3.2.3.1 Morfološke analize

Makromorfološki opis

Za opis kultur smo izolate iz rodov *Microcyclospora*, *Microcyclosporella*, *Schizothyrium* inkubirali na PDA gojišču pri 23 °C in izolate iz rodu *Peltaster* pri 20 °C v temi. Na 14. dan inkubacije smo izmerili premer kolonije (hitrost rasti), po 30 dneh pa smo določili barvo micelija, barvo kolonije na spodnji strani agarne plošče, strukturo kolonije, rob kolonije in premer kolonije.

Mikromorfološki opis

Za opis mikromorfoloških znakov smo izbrali 2 izolata glive *P. cerophilus* (121/03 in 045/02), 1 izolat glive vrste *M. malicola* (029/01), 1 izolat glive *M. tardicrescens* (145/02) in 1 izolat glive *M. mali* (170/02). Izolata *P. cerophilus* smo inkubirali 7 dni na SNA gojišču pri 20 °C, ostale vrste pa smo inkubirali pri 24 °C. Po 7 dnevih inkubacije smo košček kolonije položili na krovno stekelce z vodo in mikroskopsko opazovali morfološke znake. Vse preparate smo mikroskopirali s svetlobnim mikroskopom Zeiss Imager in pri tem uporabljali nefluorescentno mikroskopijo DIC in jih dokumentirali z digitalno kamero Zeiss AxioCam MRc5, povezano z računalniškim programom AxioVision V4.8.2.0.

3.2.3.2 Osnovne molekularne metode

Identifikacija izolatov SBFS in izolata iz rodu *Colletotrichum* temelji na ustvarjenih zaporedjih DNA notranjih kopiranih ločitvenih regijah jedrske ribosomske DNA (ITS rDNA) in je primerjana z že shranjenimi podatki v javno dostopnih bazah podatkov (na primer Genbank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) skozi Blast iskalnik. Glivo *C. fioriniae* smo identificirali, poleg analize nukleotidnega zaporedja regije ITS, tudi z analizo regije dela gena za β – tubulin.

Izolacija genske DNA s kitom Zymo Research - Fungal/Bacterial DNA Kit™

Izmed 200 izoliranih izolatov smo poljubno izbrali 83 izolatov glede na micelijski tip na jabolku (Priloga C). Izolate smo inokulirali na PDA gojišče in jih inkubirali 14 dni pri 23 °C. Po 14 dneh smo svež micelij prenesli v mikrocentrifugirko (2ml) z dodano kovinsko kroglico (proizvajalec) in homogenizirali s homogenizatorjem (Qiagen Tissue Lyser) 1 minuto pri frekvenci 30 tresljajev na sekundo. Homogeniziranemu miceliju smo dodali 750 µl liznega pufru, ponovno homogenizirali še 1 minuto in nato centrifugirali 1 min pri 16.000 obr/min. Supernatant smo prenesli v priloženo Zymo-SpinTM kolono. Pri tem smo pazili, da nismo prenesli precipitata. Kolone z vzorci smo centrifugirali 1 minuto pri 7000 obr/min. Kolone smo zavrgli in filtratu dodali 1200 µl pufru za vezavo (Fungal/Bacterial DNA Binding Buffer). 600 µl mešanice smo nanесли na Zymo-SpinTM IIC kolono in centrifugirali 1 minuto pri 10000 obr/min. Filtrat smo zavrgli in ponovili zadnji korak. Zymo-SpinTM IIC kolono smo prenesli na novo mikrocentrifugirko in nanесли 200 µl pufru za predspiranje (DNA Pre-Wash Buffer) ter centrifugirali 1 minuto pri 10000 obr/min. Ponovno smo zavrgli filtrat in na kolono nanесли 500 µl pufru za spiranje (DNA Fungal/Bacterial Wash Buffer) ter centrifugirali 1 minuto pri 10000 obr/min. Zymo-SpinTM IIC kolono smo prenesli na novo 1,5 ml mikrocentrifugirko in na sredino dodali 50-100 µl elucijskega pufru (DNA Elution Buffer) in centrifugirali 30 s pri 10000 obr/min. Izolirano DNA smo takoj uporabili ali pa smo jo shranili v zmrzovalniku na -20 °C.

Gelska elektroforeza

Z agarozno gelsko elektroforezo smo preverili uspešnost verižnih reakcij s polimerazo. Gostota gela je znašala 1 % (w/v). 1 g agaroze smo vmešali v 120 ml 0,5x TBE pufru in jo s segrevanjem raztopili v mikrovalovni pečici. V rahlo ohlajeno raztopino agaroze smo dodali 2,5 µl etidijevega bromida in gel vlili v kadičko. Po strditvi gela smo v posamezno vdolbinico nanесли vzorce pripravljene po spodnji recepturi in jih s pipeto prenesli v lukjice na gelu. 5 µl produkta PCR, pomešanega s 3 µl 6-kratnega nanašalnega pufru (0,025 % brom-fenol modro barvilo).

V prvo vdolbinico smo nanесли lestvico, sledila je negativna kontrola (PCR mešanica plus 1 µl vode namesto DNA vzorca) in vzorci. Elektroforeza je potekala pri stalni napetosti 100 V v 0,5 x TAE pufru. Po končani elektroforezi smo gel prenesli pod UV transiluminator in ga fotografirali s pomočjo Kodak digitalne kamere 40, podprte z računalniškim programom Kodak Digital science Image Analysis Software.

Preglednica 11: Priprava lestvic in vzorcev
Table 11: Preparation of ladder and samples

Priprava lestvice		Priprava vzorcev	
Lestvica	2 µl	PCR pomnožek	5 µl
6x nanašalni pufer	2 µl	6x nanašalni pufer	3 µl
dH ₂ O	4 µl		

Pomnoževanje dela nukleotidnega zaporedja s PCR in sekvenciranje

Za pomnožitev zaporedja regij ITS1, 5'6S in ITS2 smo uporabili začetna

oligonukleotida ITS1 in ITS4. Prav tako smo enaka oligonukleotidna začetnika uporabili pri obojestranskem sekvenciranju.

Pri nekaterih izolatih regije ITS ni bilo mogoče v celoti sekvencirati z začetnima oligonukleotidoma ITS1 in ITS4, zato smo pomnožili drug fragment v območju med 3' koncu drugega fragmenta 18S rRNA gena, ITS1, 5,8 S rRNA gena, ITS2 in prvih 900 baz od 5' koncu gena 28S rRNA z začetnima oligonukleotidoma VG9 in LR5 ter sekvencirali z ITS1 in NL4.

Sestavine, ki smo jih potrebovali za 50 µl reakcijo so:

➤ Destilirana voda	36,3 µl
➤ Taq PCR pufer	5 µl
➤ 2 mM MgCl ₂	3 µl
➤ 0.2 mM dNTP	4 µl
➤ 0.5 mM začetni oligonukleotid	0,25 µl
➤ 0.5 mM začetni oligonukleotid	0,25 µl
➤ Taq DNA polimeraza	0,20 µl
➤ DNA	1 µl
Volumen	50 µl

Reakcija je potekla v treh stopnjah. Začne se z denaturacijo pri temperaturi 94 °C in poteka 1 minuto. Sledi ji 35 ciklov po naslednjem vrstnem redu: denaturacija pri 94 °C (1 min), vezava začetnih oligonukleotidov pri 55 °C (50 s) in sinteza komplementarne verige pri 72 °C (2 min). Reakcijo smo končali s podaljšano sintezo komplementarne verige pri 72 °C (6 min).

Določanje in analiza nukleotidnega zaporedja

Obojestransko sekvenciranje PCR produktov z oligonukleotidnima začetnikoma ITS1 in ITS4 ali v nekaterih primerih z ITS1 in NL4 so izvedli v podjetju MacroGen (www.macrogen.com).

Dve nasprotni si sekvenci istega vzorca smo spojili s pomočjo programa. Eno zaporedje smo naredili reverzno komplementarno in kjer sta se zaporedji prekrivali, smo ju združili v eno. Potem smo ročno uredili oziroma pregledali sekvenco s primerjanjem zaporedja in ustreznim kromatogramom, prejetim od Macrogena. V nadaljevanju smo uporabili program BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), ki je algoritem za primerjavo nukleotidnih ali aminokislinskih zaporedij, in primerjali dodane sekvence z objavljenimi nukleotidnimi zaporedji gliv v bazi podatkov GenBank (Standard..., 2013). Vse sekvence smo poenotili glede na dolžino in jih v programu Mega 5 poravnali in iz njih naredili filogenetsko drevo (Tamura in sod., 2007).

Za filogenetsko analizo nukleotidnega zaporedja notranjega prepisnega vmesnika ITS (ITS1, 5,8S in ITS2 rDNA) smo v poravnavo vključili nukleotidna zaporedja testiranih

gliv pridobljena iz baze podatkov GenBank.

3.2.3.3 Filogenetska analiza

Za hevristično iskanje najkrajšega možnega drevesa z analizo varčnosti (MP, ang. Parsimony) smo uporabili program PAUP, verzija 4b10. Uporabili smo metodo varčnosti, ki temelji na neurejenih znakih z enako težo, prazni prostor smo tretirali kot manjkajoči podatek. Postopek premeščanja vej začetnih dreves smo izvedli s 1000 ponovitvami. Za analizo zaporedij iz regije ITS smo omejili število dreves na 1000. Premeščanje vej je potekalo po metodi razreza in ponovnega združevanja (TBR). Vrednost hevristične podpore BS (podpora s samovzorčenjem, ang. bootstrap value) kladu smo testirali s po 1000 ponovitvami z enakimi parametri, postopoma smo dodali 100 dodatnih sekvenc. Vzorčili smo največ 1000 dreves na ponovitev.

Standardni nukleotidni substitucijski model ugotavljanja drevesa z Bayesovo metodo smo izračunali v programski opremi MrBayes 3.2.2 (Ronquist in sod., 2012) s šestimi substitucijskimi tipi gama korekcije, vključenih v GTR model z gama porazdelitvijo.

Posteriorne verjetnosti cepitev smo iskali z algoritmom MCMC (Markov Chain Monte Carlo). Hkrati smo vzorčili drevesa iz vsake od štirih markovskih verig. Program MrBayes je tekel 5.000.000 generacij. Vzorčili smo vsakih 100 generacij in začeli s poljubno izbranim drevesom. Zavrgli smo prvih 12.500 povzorčenih dreves in iz ostalih sestavili 50 % večinsko drevo soglasja, ki v primeru ITS temelji na 15.000 drevesih. Statistično podporo kladov nam prikazujejo posteriorne verjetnosti (p. v.).

Izdelavo drevesa po metodi največjega verjetja (ML, ang. Maximum likelihood) smo naredili s programom PhyML 3.0 (Guindon in sod., 2010) na ATGC spletni strani (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>). Za iskanje drevesa največjega verjetja smo izbrali GTR model nukleotidnih substitucij in razporeditev variranja razmerja porazdelitve gama. Vrednosti podpore BS smo izračunali s po 1000 ponovitvami.

3.2.4 Test dvojnih kultur

Zaviralni učinek 83 izbranih izolatov SBFS na izolate patogenih gliv je bil testiran s prilagojenim testom dvojnih kultur (Hinton in Parry, 2008). Izolati gliv SBFS so bili izbrani v skladu s petimi tipi micelija, ki jih tvorijo glive SBFS na površju jabolka (Batzler in sod., 2005).

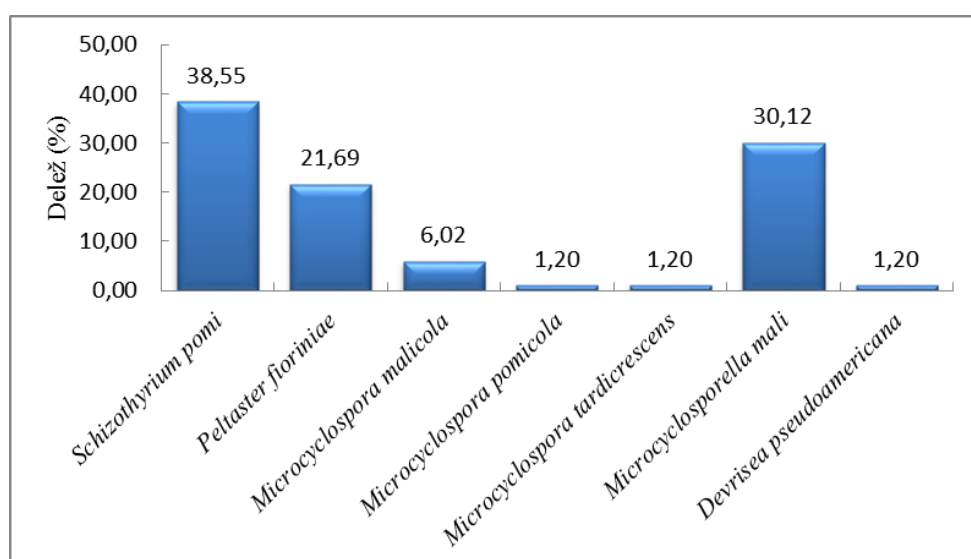
Število izolatov znotraj posamezne vrste je bilo različno. Od vseh 83 izolatov je bilo največ izolatov (32 oziroma 38,6 %) glive *S. pomi*. Preko 20 % izolatov so predstavljali še izolati gliv *M. mali* in *P. cerophilus*. Gliva *M. malicola* je bila v našem poskusu zastopana s petimi izolati. Pri preostalih glivah, *M. pomicola*, *M. tardicrescens* in *D. pseudoamericana* pa smo imeli v poskus vključenih zgolj po en izolat. Antagonistični potencial posameznega izolata smo izrazili z deležem inhibicije rasti patogenih gliv.

Preglednica 12: Skupno število izolatov različnih vrst gliv SBFS vključenih v test dvojnih kultur

Table 12: Total number of strains from different species of SBFS fungi included in dual culture assay

Vrste gliv	Število izolatov
<i>Schizothyrium pomi</i>	32
<i>Peltaster cerophilus</i>	18
<i>Microcyclospora malicola</i>	5
<i>Microcyclospora pomicola</i>	1
<i>Microcyclospora tardicrescens</i>	1
<i>Microcyclosporella mali</i>	25
<i>Devriesia pseudoamericana</i>	1
Skupaj	83

Delež posameznih gliv je prikazan na Sliki 8.



Slika 8: Delež posameznih vrst gliv uporabljenih v testu dvojnih kultur

Figure 8: Percent of individual fungi used in the dual culture assay

3.2.4.1 Določanje skupnega števila trosov v suspenziji trosov

Koncentracijo suspenzije trosov smo določili s pomočjo Bürker-Türkovega hemocitrometra. Suspenzijo trosov smo pripravili do ustrezne koncentracije trosov/ml. Na Bürker-Türkove hemocitrometer smo nanegli 10 µl suspenzije trosov v dH₂O. Pod mikroskopom smo prešteli število trosov (n) v 16 kvadratih velikosti 1/25 mm² in s spodnjo enačbo izrazili skupno število trosov na ml (Enačba 1).

$$n * 10^4 = n \text{ trosov/ml} \quad \dots(1)$$

3.2.4.2 Priprava suspenzije trosov patogenih gliv

Izolate patogenih gliv *C. fioriniae* in *B. cinerea* smo nacepili na PDA gojišče, *F. avenaceum* pa na SNA gojišče ter jih inkubirali 10 dni pri 23 °C. V tem času se je

začela tvorba trosov. S pinceto smo prenesli trose v epruveto s sterilno destilirano vodo in premešali na vrtinčniku. S pomočjo Bürker – Türkovega hemocitometra smo določili koncentracijo trosov v suspenziji in jo uravnali na 1×10^4 trosov /ml.

3.2.4.3 Test dvojnih kultur med izolati gliv povzročiteljic SBFS in glivami *C. fioriniae*, *F. avenaceum* in *B. cinerea*

Koščke agarja, preraščenega z micelijem (premer 5 mm) smo s plutovrtom izrezali iz 13 dni starih kultur gliv SBFS na PDA agarnih ploščah in jih obrnjene navzdol prenesli na površje CYA agarnih plošč v oddaljenosti 1,5 cm od roba petrijevke premera 9 cm. Glive SBFS smo inkubirali 4 dni v temi pri 23 °C. Po 4 dneh smo iz suspenzije trosov z iglo točkovno inokulirali patogena na sredino agarne plošče. Rast patogene glive smo merili po 7 dnevih inkubacije v temi pri 23 °C.

3.2.4.4 Test dvojnih kultur med izolati gliv povzročiteljic SBFS in glivo *V. inaequalis*

Inokulacija gliv SBFS je potekala na enak način kot pri ostalih testih dvojnih kultur, z razliko v tem, da smo položili koščke agarja z micelijem gliv SBFS na površje CYA agarnih plošč v oddaljenosti 2,5 cm od roba petrijevke premera 9 cm. Glivo SBFS smo inkubirali 4 dni v temi pri 23 °C. Iz 7 dni stare kolonije glive *V. inaequalis* na PDA ploščah smo izrezali koščke agarja z micelijem velikosti 3 x 3 mm in jih prenesli na sredino CYA agarnih plošč. Inhibitorne učinke gliv SBFS na rast glive *V. inaequalis* smo merili po 14, 21 in 35 dnevih inkubacije v temi pri 23 °C.

V testu smo v vsaki agarni plošči izmerili kontrolno radialno micelijsko rast patogena v nasprotni strani od antagonista. Prav tako smo preverili rast patogenih gliv v absolutnih kontrolnih ploščah, vendar razlik v rasti micelija patogene glive med obema kontrolama nismo zaznali.

Test smo naredili v treh ponovitvah. Odstotek inhibicije rasti micelija (PIRM) je bil izračunan po naslednji formuli (Lahlali in Islamski, 2010):

$$\frac{100 \cdot (R1 - R2)}{R1} \quad \dots(2)$$

R1 = radialna micelijska rast patogena v nasprotni strani od antagonista (mm),
R2 = radialna micelijska rast patogena na testni agarni plošči proti potencialni antagonistični povzročiteljici SBFS (mm)

Končne vrednosti podatkov so srednje vrednosti treh ponovitev.

Podatke o antagonistični aktivnosti za vse testirane izolate smo statistično obdelali s programom Microsoft Excel.

3.2.5 Test določitve inhibitornih učinkov ekstraktov na kalitev trosov

3.2.5.1 Priprava ekstraktov

Iz zbirke gliv SBFS (Priloga B) smo vzeli izolate vrst *M. malicola*, *M. tardicrescens* (145/02), *M. mali* (408/07), *S. pomi* in *P. cerophilus* (121/03). Nato smo jih linijsko inokulirali na gojišče CYA in inkubirali 12 dni pri 23 °C.

Nato smo s plutovrtom premera 5 mm izrezali 27 koščkov micelija z agarjem iz treh kolonij. Iz ene kolonije smo izrezali 3 agarne koščke okrog inokulacijske črte, na sredini kolonije, in šest koščkov micelija z agarjem z roba kolonije. Koščke smo prenesli v 30 ml vialo ter dodali organsko topilo etil acetat kot navajajo Anderson in sod. (2005), in sicer 9 agarinih koščkov za 1 ml etil acetata. Ekstrakcija je potekala 60 minut z ultrazvočno kopeljo. Ekstrakt smo predstavili v svežo 4 ml vialo in evaporirali organsko topilo. Suh ekstrakt smo stehali in ga pri prvem poskusu raztopili v organskem topilu etil acetat. Koncentracija glivnega ekstrakta je bila 1 mg/ml pri vseh testiranih izolatih.

3.2.5.2 Priprava inokuluma patogene glive

Izolat glive *C. fioriniae* smo nacepili na rPDA gojišče (Poglavje 4.1.2.3) in inkubirali 10 dni, da se je micelij glive v tem času lepo razrastle ter začel tvoriti trosišča in trose. S pinceto smo prenesli trose v epruveto s sterilno destilirano vodo in premešali na vrtinčniku. S pomočjo Bürker – Türkovega hemocitometra smo uravnali koncentracijo trosov v suspenziji na 1×10^4 trosov /ml.

3.2.5.3 Izvedba poskusa

Na petrijevo ploščo SNA gojišča smo s plutovrtom premera 10 mm označili površino, na katero smo nanесли 30 µl glivnega ekstrakta raztopljenega v organskem topilu.

Negativna kontrola je vsebovala petrijevo ploščo z gojiščem SNA in dodanim različnim volumnom etil acetata: 10, 20, 30 ali 40 µl ali s sterilno dH₂O. Na gojišče smo nanесли 10 µl suspenzije trosov, v kateri je bilo okrog 100 trosov. Zanimal nas je vpliv glivnih ekstraktov in različen volumen dodanega etil acetata na rast hif patogene glive.

Merili smo čas kalitve trosov patogene glive in rast klične hife v negativni kontroli z etil acetatom in vodo ter v tretiranih vzorcih z različnimi glivnimi ekstrakti po 4, 6, 8, 12, 13. urah po inokulaciji s suspenzijo trosov patogene glive. Rezultate smo dokumentirali s svetlobnim mikroskopom, opremljenim z digitalno kamero Axiocam MRc.

Fotografirali smo večje število primarnih kličnih hif na tretiranje v določenem času in kasneje izmerili dolžino kličnih hif s pomočjo računalniškega programa Axio Vision 3.1. Dobljene podatke smo pripravili in uredili s programom Excel 2007 in rezultate statistično obdelali s programskim paketom SAS/STAT 1999.

Testirali smo vpliv negativne kontrole (etil acetat) na kalitev trosov v primerjavi z negativno kontrolo z dodano vodo in vpliv glivnih ekstraktov raztopljenih v etil acetatu na kalitev trosov glive *C. fioriniae*.

3.3 ANALIZE SEKUNDARNIH METABOLITOV

3.3.1 Analitske tehnike

Spojine v ekstraktu glive *M. tardicrescens* smo ločili in identificirali s tekočinsko kromatografijo sklopljeno zaporedno z detektorjem z nizom diod (DAD) in masno spektrometričnim detektorjem (ESI-TOF-MS ali ESI-IT-MS).

3.3.1.1 HPLC-DAD

HPLC-DAD je tekočinska kromatografija visoke ločljivosti s spektrofotometričnim detektorjem z nizom diod. Je najpogostejše in najširše uporabljena kromatografska metoda. Temelji na ločitvi posameznih komponent v vzorcu, ki poteka na osnovi porazdelitve med mobilno (mešanica organskih topil in vode) in stacionarno (kromatografska kolona) fazo zaradi različnih fizikalno kemijskih lastnosti. Spojine se ločeno eluirajo in potujejo na detektor z nizom diod (DAD), ki pod določenimi pogoji snema UV spektre eluiranih spojin. Kadar je stacionarna faza polarna (npr. silika gel) govorimo o normalno fazni (NF) kromatografiji, kadar pa je stacionarna faza nepolarna (C18) govorimo o reverzno fazni (RF) kromatografiji.

UHPLC je tekočinska kromatografija ultra visoke ločljivosti (višji tlaki, manjši delci stacionarne faze, manjši pretok mobilne faze, boljša ločba); uporabili smo jo za ločbo spojin v glivnem ekstraktu.

Za frakcionacijo spojin smo uporabili preparativno HPLC (manjši tlaki, večji delci stacionarne faze, večji pretok mobilne faze), ker z njo dobimo večje količine posameznih frakcij, ki jih pozneje lahko uporabimo za nadaljnje analize.

3.3.1.2 ESI-IT-MS

UHPLC smo povezali z masnim spektrometrom z ionsko pastjo (IT-MS) (Amazon, Bruker) opremljenim z ionizacijskim izvorom z elektrorazprševanjem (ESI). Podatke smo zajemali v pozitivni in negativni ionizaciji v razponu od 100 do 1000 m/z. IT-MS smo uporabili pri prvem analiznem tesiranju bioaktivnega ekstrakta glive *M. tardicrescens*, kjer smo detektirali spojine v pozitivni in negativni ESI.

3.3.1.3 ESI-TOF-MS

ESI-TOF-MS je masni analizator visoke ločljivosti z ESI ionizacijo in detektorjem na čas preleta ionov. Od ionskega izvora ioni potujejo do masnega analizatorja, kjer se ločijo na podlagi razlik v njihovi kinetični energiji tako, da merimo njihov čas preleta (zato izraz time-of flight). Ione na detektorju zaznamo pri določeni masi oziroma

razmerju med maso in nabojem na vsaj tri decimalna mesta natančno. Z omenjeno tehniko smo lahko določili molekulsko maso in posredno elementno sestavo spojin.

3.3.2 Analitski postopki

3.3.2.1 Ekstrakcija sekundarnih metabolitov

Takson z najvišjo vrednostjo PIMG smo najprej 10 dni kultivirali na PDA gojišču pri 23 °C. Šest agarnih koščkov z micelijem smo prenesli v 250 ml elermajerice s 100 ml tekočega kvasnega gojišča s sladom in inkubirali še 10 dni pri 23 °C na rotacijskem stresalniku. S sterilno 1 ml pipeto smo prenesli micelij gliv s tekočim gojiščem na CYA agarne plošče (30 ponovitev) in jih 10 dni inkubirali v temi pri 23 °C. Glivno biomaso in celotno gojišče v petrijevki smo liofilizirali in ekstrahirali s 1300 ml metanola v ultrazvočni kopeli, 30 min pri 40 °C. Ekstrakt smo ločili od liofiliziranih agarnih plošč s filtriranjem preko okroglega celuloznega filtra (rdeč trak) (Schleicher & Schuell) in korak še enkrat ponovili s svežim metanolom. Oba ekstrakta smo združili in topilo uparili v rotacijskem vakuumskem izparjevalniku (rotavapor). Za analizo organskih ostankov smo suhemu glivnemu ekstraktu dodali 300 ml destilirane vode in 300 ml etil acetata, premešali in obe fazi ločili v liju ločniku. Zgornjo organsko fazo smo filtrirali in uparili z rotacijskim vakuumskim izparjevalnikom do suhega. Suh ekstrakt smo shranili in shranili v zamrzovalniku pri -18 °C za nadaljnje analize.

3.3.2.2 Difuzijski test

Glivi *C. fiorinae* in *M. hiemalis* smo testirali z difuzijsko metodo z diski, in sicer: 10 ml MYC gojišča, pripravljenega z 18 g/l agarja in ohlajenega na 40 °C, smo vlili v petrijevko premera 90 mm. Po strditvi agarne osnovnega sloja smo pripravili MYC gojišče s polovično 9 g/l količino agarja. Temu smo ob ohladitvi na 40 °C dodali suspenzijo spor patogenega koncentracije 1×10^6 /ml in ga razlili na osnovno agarno plast. Postopek je bil enak pri testiranju bakterij *B. subtilis* ter *E. coli*. Razlika je bila le v uporabi BAC gojišča.

V poskusu smo uporabili metanolno raztopino suhega ekstrakta s koncentracijo 1 mg/ml in metanolno raztopino izoliranih bioaktivnih snovi s koncentracijo 1 mg/ml. Nato smo sterilne filter diske prepojili s 50 µl glivnega ekstrakta in jih položili na površju agarne plošče. Po 48 urni inkubaciji pri 25 °C smo z ravnilom merili premer območja (mm) inhibicije rasti gliv in bakterij.

3.3.2.3 Ločba spojin v glivnem ekstraktu z RF-UHPLC-DAD

Suh glivni ekstrakt smo raztopili v 1 ml metanola. Ločbo smo izvedli s C18 Acquity UPLC BEH kolono (2,1 x 50 mm; 1,7 µm) z gradientno elucijo in detekcijo z detektorjem z nizom diod (200-600 nm, širina reže 2 nm). Kot mobilno fazo A smo uporabljali 0,1 % metanojsko kislino v vodi, kot mobilno fazo B pa 0,1 % metanojsko kislino v acetonitrilu. Program gradientne elucije je bil sledeč: 5 min 5 % mobilne faze B, potem naraščanje od 5 % mobilne faze B do 100 % pri retencijskem času 20 min in na koncu 5 min 100 % mobilne faze B. Pretok je bil 0,6 ml/min, temperatura kolone pa

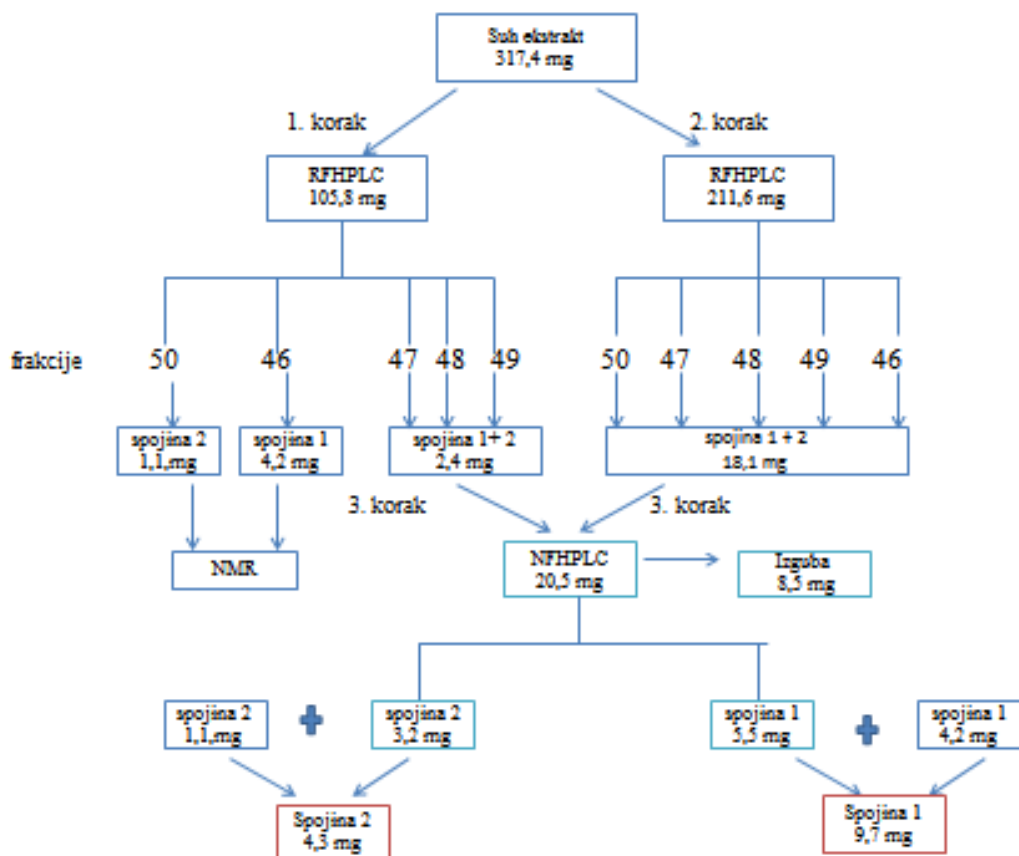
40 °C. Po končani analizi smo kolono kondicionirali 5 min s 95 % mobilne faze A in 5% mobilne faze B.

ESI-IT-MS smo izvedli na Brukerjevem inštrumentu Amazon. Podatke smo zajemali v pozitivni in negativni ionizaciji v razponu od 100 do 1000 m/z. IT-MS smo uporabili pri prvem analiznem testiranju bioaktivnega ekstrakta glive *M. tardicrescens*, kjer smo detektirali spojine v pozitivni in negativni ESI.

Z ESI-TOF-MS smo določili molekulsko maso in posredno elementno sestavo spojin. Uporabili smo Brukerjev inštrument Maxis pod naslednjimi pogoji: kapilarna napetost 4,5 kV, tlak plina 4,0 bar, pretok plina za sušenje 10 l/min, temperature plina za sušenje 200 °C. Masno območje je bilo od 100 do 2500 m/z. Podatke smo obdelali s programsko opremo Compass Data Analysis 4.0 (Bruker Daltonics), s pomočjo katere smo dobili seznam možnih osnovnih (elementnih) formul.

3.3.2.4 Frakcioniranje spojin glivnega ekstrakta s preparativno HPLC

Analite smo izolirali in očistili s preparativnim sistemom HPLC z reverzno fazo (RF). Preparativno (RF) HPLC smo izvedli dvakrat. Prvič smo injicirali 1/3 mase suhega ekstrakta in drugič preostanek (Potek ločevanja je prikazan na Sliki 9).



Slika 9: Potek ločevanja in izolacija dveh bioaktivnih spojin

Figure 9: Steps for separation and isolation of two bioactive compounds

Spojine smo ločili na preparativni koloni (VP Nucleodur C18 Gravity 5 μ m (250 mm x 21 mm). Pri ločbi smo uporabili linearni gradient. Kot mobilno fazo A smo uporabljali 0,5 % ocatno kislino v vodi, kot mobilno fazo B pa 0,5 % ocatno kislino v metanolu. Program gradientne elucije je bil sledeč: 30 min naraščanja od 20 % mobilne faze B do 100 % in na koncu 5 min 100 % mobilne faze B. Pretok je bil 20 ml/min. Posamezne spojine smo detektirali pri valovni dolžini 230 nm. S pomočjo zbiralca frakcij smo frakcije zbirali vsakih 20 s. Frakcije smo označili s števili od 1 do 103.

3.3.2.5 Test bioaktivnosti frakcij

Zbrane frakcije smo uporabili za testiranje protimikrobnega učinka. 20 μ l vsake frakcije smo odpipetirali na 96 mikrotitrsko ploščo in iz luknjic z mikrotitrskim izparjevalnikom z dušikom izparili metanol. Nato smo v posamezno luknjico nanесли 150 μ l suspenzije trosov patogene glive *C. fioriniae* s koncentracijo 1×10^5 trosov/ml. Plošče smo inkubirali dva dni na stresalniku pri 23 °C.

3.3.2.6 Ločitev spojin v bioaktivnih frakcijah s preparativno (NF) HPLC

Bioaktivne frakcije iz preparativne (RF) HPLC smo združili in jih v nadaljevanju uspešno ločili na preparativni HPLC z normalno fazo (NF). Uporabili smo silikagel kolono in izokratsko elucijo 99,7 % diklorometana in 0,3 % metanola.

3.3.2.7 Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) bioaktivnih spojin

Aktivnost izoliranih bioaktivnih spojin smo ocenili z mikrodilucijskim testom v mikrotitrskih ploščah s 96 luknjicami. Testni organizmi so bili bakterije *Bacillus subtilis*, *E. coli* in *S. aureus* in glive *C. fioriniae*, *Pichia anomala*, *C. tenuis* ter *S. cerevisiae*. Pripravili smo bakterijski inokulum za približno 10^5 kolonijskih enot na luknjico in glivni inokulum s koncentracijo približno 1×10^5 spor na luknjico.

V prvo vrstico mikrotitrskе plošče (A) smo dodali 280 μ l suspenzije trosov, v vse ostale (B, C, D, E, F, G) pa samo 150 μ l suspenzije trosov. V luknjico 6A smo dodali 20 μ l spojine 1, v luknjico 7A pa 20 μ l spojine 2, tako da je bila njuna koncentracija v obeh luknjicah 100 μ g/ml. V luknjico 5A smo dodali 20 μ l metanola. 150 μ l raztopine iz luknjic vrstice A, smo prenašali proti luknjicam v vrstici G, tako da so bile koncentracije spojine 1 in 2 v vrstici B 50 μ g/ml, v vrstici C 25 μ g/ml, v vrstici D 12,5 μ g/ml, v vrstici E 6,25 μ g/ml, v vrstici F 3,13 μ g/ml, v vrstici G 1,56 μ g/ml in v vrstici H 0,78 μ g/ml. Sprejeto merilo minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) je bilo definirano kot najnižja koncentracija vsake spojine, ki po 24 urah inkubacije ne kaže vidne bakterijske ali glivične rasti.

3.3.2.8 Strukturna identifikacija spojin

Struktura čistih izoliranih aktivnih substanc je bila določena na inštitutu HZI v Nemčiji z ^1H in ^{13}C jedrsko magnetno resonanco (NMR). NMR spektri so bili posneti z Bruker Ascend 700 spektrometrom s 5 mm krio-probo (^1H 700 MHz, ^{13}C 175 MHz).

3.4 IN VIVO TEST

V sadovnjaku Kmetijskega inštituta Slovenije smo izbrali 6 dreves sorte Gloster. Za *in vivo* poskuse smo izbrali le najobetavnejše izolate za biotično varstvo na osnovi rezultatov *in vitro* poskusov. Okrog dreves smo postavili leseno ogrodje in ga prekrili s polivinilom in mrežo. Pod leseno ogrodje smo namestili oroševalce in merilec temperature in vlage.



Slika 10: Okolje *in vivo* poskusa

Figure 10: Environment of *in vivo* assay

Drevesa smo tretirali s tremi različnimi vrstami gliv. Prva dva drevesa smo tretirali z glivo *M. tardicrescens*, tretje drevo je bilo kontrolno, tretirano z dH_2O , četrto in peto drevo pa smo tretirali z glivo *P. cerophilus* ter šesto drevo z glivo *M. malicola*. Škropljenje dreves s suspenzijo trosov gliv smo izvajali 1 x tedensko od 23. 4. 2012 dalje. Vsako drevo smo tretirali s 200 ml suspenzije trosov posamezne glive s koncentracijo 1×10^6 trosov /ml.

Nato smo pod drevesa postavili prezimele liste z zimskimi trosišči (pseudoteciji), v katerih nastanejo spolni trosi (askospore) glive *V. inaequalis*. Razvoj simptomov bolezni smo spremljali in jih primerjali z negativno kontrolo (netretirano rastlino).

Gliva tvori spomladi zimska trosišča (pseudotecije), v katerih nastanejo spolni trosi (akrospore), ki dozori do sredine aprila. Zimski trosi v kapljici vode na listih kalijo in z infekcijsko hifo prodre vanje ter jih tako okužijo. Po dveh tednih se pokažejo pege na listu. Na teh pegah se v obliki žametne prevleke tvorijo poletni trosi (konidiji), ki se širijo na mlade liste in plodove. Pomembno je, da preprečimo predvsem okužbe z zimskimi trosi, saj se potem poletni trosi ne morejo razviti.

Konec oktobra smo obrali vse plodove iz šestih jablan in jih ločili po vrstah. Prešteli smo jabolka in ločili število okuženih od neokuženih plodov. Nato smo vsakemu okuženemu plodu izmerili po 2 x višino in premer ter izračunali povprečno višino

jabolka v mm (v) in premer jabolka v mm (D). Površino jabolka smo izračunali po formuli za površino krogle. Prvim desetim okuženim jabolkom smo izmerili premer posamezne nekroze po dolžini in širini ter izračunali povprečni polmer nekroze ter povprečno ploščino s formulo za ploščino kroga. Vsota vseh povprečnih ploščin kolonij na okuženem plodu je predstavljala ploščino celotne nekroze.

Delež površine plodu, okužene z glivami smo izračunali po formuli:

$$O_p = \frac{P_o}{P_j} * 100 \quad \dots(3)$$

O_p – Delež okužene površine (%)
 P_o – Okužena površina jabolk (mm²)
 P_j - Površina celotnega jabolka (mm²)

3.4.1 Priprava inokuluma gliv sajavosti za *in vivo* test

Glive *M. malicola*, *M. tardicrescens* in *P. cerophilus* smo linijsko inokulirali na rPDA gojišče in jih inkubirali 10 dni pri 23 °C. Potem smo na agarne plošče dodali dH₂O in s spatulo postrgali micelij s trosi in zmešali z vodo. Vodno suspenzijo s trosi in micelijem smo prefiltrirali skozi sterilno gazo in s tem dobili čisto suspenzijo trosov. Za pripravo 200 ml suspenzije trosov s koncentracijo 1 x 10⁶ trosov/ml smo potrebovali ob vsakokratnem škropljenju približno 8 petrijevok glive *M. tardicrescens*, 2 petrijevk glive *P. cerophilus* in 3 petrijevke glive *M. malicola*.

3.5 SEMI IN VIVO TEST

3.5.1 Priprava pogojev za *semi in vivo* testiranje

Testiranje antagonistične aktivnosti *semi in vivo* smo izvedli na zdravih, nepoškodovanih plodovih jablane treh sort, in sicer: Zlati delišes, Gala in Gloster. Vse tri sorte so občutljive na okužbo z glivo *C. fioriniae*. Plodove smo analizirali po treh mesecih skladiščenja. Preliminarni test pa smo izvedli pri sorti Gloster ob tehnološki zrelosti plodov takoj po obiranju.

Plodove smo površinsko sterilizirali, tako da smo jih najprej spirali pod destilirano vodo, nato smo jih potopili za 10 sekund v 70 % raztopino etanola in za 3 min v 1 % raztopino natrijevega hipoklorita (13 % aktivnega klora) in nato še sprali s sterilno destilirano vodo.

V poskusu smo imeli 5 tretiranj, zato smo na vsakem jabolku s plutovrtom na petih straneh izrezali po dve luknjici (3 mm premera x 3 mm globine) in jih označili z 1 – 5. Na vsakem plodu smo posamezno tretiranje enkrat ponovili. V poskusu smo imeli 46 plodov sorte Gala, 38 plodov sorte Gloster in 43 plodov sorte Zlati delišes.



Slika 11: Plodovi pripravljeni za semi *in vivo* poskus

Figure 11: Apple fruits for *semi in vivo* assay

3.5.2 Izvedba *semi in vivo* testiranja

Pripravili smo suspenzijo trosov patogene glive s koncentracijo $2,5 \times 10^5$ trosov/ml in suspenzijo trosov antagonistične glive *M. tardicrescens* s koncentracijo $4,5 \times 10^5$ /ml ter z nastavki za pipeto (tipsi) nanašali v vdolbinice po 20 μ l posamezne suspenzije trosov.

Tretiranje 1, tretiranje 2 in tretiranje 5 so predstavljali kontrolo z nanosom zgolj suspenzije patogene glive ali antagonistične glive, medtem ko sta predstavljali tretiranja 4 in 3 nanos suspenzij obeh gliv istočasno ali nanos antagonistične glive in po dveh urah inkubacije še nanos suspenzije trosov patogene glive.

- Tretiranje 1: 20 μ l suspenzije trosov patogene glive *C. fiorinae* nanesli na začetku
- Tretiranje 2: 20 μ l suspenzije trosov antagonistične glive nanesli na začetku
- Tretiranje 3: 20 μ l suspenzije trosov antagonistične glive nanesli na začetku in po dveh urah inkubacije nanesli še 20 μ l suspenzije trosov patogene glive *C. fiorinae*
- Tretiranje 4: 20 μ l suspenzije trosov antagonistične glive in 20 μ l suspenzije trosov patogene glive *C. fiorinae* nanesli na začetku
- Tretiranje 5: 20 μ l suspenzije trosov patogene glive *C. fiorinae* nanesli dve uri pozneje

Plodove smo položili na sterilne papirnate brisače v plastičnih posodah in jih inkubirali v rastni komori 12 dni pri 23 °C. Visoko vlažnost smo zagotovili z dodajanjem sterilne destilirane vode na dno posode. Posode smo oštevilčili (1, 2, 3 ...) in prav tako vsak plod v posamezni posodi. Na primer plodovi v posodi 3 so označeni s 3.1, 3.2, 3.3 in 3.4. Prva pomeni številko posode in druga številko ploda v posodi 3. Namen testiranja je bil določanje inhibitornega učinka glive *M. tardicrescens* na *C. fiorinae*.

Na sedmi dan inkubacije smo plodove pregledali in izmerili premer nekroz pri vseh tretiranjih. Nekroze so bile različnih oblik, zato smo želeli dobiti povprečni polmer nekroze. Z ravnilom smo po dolžini in širini izmerili premer dveh nekroz na posamezno tretiranje. Iz dveh nekroz smo izračunali povprečni premer oziroma polmer ($\bar{r}$) nekroze. Nekroze so se najbolj približale obliki kroga, zato smo povprečno ploščino nekroze na tretiranje računali po formuli za ploščino kroga.

$$\text{Ploščina nekroze (cm}^2\text{)} = \pi r^2 \quad \dots(4)$$

Sledila je primerjava povprečnih ploščin med tretiranjem izražena v %. Tretiranje 4 smo primerjali s kontrolnim tretiranjem 1 ($P4/P1$) in tretiranje 3 s kontrolnim tretiranjem 5 ($P3/P5$).

Delež inhibicije nekroze glive *C. fiorinae* pri tretiranju 3 ($I3$) ali tretiranju 4 ($I4$) smo izračunali po formulah:

$$I3 (v \%) = \left(1 - \frac{P3}{P5}\right) * 100 (v \%) \text{ in} \quad \dots(5)$$

$$I4 (v \%) = \left(1 - \frac{P4}{P1}\right) * 100 (v \%) \quad \dots(6)$$

Pri vseh treh sortah jabolk smo izračunane rezultate o deležu zmanjšanja nekroze patogene glive ($I3$, $I4$) obdelali s statističnim programom SAS/STADT.

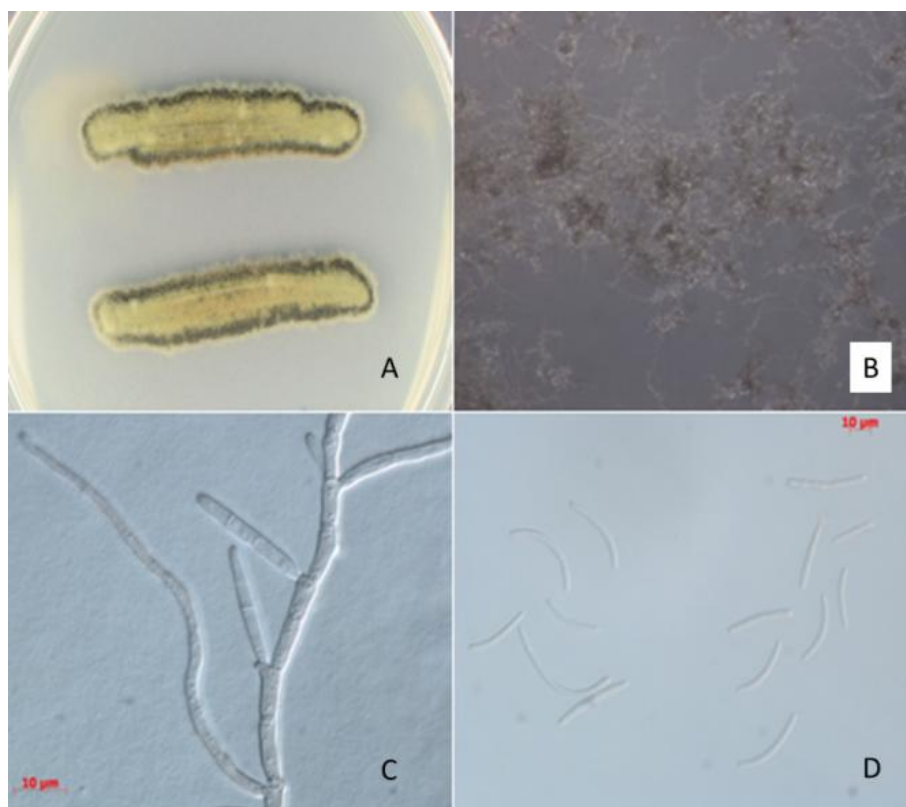
4 REZULTATI

4.1 MORFOLOŠKE ZNAČILNOSTI UPORABLJENIH GLIV SBFS V ČISTI KULTURI

4.1.1 *Microcyclospora malicola* J. Frank, Schroers & Crous

Kolonija je na PDA gojišču počasi rastoča in doseže po 14 dneh rasti pri temperaturi 24 °C premer 7 mm in po 1 mesecu inkubacije premer 12 mm. Je gladka, olivno zelena, prekrita z rjavo sivim zračnim micelijem (Slika 12A). Rob kolonije je temno rjav, gladek in raven. S spodnje strani je kolonija črne barve.

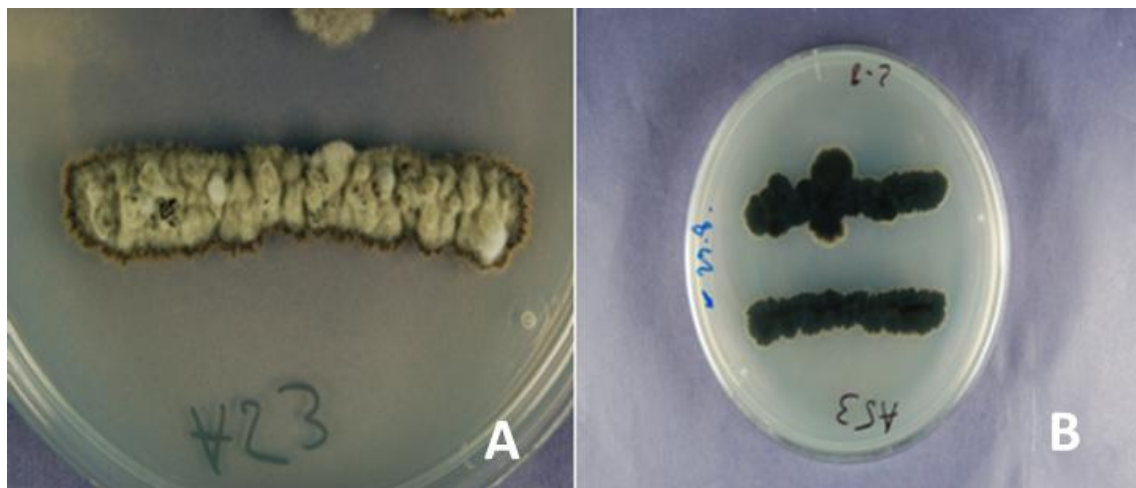
Na SNA gojišču je kolonija nehomogena, s številnimi temnimi micelijskimi zgostitvami, med katerimi je redek, bel in sluzast micelij, kjer je obilica trosov (Slika 12B). Hife so septirane, 2-3 µm široke. Troši nastanejo z blastično konidiogenezo iz konidiogenih celic, lateralno na hifah (Slika 12C). Troši so septirani (2-4-8), veliki 23 – 36- 92 µm x 2,4-2,8-3,6 µm, z vidnimi oljnimi kapljicami, gladki, ravni do ukrivljeni ter na eni strani topi in na drugi nekoliko zaobljeni (Slika 12D).



Slika 12: Morfološke značilnosti glive *M. malicola*
(A – PDA gojišče, B – SNA gojišče, C – nastanek trosov, D – troši)
Figure 12: Morphological characteristics of fungus *M. malicola*
(A – PDA medium, B – SNA medium, C – conidia formation, D – conidia)

4.1.2 *Microcyclospora tardicrescens* J. Frank, Schroers & Crous

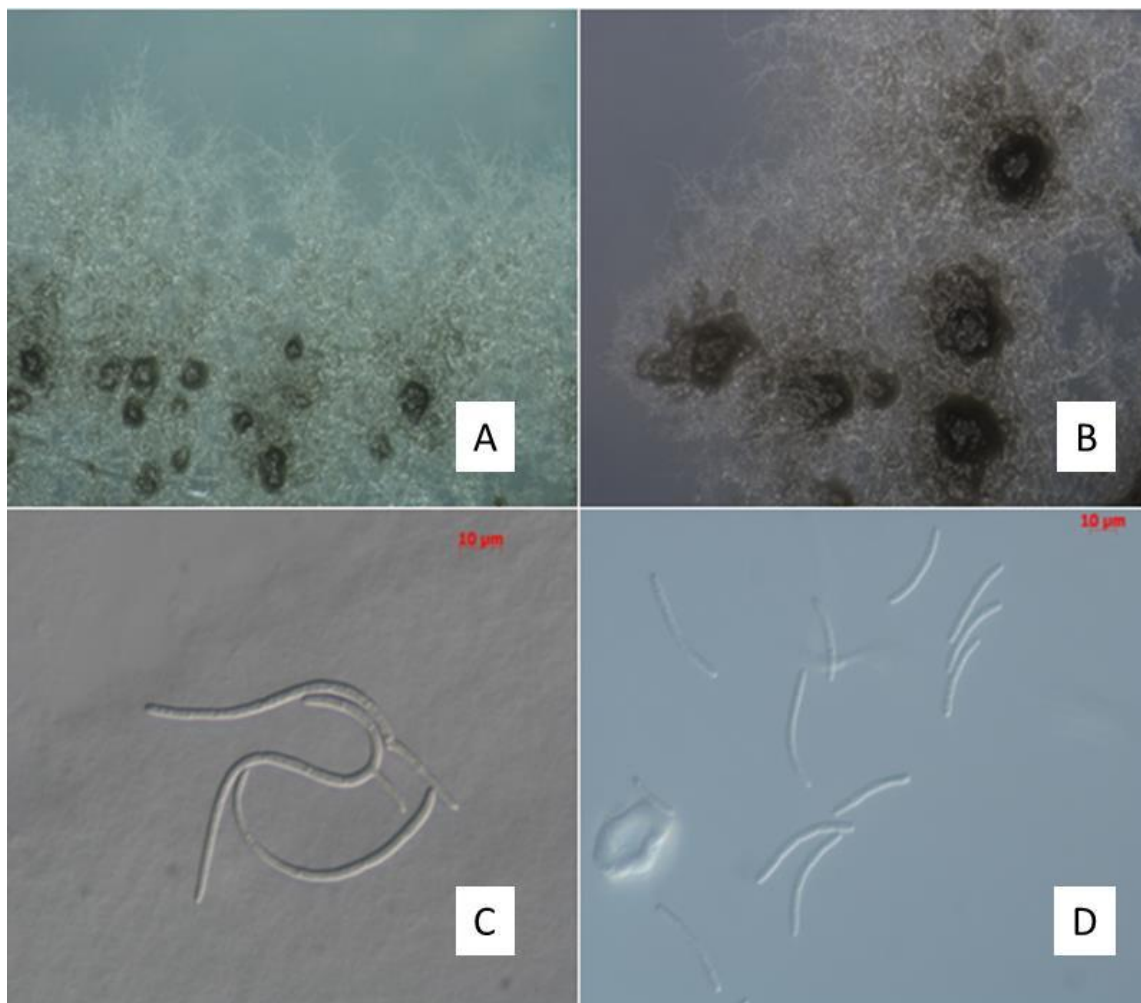
Kolonija je na PDA gojišču počasi rastoča in doseže po 14 dneh rasti pri temperaturi 24 °C premer 7 mm in po 1 mesecu premer 11 mm. V sredini je kolonija dvignjena, nagubana in prekrita s sivkastim zračnim micelijem, rob kolonije je vraščen v agar, rjavo črn in nazobčan (Slika 13A). S spodnje strani je kolonija črne barve (Slika 13B).



Slika 13: Kolonija glive *M. tardicrescens* na PDA gojišču
(A – od zgoraj, B – na spodnji strani)

Figure 13: Fungal colony of *M. tardicrescens* on PDA medium
(A – from above, B – on the bottom)

Micelij na SNA gojišču je gosto razvejan, blede rjav in svetleč (Slika 14A). Starejši micelij oblikuje kroglaste, svetleče, sivo črne zgostitve (Slika 14B). Sporulacija je zelo intenzivna in najbolj vidna ob hifah na svetlečem robu kolonije. Hife so 2-3 µm široke. Troso nastajajo lateralno na konidiogenih celicah, ki so mono ali poliblastične. Troso so nitasti, ravni do rahlo ukrivljeni ter na eni strani topi in na drugi zaobljeni. So septirani (1-6), ob septah nekoliko zoženi, veliki 18-31-65 µm x 1,5-2,3-3 µm, blede rjavi z vidnimi oljnimi kapljicami (Slika 14D). Pogosta je tudi mikrociklična tvorba trosov. V starejših kulturah se interkalarno razvijajo temno rjave klamidiospore, ki merijo v premeru 5 µm.

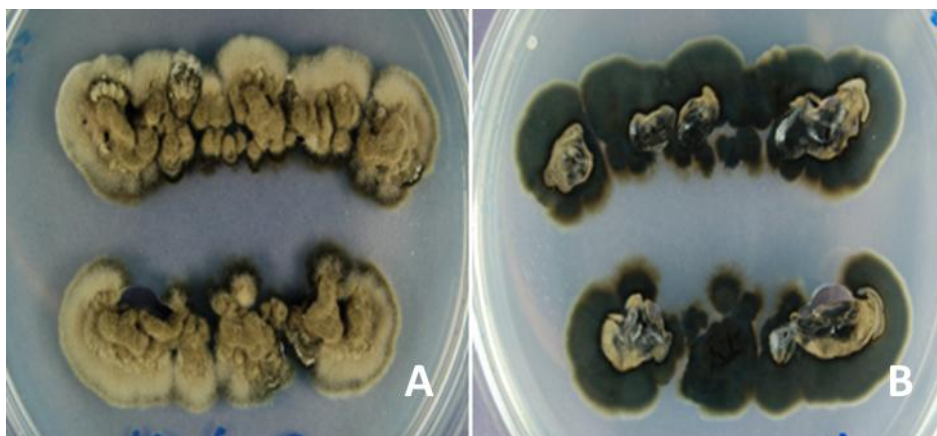


Slika 14: Micelij glive *M. tardicrescens* na SNA gojišču
(A, B - kolonija po 7 dneh, C – tvorba trosov, D – trosi)

Figure 14: Fungal mycelium of *Microcyclospora tardicrescens* on SNA medium
(A, B – colony after 7 days, C – conidia formation, D – conidia)

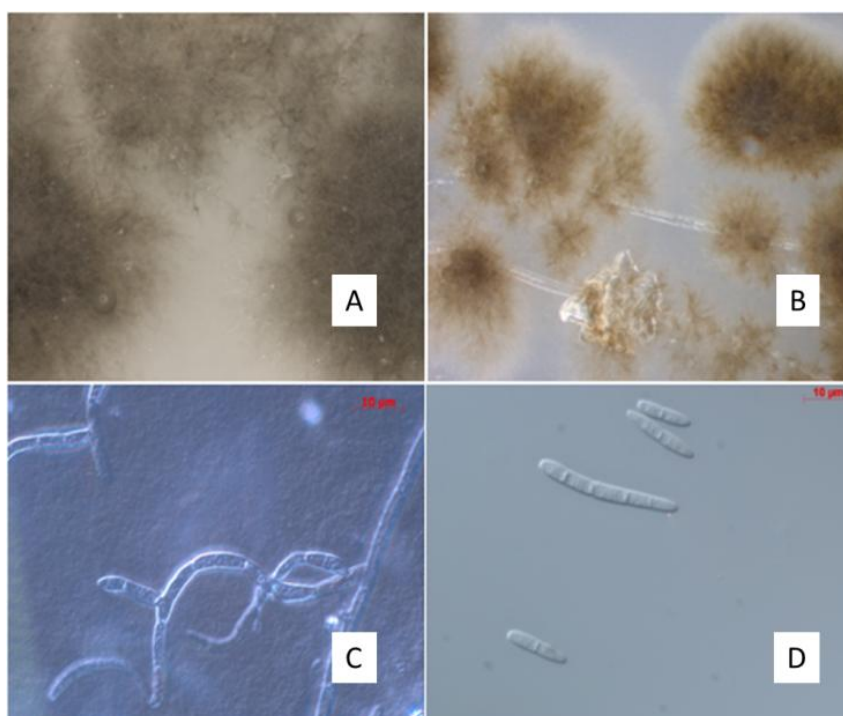
4.1.3 *Microcyclosporella mali* J. Frank, Schroers & Crous

Kolonija je na PDA gojišču počasi rastoča in doseže po 14 dneh rasti pri temperaturi 24 °C premer 11 mm in po 1 mesecu premer 17 mm. Je olivno zelene barve, zbita, v sredini dvignjena in nagubana, na obrobju ravna in preraščena s svetlejším zračnim micelijem. Rob kolonije je gladek, valovit ter ponekod resasto vraščen v gojišče (Slika 15A). S spodnje strani je kolonija črne barve (Slika 15B).



Slika 15: Kolonija glive *M. mali* na PDA gojišču (A – od zgoraj, B – na spodnji strani)
Figure 15: Fungal colony of *M. mali* on PDA medium (A – from above, B – on the bottom)

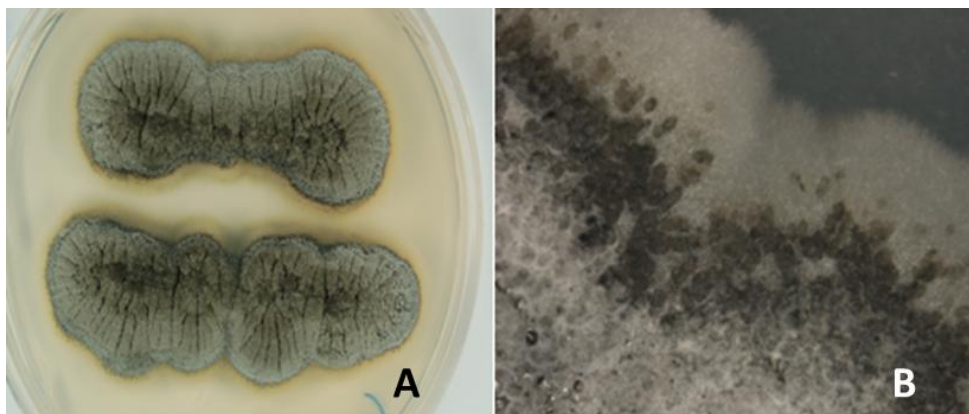
Micelij je na SNA gojišču rjavkast in redek ter deloma vraščen v gojišče. Na robu kolonije je viden redek, sluzast bel micelij z obilno tvorbo trosov. Po desetih dneh se na robu pojavijo posamezne bele, sluzaste gmote trosov (Slika 16A). Hife so 2-3 μm široke. Trosi se lahko razvijejo iz konidiogenih celic lateralno na hifah, pogosto nastajajo z mikrociklično konidiacijo. Trosi so septirani (1-2-7), veliki 10-18-37 μm x 1,8-3-3,7 μm , gladki, brezbarvni z vidnimi oljnimi kapljicami, cilindrični do rahlo ukrivljeni ter na eni strani topi in na drugi koničasto zaobljeni (Slika 16D).



Slika 16: Micelij na SNA gojišču (A, B - kolonija po 7 dneh, C – tvorba trosov, D – trosi)
Figure 16: Mycelium on SNA medium (A, B – colony after 7 days, C – conidia formation, D – conidia)

4.1.4 *Schizothyrium pomi* Arx

Kolonije glive *in vitro* dosežejo po 14 dneh rasti na PDA gojišču in pri temperaturi 24 °C premer 8 mm in po 1 mesecu inkubacije premer 23 mm. Kolonija je kompaktna, rahlo dvignjena in nagubana, temno siva v sredini in svetlo siva proti robu. Rob kolonije je gladek in valovit z redkim, rjavo rumenim micelijem, vraščenim v agar (Slika 17A).

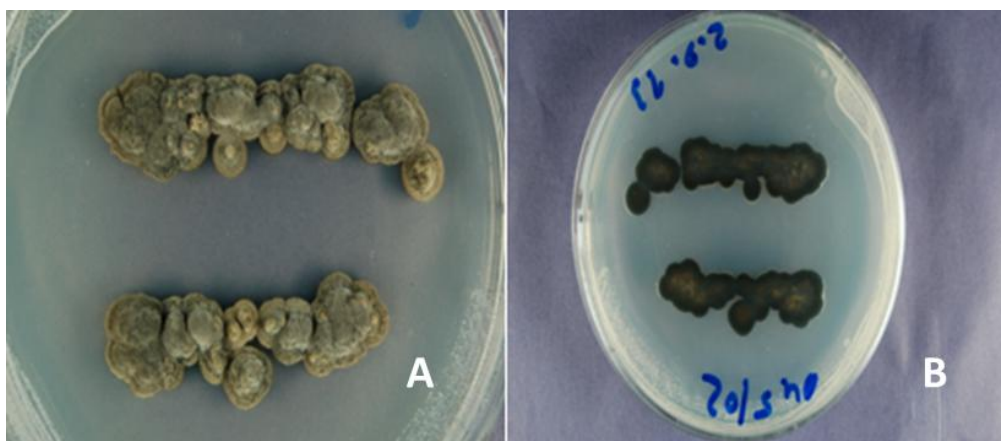


Slika 17: Kolonija *S. pomi* na PDA gojišču (A – od zgoraj, B – povečava 7x)

Figure 17: Colony of *S. pomi* on PDA medium (A – from above, B – magnification 7x)

4.1.5 *Peltaster cerophilus* J. Frank & Schroers, Mycologia 2014 v tisku

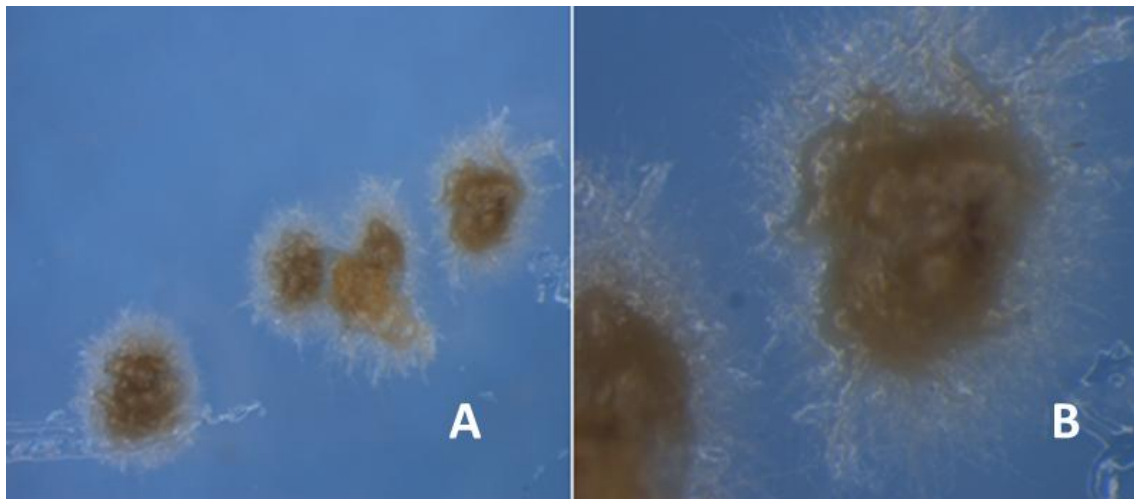
Tu smo opisali dva izolata znotraj na novo opisane vrste *Peltaster cerophilus*, in sicer izolat 045/02 (A39) in izolat 121/03 (A55). Kolonije izolata 045/02 dosežejo po 14 dneh rasti na PDA gojišču in pri temperaturi 20 °C premer 8 mm in po 1 mesecu inkubacije premer 12 mm. Kolonije so goste, kompaktne enakomerno dvignjene ali nagubane. Zračni micelij je temno rjav (4D5, 4D6) do sivo-olivno zelenkaste barve in na površju ne tvori trosov (Slika 18A). S spodnje strani je kolonija črne barve (Slika 18B).



Slika 18: Izolat 045/02 (A39) na PDA gojišču (A – od zgoraj, B – na spodnji strani)

Figure 18: Strain 045/02 (A39) on PDA medium (A – from above, B – on the bottom)

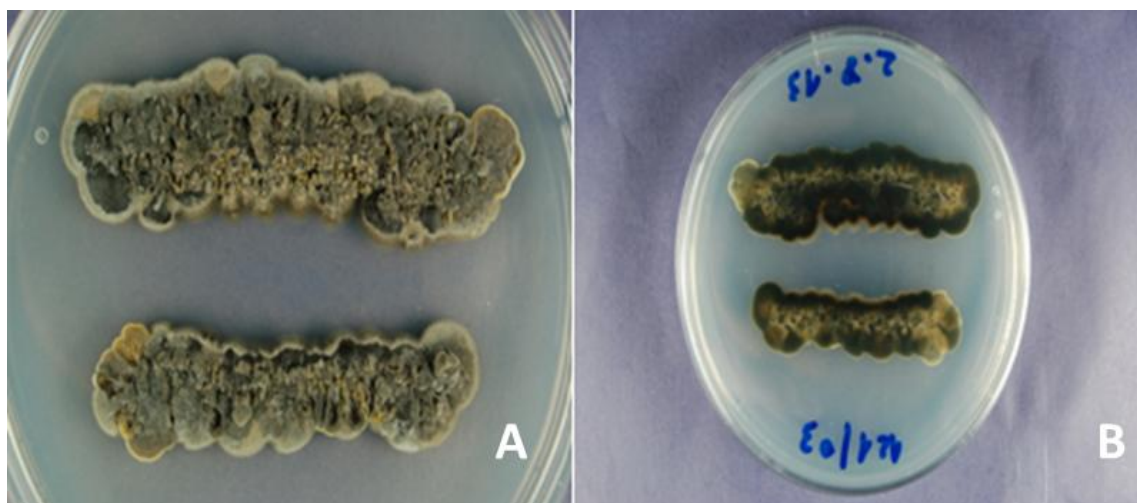
Kolonije izolata 045/02 na SNA gojišču so sluzaste, temno rumene barve, intenzivno tvorijo trose, zračnega micelija ni, na robu kolonije se hife radialno razraščajo po površju agarja (Slika 19A).



Slika 19: Izolat 045/02 (A39) na SNA gojišču (A – povečava 2x, B – povečava 7x)

Figure 19: Strain 045/02 (A39) on SNA medium (A – magnification 2x, B – magnification 7x)

Kolonije izolata 121/03 dosežejo po 14 dneh rasti na PDA gojišču in pri temperaturi 20 °C premer 10 mm in po 1 mesecu inkubacije premer 14 mm. Kolonije so goste, kompaktne in neenakomerno dvignjene ali nagubane. Površje je temno rjavo (4D5, 4D6) do črno ter prekrito z rjavo sivim, zeleno sivim zračnim micelijem. Na površju kolonije in ob njenem robu se oblikujejo temno rumene (4B7) gmote trosov (Slika 20A). S spodnje strani je kolonija kremasto rumena (4B6) in rjava (Slika 20B).

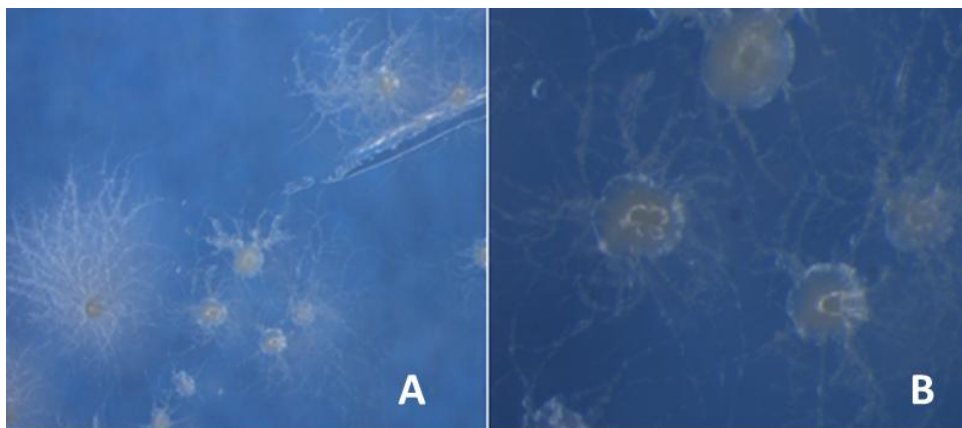


Slika 20: Izolat 121/03 (A55) na PDA gojišču (A – od zgoraj, B – na spodnji strani)

Figure 20: Strain 121/03 (A55) on PDA medium (A – from above, B – on the bottom)

Micelij izolata 121/03 na SNA gojišču je rahel, svetleč in vraščen v agar (substraten) z obilico trosov, ki se mestoma zgostijo in oblikujejo svetlo roza gmote. Trosi se

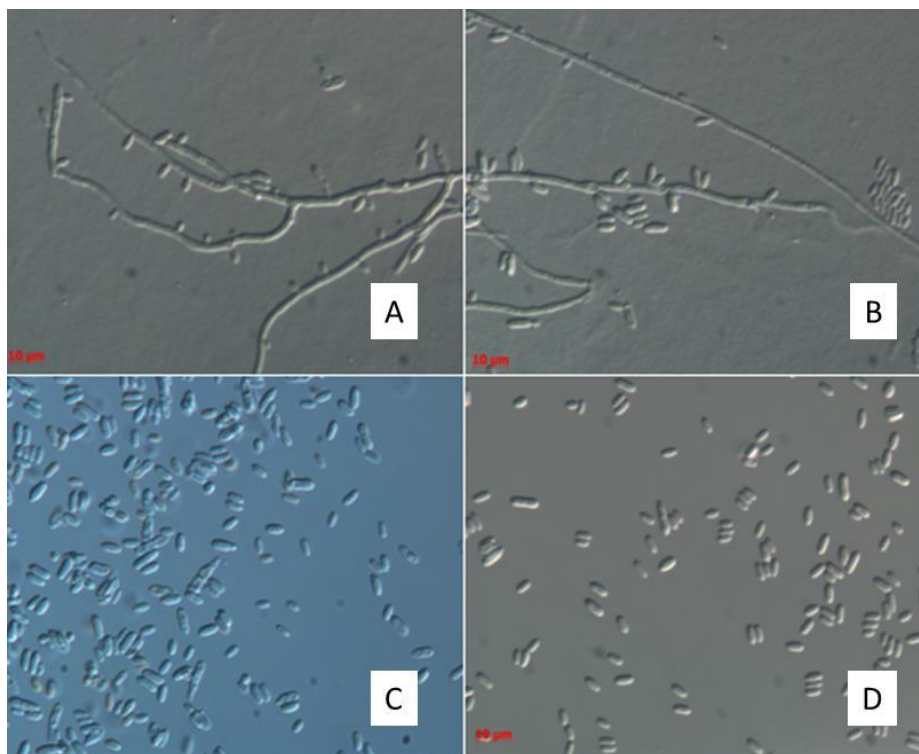
oblikujejo na konidiogenih celicah, lateralno na hifah. So brezbarvni, enocelični, cilindrične oblike in merijo $2,0-4,5-7,5 \mu\text{m} \times 1,5-2,0-3,0 \mu\text{m}$ (Slika 21A).



Slika 21: Izolat 121/03 (A55) na SNA gojišču (A – povečava 1x, B – povečava 7x)

Figure 21: Strain 121/03 (A55) on SNA medium (A – magnification 1x, B - magnification 7x)

Mikromorfološke značilnosti obeh izolatov glive vrste *P. cerophilus* so enake. Troši se oblikujejo na konidiogenih celicah, lateralno na hifah (Slika 22A, 22B). So brezbarvni, enocelični, cilindrične oblike in velikosti $3,0-4,9-7,6 \mu\text{m} \times 1,5-2,1-2,6 \mu\text{m}$ (Slika 22C, 22D).

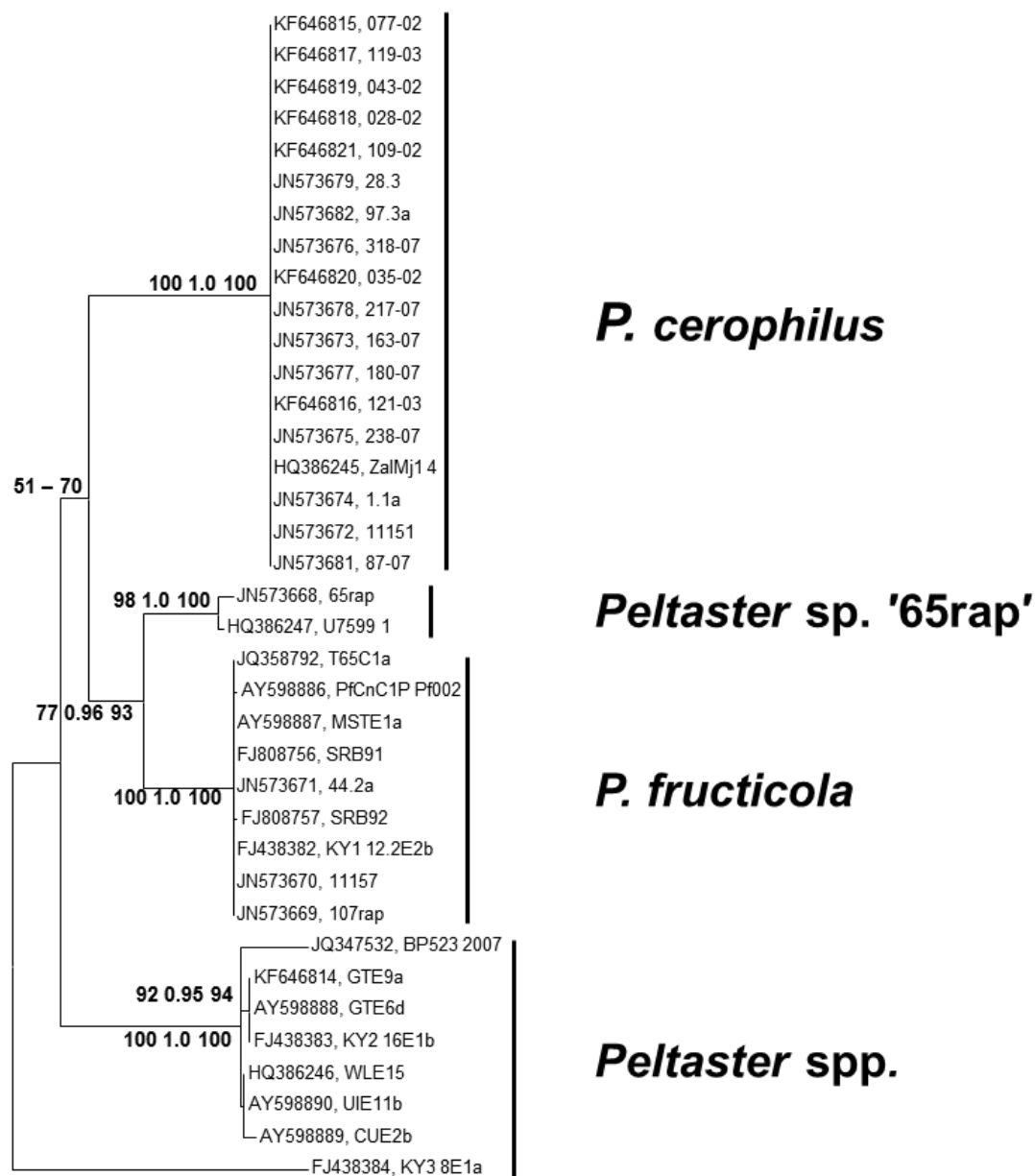


Slika 22: Sporulacija na SNA gojišču (A, B – tvorba trosov lateralno na hifah, C, D – trosi)

Figure 22: Sporulation on SNA medium (A, B – conidia formation lateral on the hyphae, C, D – conidia)

4.2 FILOGENETSKO DREVO ITS rDNA

Filogenetske odnose gliv iz rodu *Peltaster* smo preučevali na podlagi nukleotidnih zaporedij notranjih prepisnih vmesnikov ribosomske DNA (ITS1, ITS2 rDNA) in so prikazani v filogenetskem drevesu (Slika 23).



Slika 23: Filogenetsko drevo vrst gliv *Peltaster*
Figure 23: Phylogenetic tree of *Peltaster* species fungi

Z uporabo označevalca ITS so se sekvence združile v pričakovane skupine na taksonomski ravni vrst. Grafični prikaz reda razvejitve in evolucijske oddaljenosti izbranih taksonov kaže na to, da se *Peltaster cerophilus*, nova opisana vrsta izolirana samo v Evropi, loči od vrste *P. fructicola* izolirane v Severni Ameriki in Evropi.

1000 najbolj varčnih dreves pridobljenih iz analize regije ITS je imelo dolžino 251 korakov. DNA zaporedja ITS regije glive *P. cerophilus* so pokazala 71 % podobnost z ITS zaporedji *P. fructicola*. Poleg tega so se očitno ločile od drugih izolatov iz rodu *Peltaster* dostopnih v NCBI Gen Bank. Med zaporedji glive *P. cerophilus* nismo zaznali nobenih variacij (odstopanj). Klad, v katerega se uvršča vrsta *P. cerophilus*, ima visoko podporo (ML-BS, MP-BS = 100, p.v. = 1.0) (Slika 23) in prav tako klad vrste *P. fructicola* je bil enakovredno podprt (ML-BS = 100, p.v. = 1.0). Sestrski odnos izolatov glive *P. fructicola* z neopisano vrsto *Peltaster* sp. 65 rap je podprt z analizami zaporedij regije ITS (ML-BS = 73, p.v. = 0.96, MP-BS = 93). Klad s številnimi vrstami *Peltaster* spp. tvori klad zunaj podprte monofiletske skupine z vrstami *P. cerophilus*, *Peltaster* spp. 65 rap in *P. fructicola* (MP = 70).

4.3 TEST DVOJNIH KULTUR

Iz celotne glivne zbirke (Priloga B) smo izbrali 83 izolatov različnih vrst in rodov gliv SBFS (Priloga C) ter testirali njihov antagonistični vpliv na rast micelija patogenih gliv *C. fioriniae*, *F. avenaceum*, *B. cinerea* in *V. inaequalis* v *in vitro* testu dvojnih kultur.

Izolati gliv SBFS niso po sedmih dneh inkubacije pokazali nobenega antagonističnega delovanja proti patogeni glivi *C. fioriniae*, razen izolata vrste *M. tardicrescens* z oznako A53 (Priloga D1). Inhibicija radialne rasti micelija glive *C. fioriniae* je bila na sedmi dan 46,08 % in je po 14 dneh inkubacije dosegla 55,26 % (Slika 24 in Preglednica 13).



Slika 24: Rezultat testa dvojnih kultur med antagonistično glivo *M. tardicrescens* in patogeno glivo *C. fioriniae* po 7 dneh inkubacije

Figure 24: Result of dual culture assay between antagonistic fungus *M. tardicrescens* and pathogenic fungus *C. fioriniae* after 7 days of incubation

Preglednica 13: Inhibicija rasti micelija glive *C. fiorinae* v *in vitro* testu dvojnih kultur z antagonistični glivo *M. tardicrescens* na CYA gojišču

Table 13: Growth inhibition of the colony of the fungus *C. fiorinae* *in vitro* dual culture assay against antagonistic fungus *M. tardicrescens* on CYA medium

Čas inkubacije (dni)	Radialna rast patogena proti antagonistu (mm) *	Radialna rast patogena v nasprotni strani od antagonista (mm) *	% inhibicije rasti micelija glive <i>Colletotrichum fiorinae</i> *
7	11,7	21,7	46,08
8	12,3	22,7	45,30
10	12,7	27,0	52,96
12	15,3	33,7	54,60
14	17,0	38,0	55,26

* izvedba poskusa v treh ponovitvah.

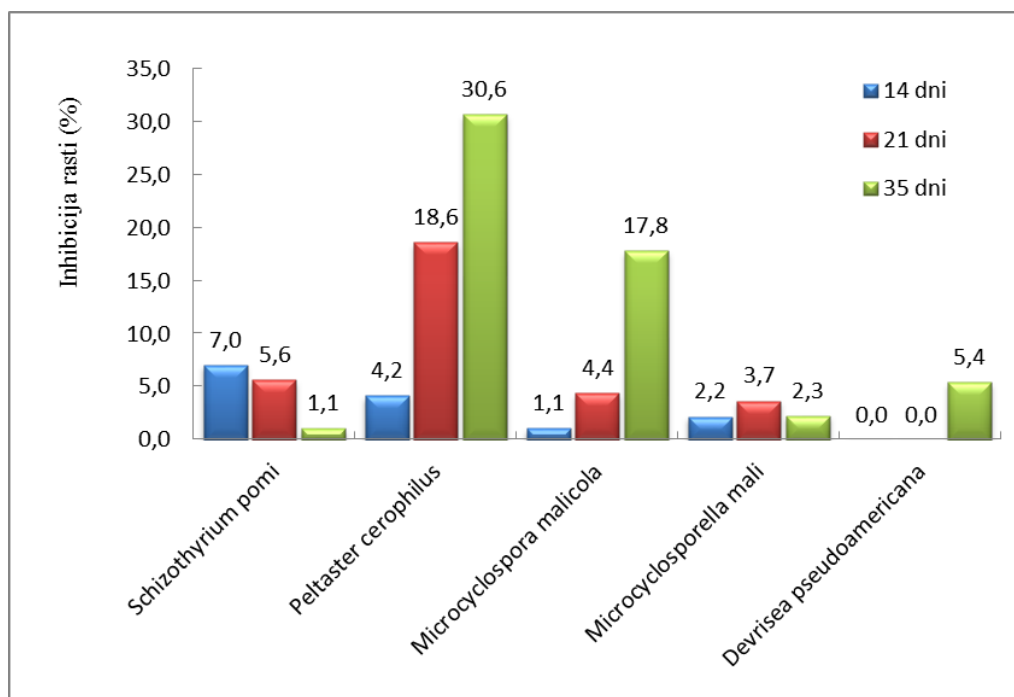
V Prilogi D2 in Prilogi D3 je prikazano, da noben izmed 83 testiranih izolatov SBFS gliv ni inhibiral rasti micelija patogenih gliv *F. avenaceum* in *B. cinerea*. Radialna rast patogenih gliv je bila enaka v smeri proti potencialnemu antagonistu kot v nasprotni smeri. Inhibicija rasti micelija je bila 0 % pri obeh testiranih patogenih glivah.

Radialna rast patogene glive *F. avenaceum* je na sedmi dan inkubacije znašala pri vseh testiranih vzorcih 4,2 cm, kar pomeni, da je gliva v obeh smereh rasti dosegla rob petrijevke.

Radialna rast glive *B. cinerea* je v testu proti antagonistu in v nasprotni smeri od antagonista pri vseh testiranih izolatih v povprečju znašala na sedmi dan inkubacije od 2,7 do 3 cm. Nobeden izmed 83 izolatov ni pokazal antagonističnega potenciala proti glivi *B. cinerea*.

Merjenje rasti patogene glive *V. inaequalis* in izračun deleža inhibicije rasti micelija te glive s strani posameznega testiranega izolata po 14, 21 in 34 dnevih smo prikazali v Prilogi E. Poskus smo izvedli v treh ponovitvah, izračunali povprečje treh meritev pri vsakem izolatu in izračunali delež inhibicije patogene glive po formuli opisani v poglavju 3.2.2.4.

Vrste *S. pomi*, *P. cerophilus*, *M. malicola*, *M. mali*, *D. pseudoamericana* so inhibirale rast patogene glive *V. inaequalis*.



Slika 25: Inhibitorni učinek posameznih vrst gliv potencialnih antagonistov na rast micelija patogene glive *V. inaequalis* (%)

Figure 25: Inhibitory effect for individual fungal species of potential antagonists on the mycelial growth of pathogenic fungus *V. inaequalis* (%)

Inhibicija vrste *S. pomi* na rast micelija patogene glive je bila po prvem merjenju (po 14 dneh) 7,03 % in se je tekom inkubacije zniževala. Po 21 dneh inkubacije je bila 5,62 % in po 35 dneh 1,08 %.

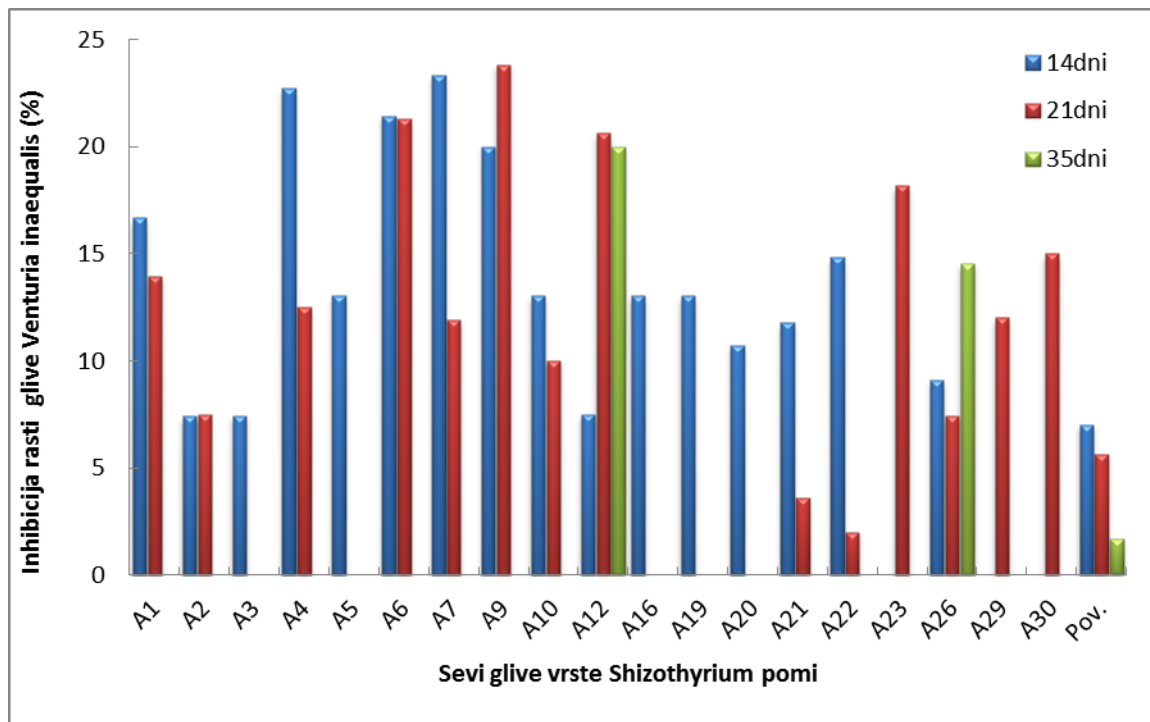
Vrsta *P. cerophilus* je po 14 dneh inhibirala rast glive *V. inaequalis* v povprečju za 4,15 %, po 21 dneh za 18,61 % in po 35 dneh za 30,64 %.

Edini izolat vrste *D. pseudoamericana* ni pokazal po prvem in drugem merjenju nobenih inhibitornih učinkov na glivo *V. inaequalis*. Po 35 dneh inkubacije pa smo zaznali inhibitorne učinke na rast micelija glive, in sicer je bila inhibicija rasti glive *V. inaequalis* 5,39 %.

Tudi pri vrsti *M. malicola* je inhibicija rasti micelija glive *V. inaequalis* tekom inkubacije naraščala. Po 14 dneh je vrsta dosegla 1,11 % inhibicije rasti glive, po 21 dneh 4,40 %, do 35 dneva pa se je inhibicija rasti micelija glive *V. inaequalis* zvišal na 17,79 %.

Vrsta *M. mali* je dosegla 1,11 % inhibicijo rasti micelija glive *V. inaequalis* po 14 dneh, po 21 dneh je inhibicija rasti micelija glive minimalno narasla na 3,67 %, do 35 dneva pa je padla na 2,26 %.

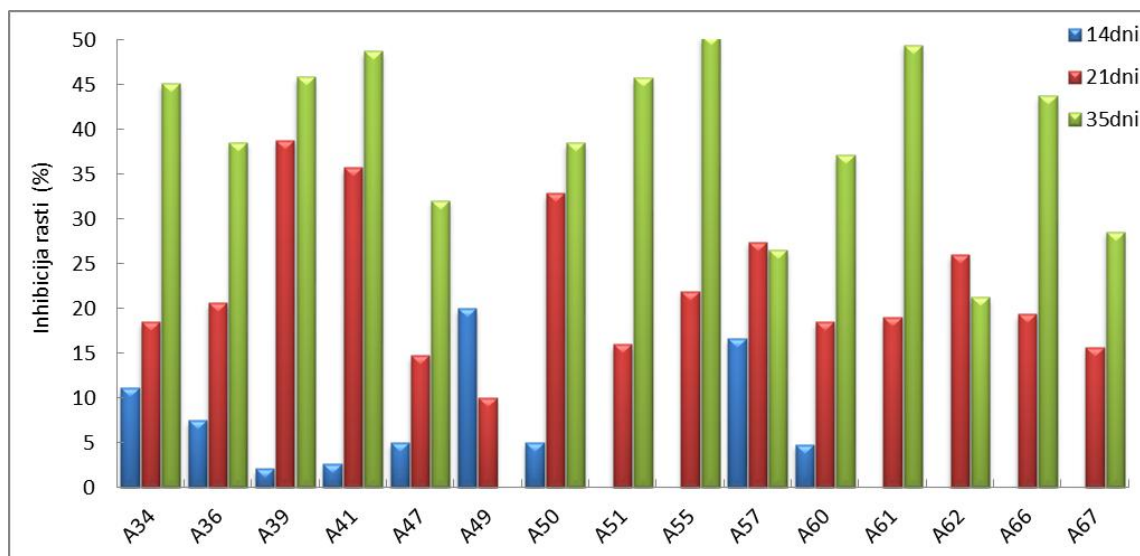
Izolata vrste *M. tardicrescens* in vrste *M. pomicola* nista pokazala nobenega inhibitornega učinka na glivo *V. inaequalis*. Inhibicija rasti micelija glive *V. inaequalis* je bila ob vseh treh merjenjih 0 %.



Slika 26: Inhibitorni učinek posameznih izolatov vrste *S. pomi* na rast micelija patogene glive *V. inaequalis* (%)

Figure 26: Inhibitory effect for individual strains of the species *S. pomi* on the mycelial growth of pathogenic fungus *V. inaequalis* (%)

V poskusu smo uporabili 32 izolatov vrste *S. pomi*. Glivo *V. inaequalis* je inhibiralo 19 izolatov, kar predstavlja 59,4 %. Inhibicijo smo merili trikrat, in sicer po 14, 21 ter po 35 dneh. Po prvem merjenju je 16 od 19 izolatov pokazalo antagonistični potencial s povprečno 7,0 % inhibicijo rasti micelija glive *V. inaequalis*. Izmed teh je izolat A7 pokazal po 14 dneh največji inhibitorni učinek na rast micelija patogene glive (nad 23 %). Poleg izolata A7 sta še izolata A4 in A6 inhibirala rast micelija (20 %) patogene glive *V. inaequalis*. Po drugem merjenju (po 21 dneh) je bilo 14 izolatov z antagonističnim potencialom. Povprečni inhibitorni učinek teh izolatov na rast micelija patogene glive je bil 5,6 %. Največja inhibicija je bila podobno kot po prvem merjenju, in sicer je izolat A9 pokazal 23 % inhibicijo rasti micelija patogene glive. Tudi po 21 dneh so bili trije izolati, katerih inhibitorni učinek na rast micelija patogene glive je bil 20 %. Pri vrsti *S. pomi* smo opazili, da se inhibicija po 21 dneh inkubacije v primerjavi z inhibicijo po 14 dneh, zmanjša. Izjema so izolati A9, A12, A23, A29 in A30. Po 35 dneh inkubacije sta bila aktivna zgolj izolata A12 in A26, ostali izolati niso zavirali rasti patogene glive. Skupna povprečna inhibicija izolatov je bila po 35 dneh nižja kot 2 %. Aktivna izolata sta zavirala rast micelija patogene glive 20 % oziroma 14,5 %. Izbrali smo izolat A12, saj je edini inhibiral rast micelija patogene glive *V. inaequalis* glive na 35. dan inkubacije (20 %).

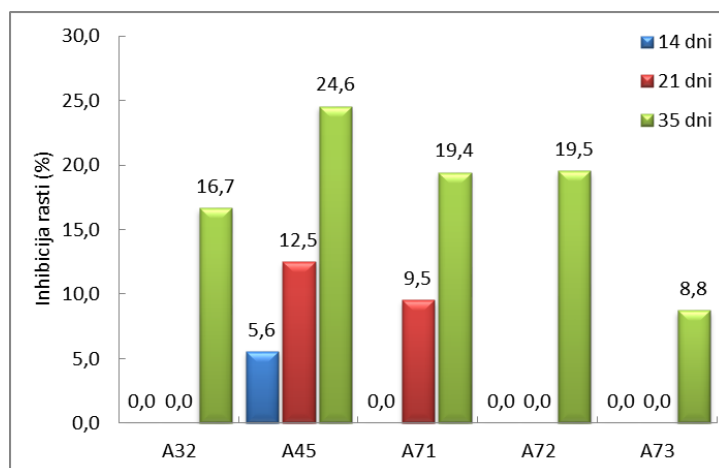


Slika 27: Inhibitorni učinek posameznih izolatov vrste *Peltaster cerophilus* na rast micelija patogene glive *V. inaequalis* (%)

Figure 27: Inhibitory effect of individual strains of the species *Peltaster cerophilus* on the mycelial growth of pathogenic fungus *V. inaequalis* (%)

Vsi testirani izolati vrste *P. cerophilus* so inhibirali rast micelija patogene glive *V. inaequalis*. Opazna lastnost te vrste je, da se je inhibicija rasti micelija patogene glive povečevala tekom inkubacije in je bila po 30 dneh največja. Po prvem merjenju je 10 od 15 izolatov pokazalo antagonistično delovanje na rast micelija glive *V. inaequalis* s povprečno inhibicijo 4,98 %. Noben izolat ni rasti micelija patogene glive inhibiral nad 20 %. Po drugem merjenju (po 21 dneh) je imelo vseh 15 izolatov inhibitorni učinek na rast micelija patogene glive nad 10 %, razen izolata A49. Povprečna inhibicija rasti micelija patogene glive pri vseh 15 izolatih je bila pri drugem merjenju 22,33 %. Po drugem merjenju so izolati A39, A41 in A50 inhibirali rast micelija patogene glive *V. inaequalis* nad 30 %. Največji inhibitorni učinek na rast micelija patogene glive po 21 dneh inkubacije je dosegel izolat A39, in sicer 38,78 %.

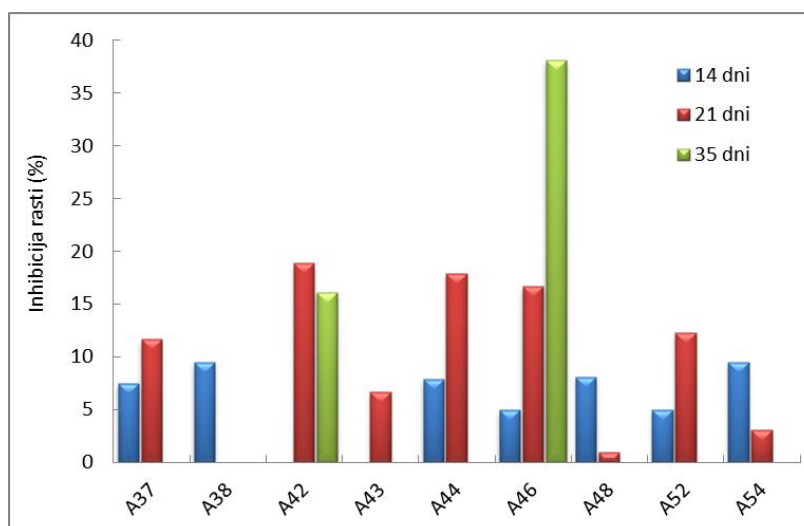
Po 35 dneh inkubacije smo opazili inhibicijo rasti micelija patogene glive *V. inaequalis* pri skoraj vseh izolatih razen pri A49, kjer inhibicije rasti ni bilo več zaznati. Skupni povprečni inhibitorni učinek izolatov na rast micelija patogene glive se je po 35 dneh povečal na 36,77 %. Pri vseh izolatih smo videli povečanje inhibicije rasti micelija patogene glive po 35 dneh, razen pri izolatih A57 in A62, kjer je inhibicija rasti micelija patogene glive rahlo padla iz 27,4 % po 21 dneh na 26,55 % po 35 dneh oz. iz 26 % na 21,25 %. Po tretjem merjenju so pokazali izolati A34, A39, A41, A51, A55 in A61 velik inhibitorni učinek na rast micelija patogene glive (nad 40 %). Največjo inhibicijo rasti micelija patogene glive po 35 dneh inkubacije je dosegel izbrani izolat A55, in sicer 50,39 %.



Slika 28: Inhibitorni učinek posameznih izolatov vrste *M. malicola* na rast micelija patogene glive *V. inaequalis* (%)

Figure 28: Inhibitory effect of individual strains of the species *M. malicola* on the mycelial growth of pathogenic fungus *V. inaequalis* (%)

Pri vrsti *M. malicola* smo testirali pet izolatov. Izmed teh je samo izolat A45 po 14 dneh inkubacije inhibiral rast micelija patogene glive 5,56 %. Na 21. dan smo ugotovili inhibicijo rasti micelija glive *V. inaequalis* pri izolatu A45 (12,5 %) in A71 (9,52 %). Ostali izolati 21 dni po inokulaciji niso pokazali inhibitornega učinka na rast micelija patogene glive *V. inaequalis*. Ob tretjem merjenju je vseh pet izolatov zaviralo rast micelija patogene glive nad 10 %, razen izolata A73. Pri izolatih A32, A72 in A73 smo pri tretjem merjenju prvič izmerili inhibicijo rasti micelija patogene glive, medtem ko smo pri izolatu A45 in A71 videli, da inhibicija na rast patogene glive narašča tekom časovne inkubacije. Največjo inhibicijo rasti patogene glive po 35 dneh inkubacije je dosegel izolat A45. Ta izolat smo izbrali za najboljšega znotraj vrste *M. malicola*.



Slika 29: Inhibitorni učinek posameznih izolatov vrste *Microcyclosporella mali* na rast micelija patogene glive *V. inaequalis* (%)

Figure 29: Inhibitory effect of individual strains of the species *M. mali* on the mycelial growth of pathogenic fungus *V. inaequalis* (%)

V poskusu dvojnih kultur je vseh 9 izolatov vrste *M. mali* inhibiralo rast micelija glive *V. inaequalis*. Po prvem merjenju je 7 od 9 izolatov pokazalo antagonistični potencial s povprečno 5,84 % inhibicijo rasti glive *V. inaequalis*. Izmed teh izolatov sta izolata A38 in A54 pokazala po 14 dneh največji inhibitorski učinek na rast micelija patogene glive (9,52 %). Po drugem merjenju (po 21 dneh) je imelo 8 izolatov antagonistični potencial. Povprečna inhibicija teh izolatov na rast micelija patogena je bila 9,80 %. Največjo inhibicijo rasti patogene glive je imel po 21 dneh inkubacije izolat A42 (18,87 %). Na 21. dan inkubacije smo ugotovili tri izolate, katerih inhibitorski učinek na rast micelija patogene glive je bil med 15 in 20 %. Pri vrsti *M. mali* smo opazili, da se inhibicija rasti micelija patogene glive po 21 dneh inkubacije v primerjavi z inhibicijo rasti micelija patogene glive po 14 dneh poveča. Izjema so izolati A38, A48 in A54. Po 35 dneh inkubacije sta bila aktivna zgolj izolata A42 in A46, ostali izolati niso zavirali rasti patogene glive. Skupna povprečna inhibicija izolatov je bila po 35 dneh 6,02 %. Aktivna izolata sta inhibirala rast micelija patogene glive 16,09 % oziroma 38,05 %. Izolat A46 je imel v primerjavi z izolatom A42 nekoliko manjšo vrednost inhibicije rasti glive po 21. dnevu (16,68 % in 18,87 %), vendar je kazal izolat A46 na 35. dan inkubacije bistveno večji inhibitorski učinek na rast patogene glive *V. inaequalis* (38,05 %) kot izolat A42 (16,09 %). Zato smo izolat A46 izbrali za najboljšega znotraj vrste *M. mali*.

Za nadaljnjo analizo smo izmed vseh testiranih vrst gliv izbrali znotraj vsake vrste en izolat (Preglednica 14). Izbrali smo izolate, pri katerih se je inhibicija rasti micelija patogene glive *V. inaequalis* tekom inkubacije povečevala oziroma je dosegla, v primerjavi z ostalimi izolati, največjo vrednost inhibicije ob tretjem merjenju.

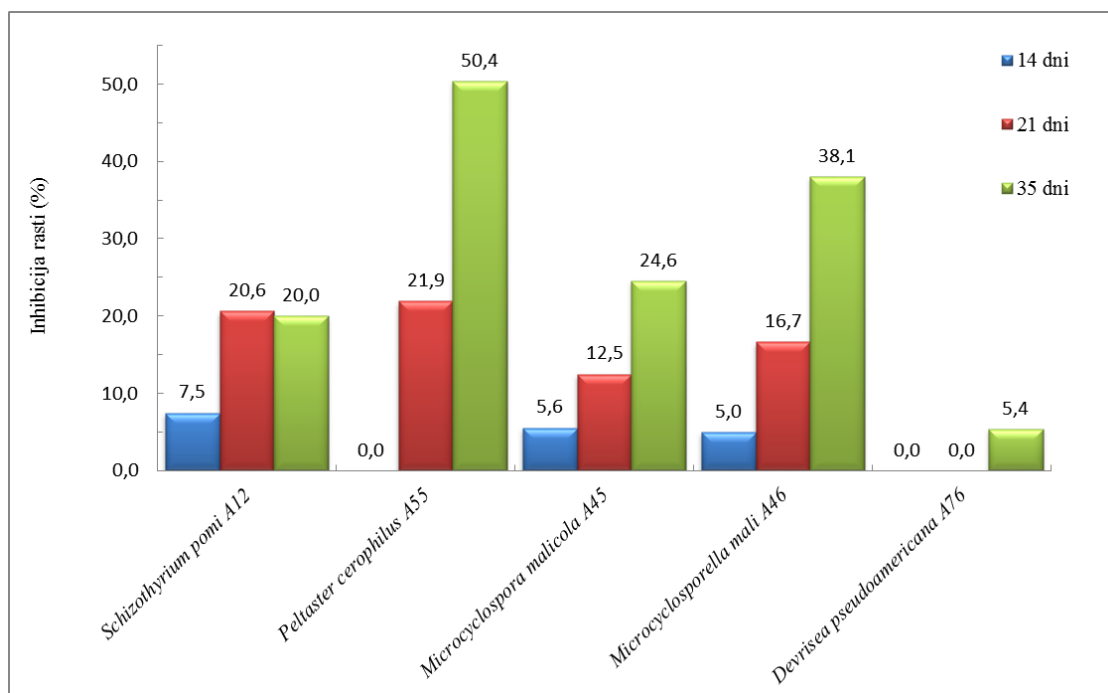
Poleg teh petih izolatov smo izbrali za nadaljnjo analizo še izolat vrste *M. tardicrescens* z oznako A53, saj je izmed vseh 83 izolatov edini pokazal velik antagonistični potencial proti rasti micelija patogene glive *C. fiorinae*, in sicer je bila inhibicija rasti micelija patogene glive po sedmih dneh 46,08 % in po 14 dneh 55,26 %.

Preglednica 14: Izbrani izolati z večjo inhibitorsko aktivnostjo znotraj vrst proti *V. inaequalis* in *C. fiorinae*

Table 14: Chosen strains within each species of SBFS fungi with higher inhibitory activity against *V. inaequalis* and *C. fiorinae*

Vrsta	Oznaka izolata	Tarčni organizem
<i>Schizothyrium pomi</i>	A12	<i>V. inaequalis</i>
<i>Peltaster cerophilus</i>	A55	<i>V. inaequalis</i>
<i>Microcyclospora malicola</i>	A45	<i>V. inaequalis</i>
<i>Microcyclosporella mali</i>	A46	<i>V. inaequalis</i>
<i>Devriesia pseudoamericana</i>	A76	<i>V. inaequalis</i>
<i>Microcyclospora tardicrescens</i>	A53	<i>C. fiorinae</i>

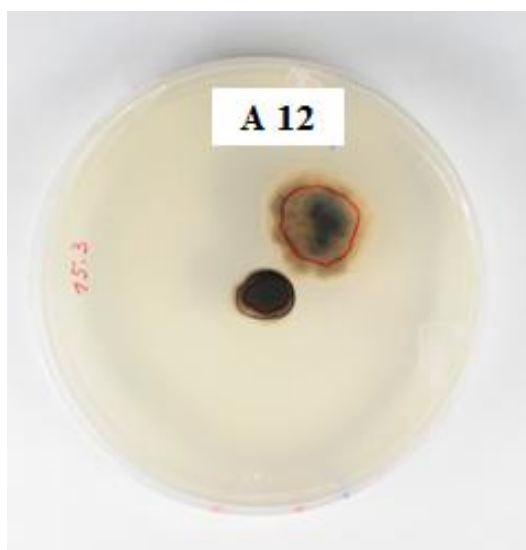
Njihova biokontrolna aktivnost je izražena kot odstotek inhibicije patogenih gliv *V. inaequalis* in *C. fiorinae* (predstavljen je na Sliki 30).



Slika 30: Izbrani izolati z največjim inhibitornim učinkom na rast micelija patogene glive *V. inaequalis*

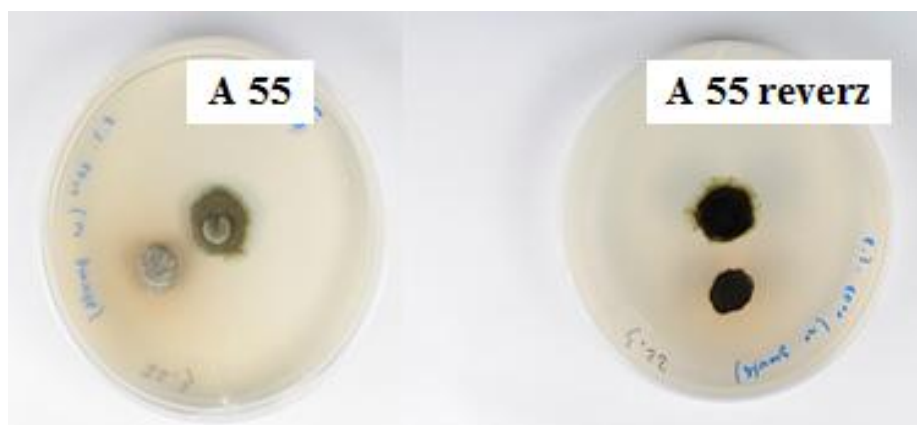
Figure 30: Chosen strains with the highest inhibitory effect on mycelial growth of pathogenic fungus *V. inaequalis*

V nadaljevanju so prikazane slike izbranih izolatov (Slika 31-33) z največjim inhibitornim učinkom na rast micelija patogene glive *V. inaequalis*: *S. pomi*, *P. cerophilus*, *M. mali*, *D. pseudoamericana*.



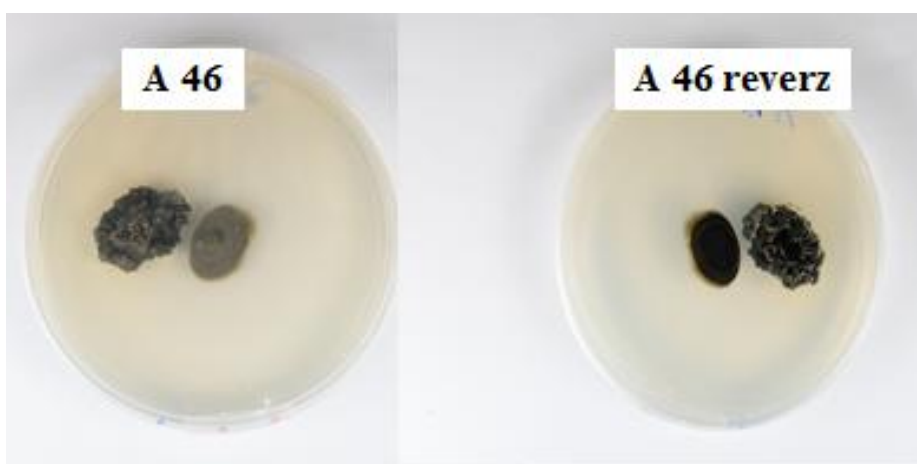
Slika 31: Izolat A12 *S. pomi* in *V. inaequalis* na sredini petrijeve plošče

Figure 31: Strain A12 *S. pomi* and *V. inaequalis* in the center of Petri dish



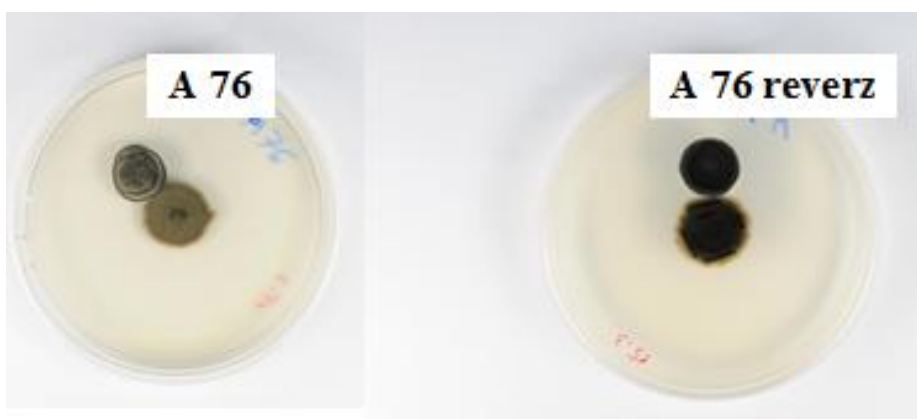
Slika 32: Izolat A55 *P. cerophilus* in *V. inaequalis* na sredini petrijeve plošče

Figure 32: Strain A55 *P. cerophilus* and *V. inaequalis* in the center of Petri dish



Slika 33: Izolat A46 *M. mali* in *V. inaequalis* na sredini petrijeve plošče

Figure 33: Strain A46 *M. mali* and *V. inaequalis* in the center of Petri dish



Slika 34: Izolat A76 *D. pseudoamericana* in *V. inaequalis* na sredini petrijeve plošče

Figure 34: Strain A76 *D. pseudoamericana* and *V. inaequalis* in the center of Petri dish

4.4 VPLIV EKSTRAKTOV NA KALITEV TROSOV

Izolate, ki so se najbolj izkazali proti glivi *V. inaequalis* in izolat proti glivi *C. fioriniae* smo uporabili za testiranje vpliva ekstraktov teh gliv na kalitev trosov glive *C. fioriniae*.

Preglednica 15: Ekstrakti različnih vrst SBFS gliv

Table 15: Fungal extracts from different SBFS species

Oznaka ekstrakta	Vrsta glive	Oznaka izolata
Ekstrakt 1	<i>Microcyclospora malicola</i>	A45
Ekstakt 2	<i>Microcyclospora tardicrescens</i>	A53
Ekstrakt 3	<i>Microcyclosporella mali</i>	A46
Ekstrakt 4	<i>Schizothyrium pomi</i>	A12
Ekstrakt 5	<i>Peltaster cerophilus</i>	A55

4.4.1 Vpliv dodanega etil acetata na kalitev trosov

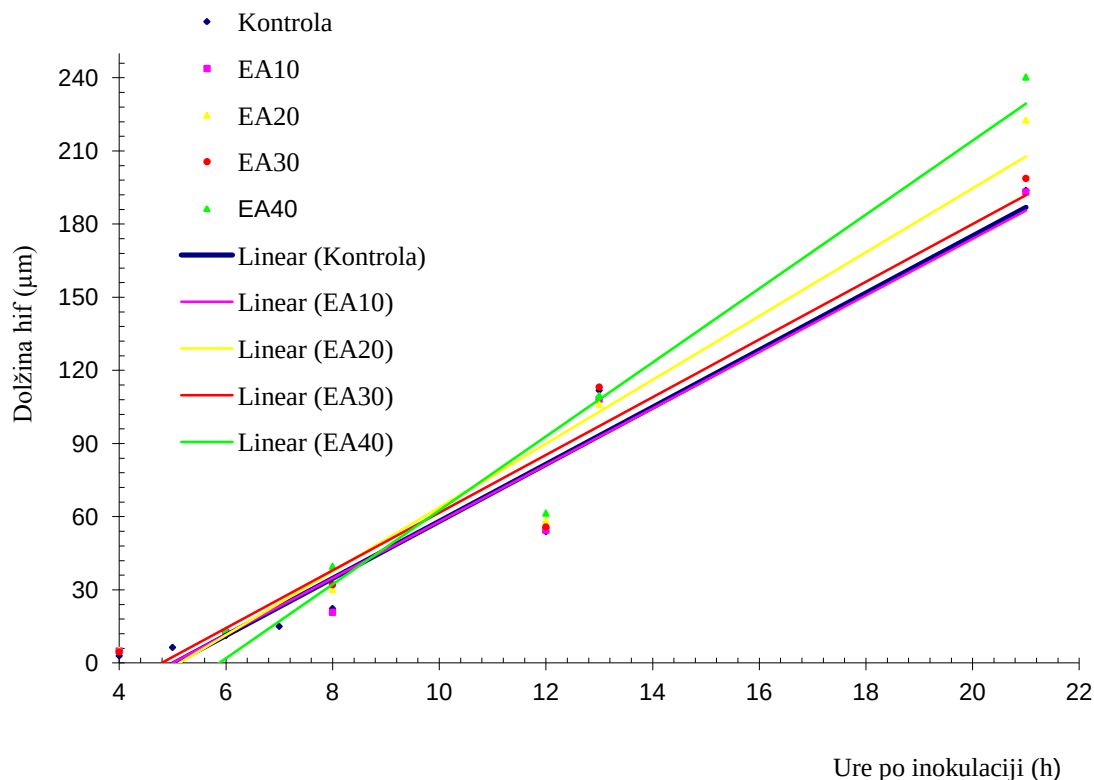
Med poskusom je dolžina hif v odvisnosti od časa linearno naraščala pri vseh testnih vzorcih (Preglednica 16, Priloga G1). Slika 35 prikazuje, da različni volumni dodanega etil acetata niso zavirali rasti hif po 4, 12, 13 in 21 urah po inokulaciji.

Ob vsaki meritvi smo imeli po več ponovitev na tretiranje oziroma na dodan volumen etil acetata. Brez meritev je bilo merjenje po 4 urah inkubacije, in sicer pri dodanem največjem volumnu etil acetata. Dolžine hif so bile največje pri 40 µl dodanega etil acetata. Rast hif je naraščala med posamezni merjenji, ki so si časovno sledila v razmiku nekaj ur. Najdaljše hife so bile izmerjene po 21 urah. Po 4 urah inkubacije je povprečna dolžina hif znašala 2,95 µm pri kontroli brez dodanega etil acetata in 4,56 µm pri dodanih 30 µl. Maksimalna dolžina hif pri dodanih 40 µl etil acetata po 6 in 8 urah od inokulacije je bila 18,01 µm in 54,53 µm. Minimalna dolžina hif pa je po 12 urah inkubacije pri tretiranju z dodanimi 10 µl organskega topila znašala 17,74 µm. Med vsemi različnimi dodanimi volumni etil acetata je bila največja standardna deviacija po 13 urah inkubacije 44,71 µm, in sicer pri 30 µl dodanega etil acetata. Maksimalno dolžino hif 347,19 µm na koncu poskusa smo izmerili pri tretiranju z 20 µl etil acetata (Priloga G1).

Preglednica 16: Opisna statistika učinka različnih volumnov (10, 20, 30, 40 µl) dodanega etil acetata na kalitev trosov patogene glive *C. fioriniae*

Table 16: Descriptive statistics for effect of different ethyl acetate volumes added on spore germination of pathogenic fungus *C. fioriniae*

Ura	Volumen	N	Povprečje	Std	Statistična značilnost
4	0	21	2,95	0,63	0,3554
	10	12	4,96	1,52	
	20	16	5,23	1,66	
	30	15	4,56	1,59	
	40	-	-	-	
6	0	6	11,28	2,01	0,0361
	10	9	12,57	3,14	
	20	3	12,57	1,79	
	30	7	12,67	2,11	
	40	12	13,48	3,14	
8	0	17	22,33	7,05	0,0151
	10	18	20,78	6,65	
	20	13	30,14	6,99	
	30	17	32,14	7,58	
	40	18	39,67	9,12	
12	0	7	53,90	14,46	0,0776
	10	11	54,5	15,19	
	20	12	58,34	9,74	
	30	7	55,83	13,20	
	40	11	61,49	9,13	
13	0	15	111,85	28,14	0,9535
	10	10	108,21	22,83	
	20	9	106,10	18,02	
	30	11	113,18	44,71	
	40	12	109,69	19,04	
21	0	10	193,80	45,03	0,1485
	10	6	193,17	22,87	
	20	13	222,68	61,31	
	30	9	198,75	31,59	
	40	11	240,32	73,12	



Slika 35: Vpliv etil acetata na kalitev trosov patogene glive *C. fiorinae*

Figure 35: Effect of ethyl acetate on conidia germination of pathogenic fungus *C. fiorinae*

Trosi so na kontrolni SNA plošči brez dodanega etil acetata vzkli 4 ure po inokulaciji suspenzije trosov, zato so bile prve meritve opravljene po 4 urah. Nato smo meritve ponavljali v določenih časovnih intervalih.

Na podlagi statistične analize lahko vidimo (Preglednica 16), da volumen etil acetata ni vplival na dolžino hif po 4, 12, 13 in 21 urah inkubacije na SNA gojišču. Statistično značilen vpliv ($<0,05$) volumna etil acetata se je pokazal pri meritvah, opravljenih po 6 in 8 urah.

4.4.2 Vpliv ekstraktov na kalitev trosov

V Preglednici 17 smo prikazali primerjavo med kontrolo brez dodanega etil acetata in posameznimi glivnimi ekstrakti iz različnih vrst gliv (*M. malicola*, *M. tardicrescens*, *M. mali*, *S. pomi* in *P. cerophilus*). Meritve na vzorcih z dodanimi ekstrakti so potekale v različnih intervalih, in sicer po 7, 9, 12, 13, 15 in 21 urah. Pri dodatku ekstrakta 1, 2 hife niso rasle v nobenem primeru. Po 7 urah inkubacije so hife rasle zgolj pri kontrolni skupini in pri dodatku ekstrakta 5. Povprečna dolžina hif je bila po 7 urah inkubacije pri kontrolni skupini za 5,1 µm krajša. Pri meritvah po 9 urah inkubacije so bile v povprečju najkrajše hife pri ekstraktu 3, kjer so bile celo krajše kot povprečje pri kontroli po 7 urah. Precejšnje razlike v dolžini hif med kontrolo in ekstraktom 5 v

primerjavi z ekstraktom 3 je opaziti po 12 urah. Pri ekstraktu 4 so hife rastle v enem primeru, kjer smo dolžino slabih 20 μm izmerili šele 13 ur po inokulaciji suspenzije trosov. Dokaj dobro se je odrezal tudi ekstrakt 3, kjer lahko po 21 urah pričakujemo dolžino hif okoli 60 μm . Vzporedno s kontrolo pa so v povprečju rasle hife tudi pri ekstraktu 5, vendar pa so bile v primerjavi s kontrolo po 21 urah za okoli 20 μm krajše. Pri dodanem ekstraktu 4 je na koncu poskusa znašala povprečna dolžina hif bistveno manj od kontrole in ekstrakta 5, in sicer 26,91 μm .

Preglednica 17: Opisna statistika primerjave kontrol in ekstraktov
Table 17: Descriptive statistics, comparison of controls and extracts

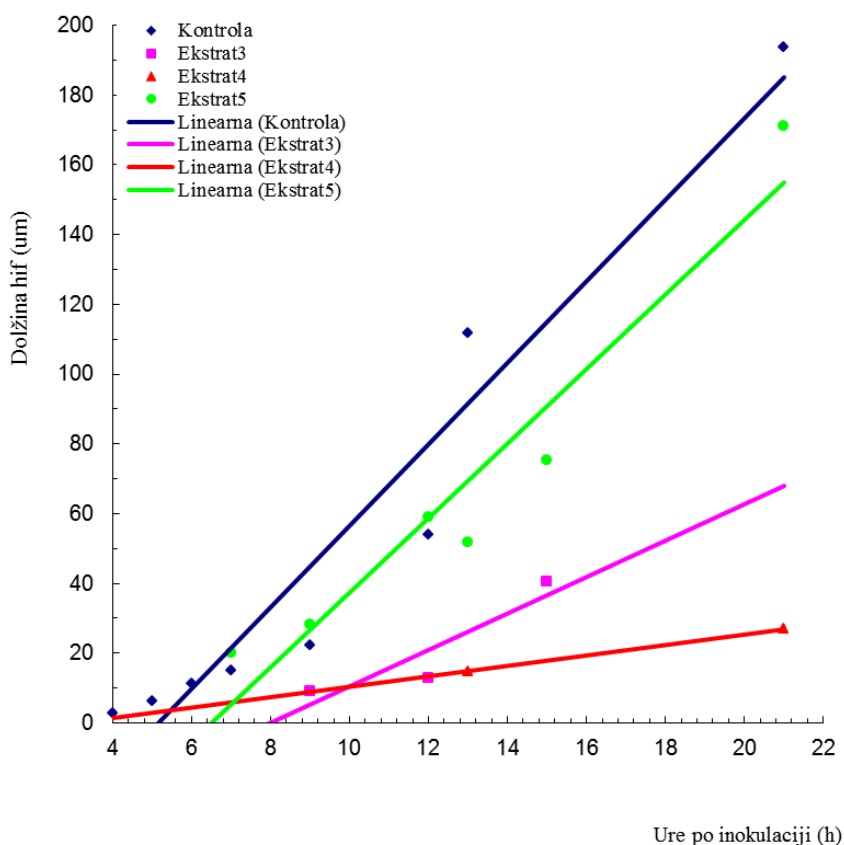
Čas (h)	Ekstrakt	N	Povprečje	Std	Statistična značilnost
7	Kontrola	12	15,04	3,14	0,0749
	Ekstrakt 1	10	0	0	
	Ekstrakt 2	9	0	0	
	Ekstrakt 3	-	-	-	
	Ekstrakt 4	-	-	-	
	Ekstrakt 5	13	20,14	8,96	
9	Kontrola	17	22,33	7,04	0,0005
	Ekstrakt 1	11	0	0	
	Ekstrakt 2	8	0	0	
	Ekstrakt 3	5	9,22	3,13	
	Ekstrakt 4	-	-	-	
	Ekstrakt 5	8	28,28	9,78	
12	Kontrola	7	53,90	14,46	<0,0001
	Ekstrakt 1	9	0	0	
	Ekstrakt 2	9	0	0	
	Ekstrakt 3	13	12,90	5,29	
	Ekstrakt 4	-	-	-	
	Ekstrakt 5	15	59,11	17,69	
13	Kontrola	15	111,85	28,14	<0,0001
	Ekstrakt 1	11	0	0	
	Ekstrakt 2	7	0	0	
	Ekstrakt 3	-	-	-	
	Ekstrakt 4	3	14,89	13,46	
	Ekstrakt 5	4	51,84	33,88	
15	Kontrola	-	-	-	0,0002
	Ekstrakt 1	7	0	0	
	Ekstrakt 2	10	0	0	
	Ekstrakt 3	7	40,67	12,65	
	Ekstrakt 4	-	-	-	
	Ekstrakt 5	24	76,57	20,60	
21	Kontrola	10	193,80	45,03	<0,0001
	Ekstrakt 1	8	0	0	
	Ekstrakt 2	9	0	0	
	Ekstrakt 3	-	-	-	
	Ekstrakt 4	5	26,91	9,60	
	Ekstrakt 5	9	171,07	59,17	

Vpliv posameznih ekstraktov na kalitev trosov je viden na Sliki 36. Na podlagi dobljenih rezultatov lahko trdimo, da sta ekstrakta 1 in 2 popolna zaviralca rasti hif, medtem ko pri ostalih hife rastejo, vendar počasneje. Dolžine hif so bile v vseh

časovnih intervalih najdaljše pri kontroli, kjer ni bilo dodanega nobenega ekstrakta. Kontrolni skupini sledijo dolžine hif pri ekstraktu 5, kjer lahko trdimo, da je hitrost rasti hif enaka kot pri kontroli, le da rast hif nastopi kasneje (premici sta vzporedni). Hife pa niso bile na koncu poskusa daljše od 40 μm pri ekstraktu 4. Tu je minimalna dolžina hif po 21 urah inkubacije znašala 14,81 μm . Na koncu poskusa je največji inhibični učinek na rast hif dosegel ekstrakt 4, sledita mu ekstrakt 3 in ekstrakt 5 z najmanjšo inhibicijo rasti hif v primerjavi s kontrolo.

Meritve na vzorcih z dodanimi ekstrakti so bile opravljene v različnih intervalih. Pri ekstraktu 4 so hife rastle v enem primeru, kjer smo dolžino slabih 20 μm izmerili šele 13 ur po inokulaciji. Pri ekstraktu 3 smo po 21 urah inkubacije izmerili dolžino hif okoli 60 μm . Vzporedno z rastjo hif pri kontroli pa so rasle hife pri dodanem ekstraktu 5. V tem primeru so bile hife v primerjavi s kontrolo po 21 urah za okoli 20 μm krajše.

Tudi na podlagi statistične analize lahko sklepamo, da na dolžino hif vpliva dodan glivni ekstrakt (Preglednica 17). Statistično značilne razlike ($\leq 0,05$) v dolžini hif se pojavljajo pri vseh intervalih, izjema je le interval 7 ur po inokulaciji.



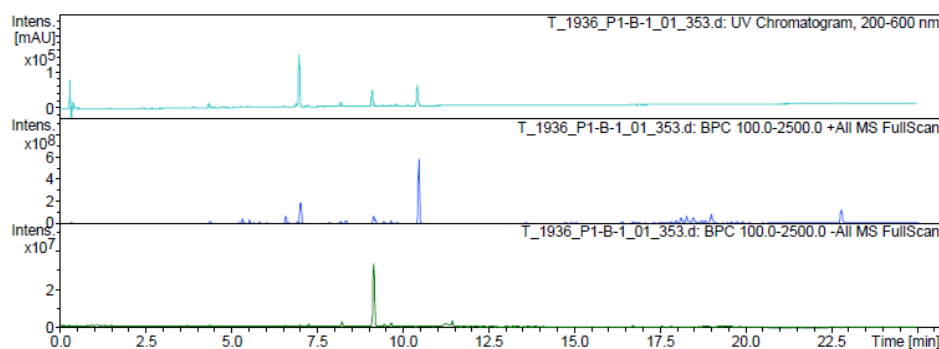
Slika 36: Vpliv ekstraktov gliv na kalitev trosov patogene glive *C. fioriniae*
Figure 36: Effect of fungal extracts on conidia germination of pathogenic fungus *C. fioriniae*

4.5 SEKUNDARNI METABOLITI

4.5.1 Analitske tehnike

4.5.1.1 Ločba spojin v glivnem ekstraktu z RF-UHPLC-DAD

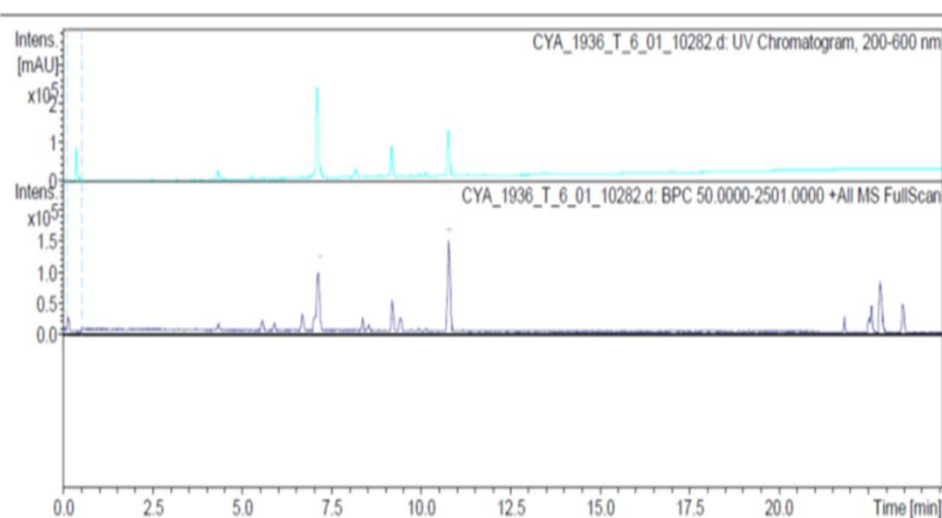
Glivni ekstrakt smo prvič detektirali s IT-MS, v nadaljevanju pa smo uporabljali TOF-MS. Slike 37 – prva vrsta, 37 – druga vrsta in 37 – tretja vrsta prikazujejo eluirane spojine detektirane z DAD (Slika 37 – prva vrsta), z LC-IT-MS s pozitivno (Slika 37 – druga vrsta) in z LC-IT-MS z negativno ionizacijo (Slika 37 – tretja vrsta). Na kromatogramu posnetem v pozitivni ESI vidimo več kromatografskih vrhov, katerih intenziteta je višja od tistih v kromatogramu posnetem v negativni ESI.



Slika 37: Kromatogrami glivnega ekstrakta; prva vrsta – UV kromatogram, druga vrsta - masni kromatogram v pozitivni ESI, tretja vrsta - negativni ESI

Figure 37: Chromatograms from fungal extracts; first line – UV chromatogram, second line - mass chromatogram in positive ESI, third line - negative ESI

Ker je bilo več vrhov posnetih v pozitivni ionizaciji kot v negativni, smo v nadaljevanju bioaktivni ekstrakt posnemali v pozitivni ionizaciji s TOF-MS detektorjem (Slika 38).



Slika 38: +ESI LC-TOF-MS kromatogram

Figure 38: + ESI LC-TOF-MS chromatogram

4.5.2 Analitski postopki

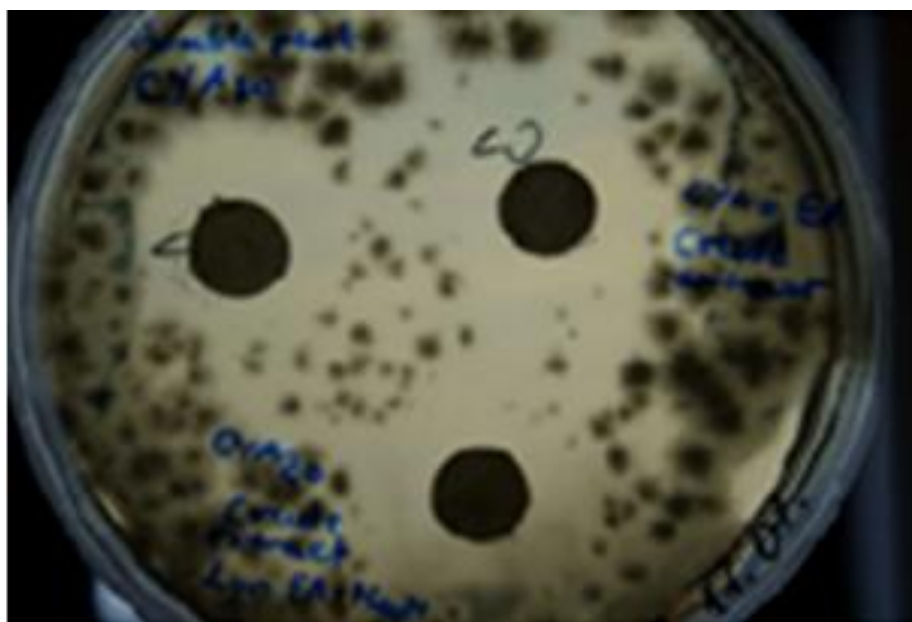
4.5.2.1 Difuzijski test glivnega ekstrakta

50 µl glivnega ekstrakta iz kolonij glive *M. tardicrescens* koncentracije 1 mg/ml položenega na filter disk premera 10 mm ni imel nobenega učinka na Gram pozitivne bakterije *B. subtilis* in *Escherichia coli*. Glivni ekstrakt je deloval inhibitorno proti obema glivama *C. fiorinae* in *M. hiemalis* (Slika 39 in Slika 40). Premer cone inhibicije z 10 mm diskom je 23 mm pri glivi *C. fiorinae* in 14 mm pri glivi *M. hiemalis*.

Preglednica 18: Aktivnost ekstrakta glive *M. tardicrescens* iz CYA gojišča v difuzijskem testu

Table 18: Extract activity of the fungus *M. tardicrescens* from CYA medium in agar diffusion assay

Organizmi	Premer cone inhibicije (mm)
<i>Colletotrichum fiorinae</i>	23
<i>Mucor hiemalis</i>	14
<i>Bacillus subtilis</i>	brez inhibitorne aktivnosti
<i>Escherichia coli</i>	brez inhibitorne aktivnosti



Slika 39: Vpliv ekstrakta glive *M. tardicrescens* na filter diskih na glivo *C. fiorinae*

Figure 39: Effect of fungal extract from the fungus *M. tardicrescens* on filter discs on the fungus *C. fiorinae*



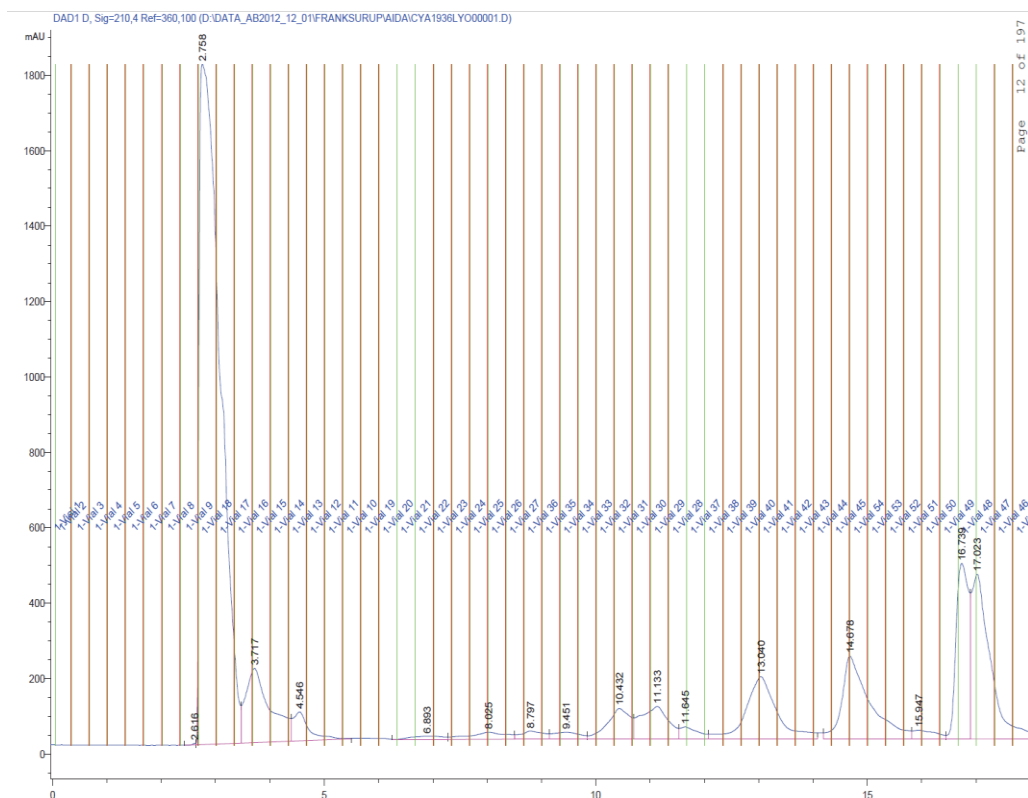
Slika 40: Vpliv ekstrakta glive *M. tardicrescens* na filter diskih na glivo *Mucor hiemalis*

Figure 40: Effect of fungal extract from the fungus *M. tardicrescens* on filter discs on the fungus *Mucor hiemalis*

4.5.2.2 Preparativna RF-HPLC

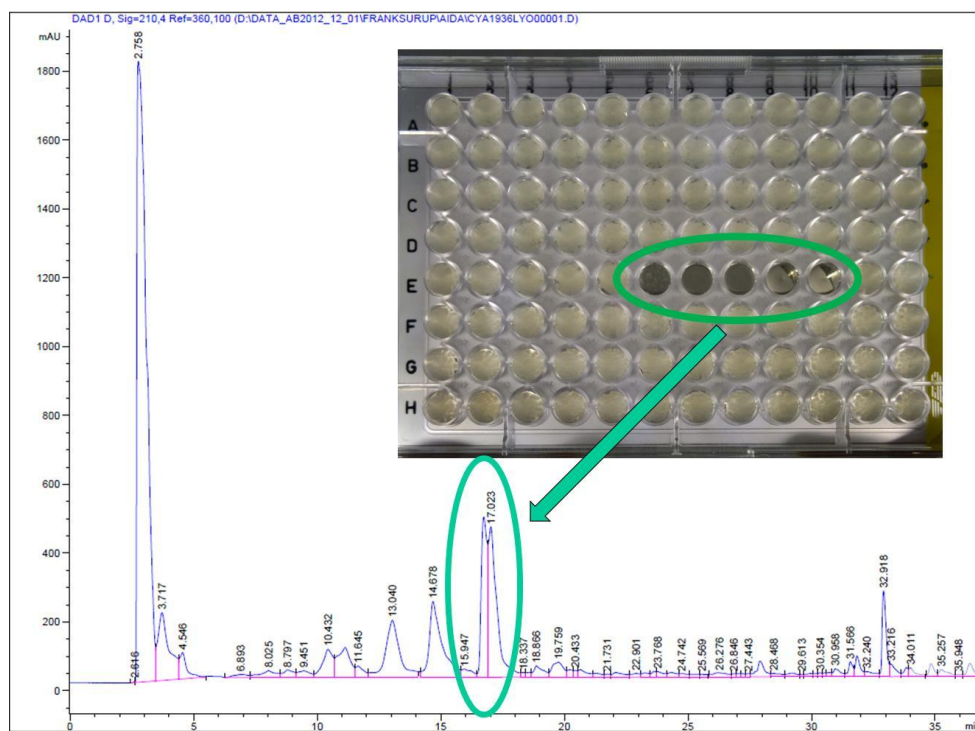
Preparativno (RF) HPLC smo uporabili za izolacijo in čiščenje spojin. Zbirali smo 20 sekundne frakcije v epruvetah označenih s številkami 1 do 103, kar prikazuje Slika 41.

Bioaktivni potencial vsake posamezne frakcije proti patogeni glivi *C. fioriniae* smo testirali na mikrotitrski plošči. Inhibitorni učinek smo zaznali v luknjicah (frakcijah) 46-50 (Slika 42), ki se s kolone eluirajo v času od 16 min 36 sekund do 18 minut. V tem retencijskem času je na kromatogramu viden dvojni vrh, na podlagi česar lahko sklepamo, da sta najmanj dve spojini odgovorni za inhibitorni učinek.



Slika 41: Zbiranje frakcij ekstrakta glive *M. tardicrescens*

Figure 41: Fraction collection of the fungus extract from *M. tardicrescens*

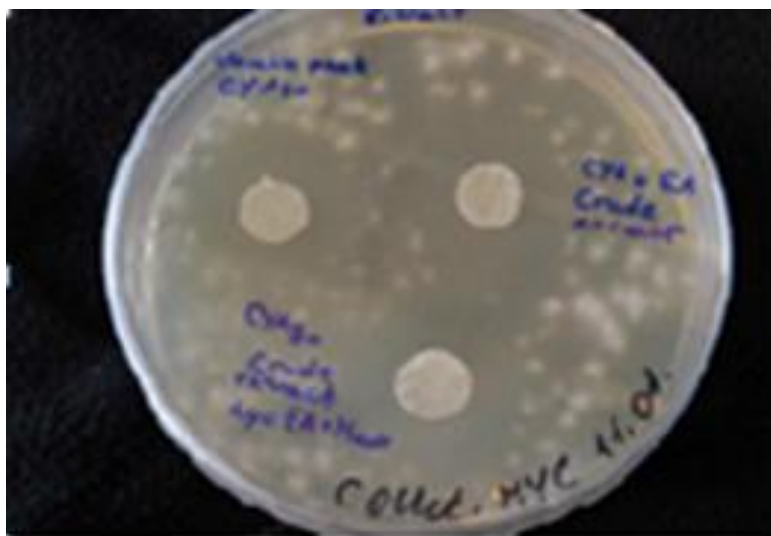


Slika 42: Preparativni RF-UHPLC kromatogram iz ekstrakta glive *M. tardicrescens*

Figure 42: Preparative RF-UHPLC chromatogram from extract of the fungus *M. tardicrescens*

4.5.2.3 Difuzijski test spojin iz dvojnega vrha

Z biološkim testom s filter diski na trdem gojišču smo poleg inhibitornega učinka na rast patogenih gliv dodatno potrdili tudi visoko antimikrobno aktivnost spojin iz dvojnega vrha proti glivama *M. hiemalis* in *C. fioriniae*. Intenziteta antimikrobne aktivnosti smo merili glede na premer cone inhibicije rasti patogenih gliv. Inhibitorni učinek spojin prisotnih v dvojnem vrhu je pri meritvah pokazal minimalna odstopanja od inhibitornega učinka celotnega glivnega ekstrakta (Preglednica 19). Za končno identifikacijo smo spojini pozneje kromatografsko ločili.



Slika 43: Vpliv spojin iz dvojnega vrha pri *M. tardicrescens* proti *C. fioriniae*

Figure 43: Effect of the compounds from double peak of *M. tardicrescens* against *C. fioriniae*



Slika 44: Vpliv spojin iz dvojnega vrha pri *M. tardicrescens* proti *M. hiemalis*

Figure 44: Effect of the compounds from double peak of *M. tardicrescens* against *M. hiemalis*

Preglednica 19: Aktivnost ekstrakta in izoliranih metabolitov glive *M. tardicrescens* iz CYA gojišča v difuzijskem testu

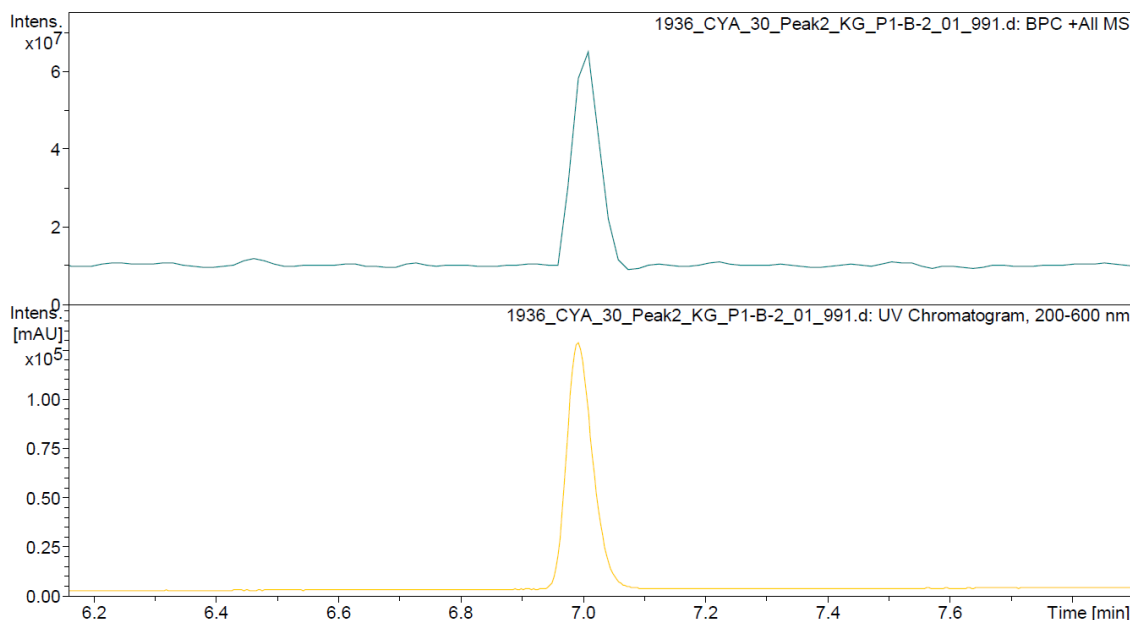
Table 19: Extract activity and isolated metabolites of the fungus *M. tardicrescens* from CYA medium in agar diffusion assay

Organizmi	Premer cone inhibicije (mm)	
	ekstrakt (1 mg/ml)	Spojine izolirane iz frakcij 47,48,49 dvojne vrha (1 mg/ml)
<i>Colletotrichum fiorinae</i>	23	22
<i>Mucor hiemalis</i>	14	13
<i>Bacillus subtilis</i>	brez inhibitorne aktivnosti	brez inhibitorne aktivnosti
<i>Escherichia coli</i>	brez inhibitorne aktivnosti	brez inhibitorne aktivnosti

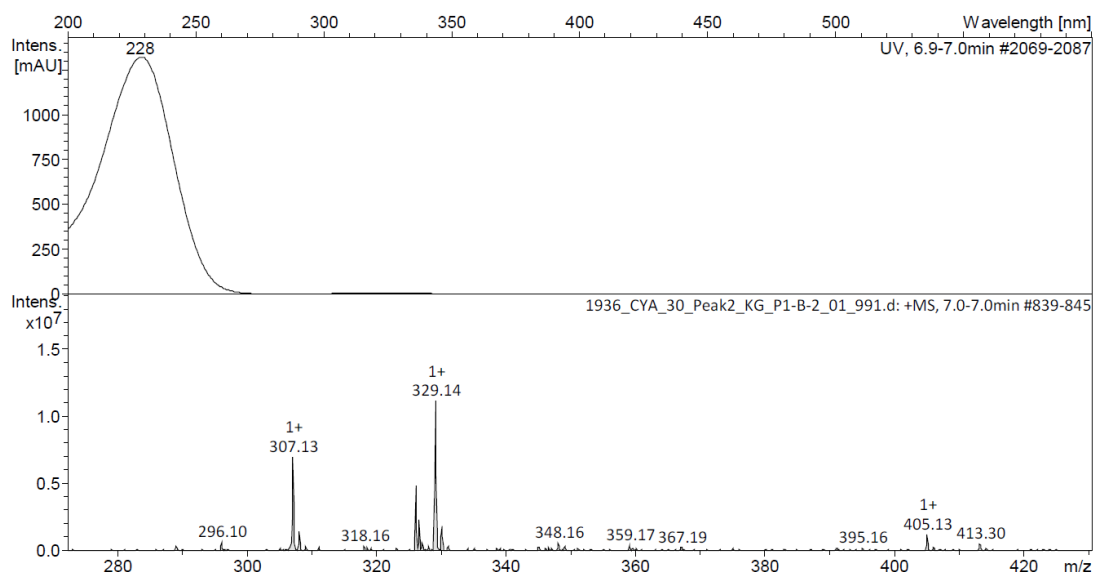
4.5.2.4 Identifikacija bioaktivnih spojin dvojnega vrha

Robni frakciji 50 (na začetku dvojnega vrha) in 46 (na koncu dvojnega vrha) smo po prvi preparativni (RF) HPLC uporabili za NMR analizo. Frakcije 47, 48, 49 smo združili in ločili s preparativno NF-UHPLC. Dobljeni frakciji smo inicirali v +ESI-LC-TOF-MS in tako določili točno maso in elementno sestavo spojin. Kromatograma posneta z DAD in +ESI-TOF detektorjem sta prikazana na Slikah 45 in 47, masna spektra obeh spojin pa na Slikah 46 in 48.

Slika 46 prikazuje UV in masni kromatogram neznane spojine 1 iz dvojnega UV vrha pri času 7,0 min. (vrh 2). Kot molekulski vrh $(M+1)^+$ je bil izoliran ion 307,13, ki pripada spojini z molsko maso 306 Da in ji ustreza empirična formula spojine 1 $C_{17}H_{22}O_5$.



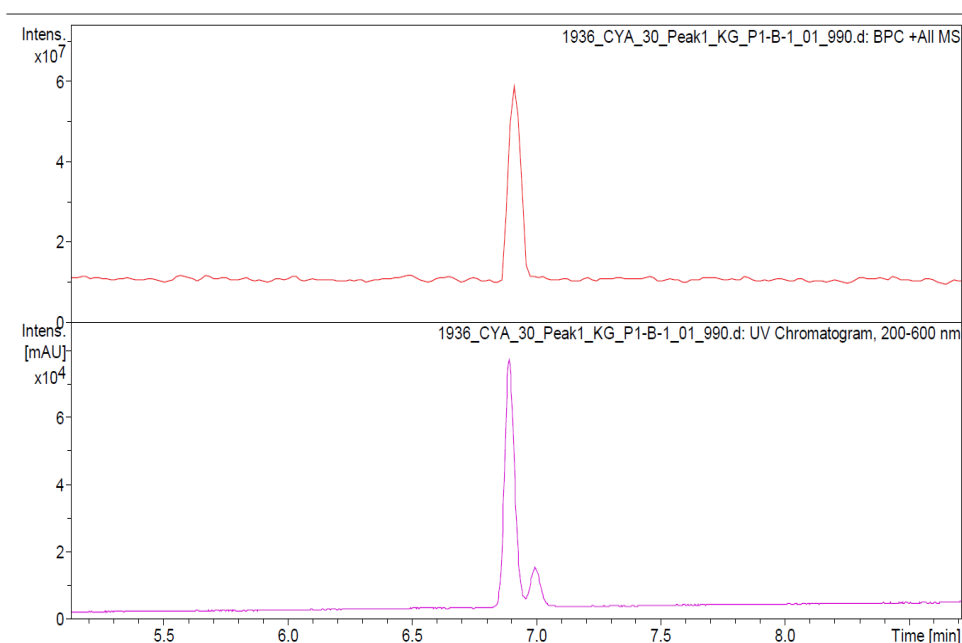
Slika 45: Kromatografski ločba spojine 1 (zgornja vrstica - +ESI-MS, spodnja vrstica - UV detekcija)
Figure 45: Chromatographic peak of the compound 1 (upper line - +ESI-MS, lower line - UV detection)



Slika 46: UV spekter in +ESI-TOF-MS spekter spojine 1, tr 7,0 min

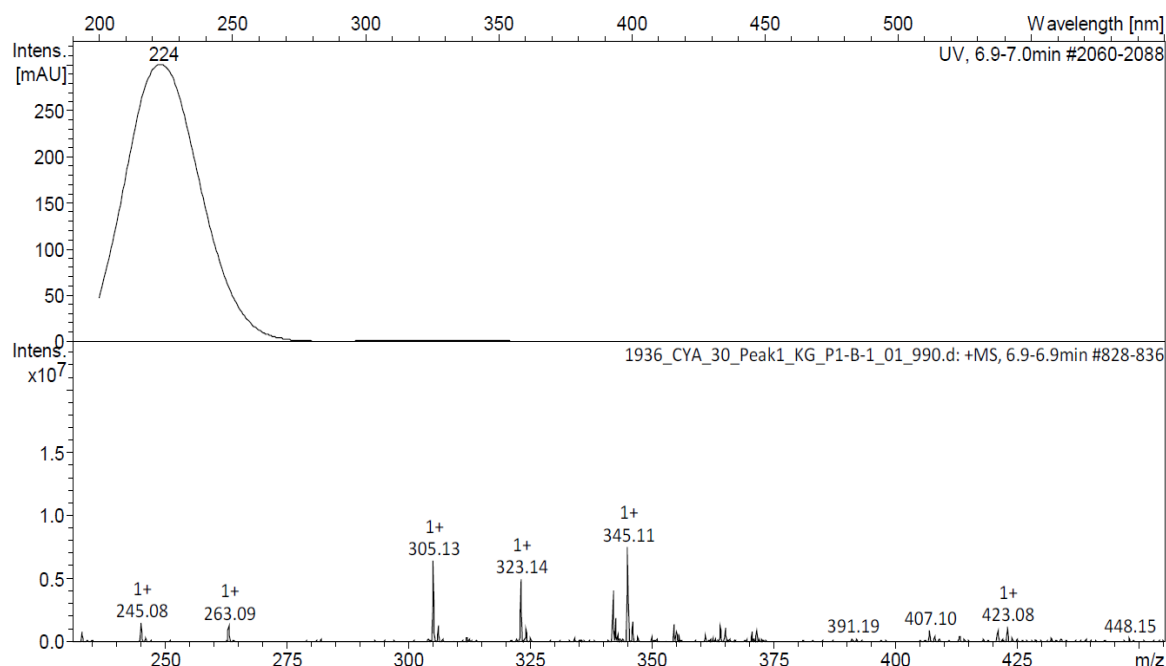
Figure 46: UV spectrum and +ESI-TOF-MS spectrum of compound 1, t_r 7,0 min

Na Sliki 47 sta prikazana UV in masni kromatogram neznane spojine 2 iz dvojnega UV vrha pri času 6,9 min. (vrh 1). Kot molekularni vrh ($M+1$)⁺ je bil izoliran ion 323,14, ki pripada spojini z molsko maso 322. Da in ji ustreza empirična formula spojine 2 C₁₇H₂₂O₆. Iz masnega spektra spojine 2 se vidi molekularni vrh pri m/z 323,14. Osnovni podatki o spojini 1 in spojini 2 so zbrani v Preglednici 20.



Slika 47: Kromatografska ločba spojine 2 (zgornja vrstica - +ESI-TOF-LC-MS detekcija, spodnja vrstica - UV detekcija)

Figure 47: Chromatographic peak of compound 2 (upper line - +ESI-TOF-LC-MS detection, lower line - UV detection)



Slika 48: Masni spekter spojine 2 (zgornja vrstica - UV detekcija, spodnja vrstica - +ESI-TOF-LC-MS detekcija)

Figure 48: Mass spectrum of compound 2 (upper line - UV detection, lower line - +ESI-TOF-LC-MS detection)

Preglednica 20: Retencijski časi (t_R), molske mase in m-z vrednosti posameznih bioaktivnih spojin, spojine 1 (trihotekolon acetat) in spojine 2 (7 – hidroksitrihotekolon acetat)

Table 20: Retention time (t_R), molecular mass and m/z values of each bioactive compounds, compound 1 (trichothecolone acetate) and compound 2 (7-hydroxytrichothecolone acetate)

Spojina	t_R (min)	M (g-mol)	m-z vrednost ESI+	Empirična formula
Spojina 1	7,0	306	307,13 (100 %)	$C_{17}H_{22}O_5$
Spojina 2	6,9	322	323,14 (100 %) 305,13 345,11 245,08 263,09	$C_{17}H_{22}O_6$

4.5.2.5 Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) bioaktivnih spojin

Rezultati testa MIK so prikazani v spodnji preglednici. Obe izolirani spojini testirani v dilucijsem testu, spojina 1 (trihotekolon acetat) in spojina 2 (7- hidroksitrihotekolon acetat) nista pokazali nobene antimikrobne aktivnosti proti *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* in *S. aureus*. Največja testirana koncentracija spojine 1 in 2 je bila 100 $\mu\text{g/ml}$, zato je minimalna inhibitorna koncentracija pri bakterijah $>100 \mu\text{g/ml}$. MIK potrebna za inhibicijo rasti kvasovke *P. anomala* je bila 50 $\mu\text{g/ml}$ pri obeh aktivnih

spojinah, medtem ko je MIK potrebna za inhibicijo rasti glive *C. fioriniae* bistveno manjša, in sicer 12,5 µg/ml pri novi spojini (7- hidroksitrihotekolon acetat) in zgolj 6,25 µg/ml pri spojini trihotekolon acetat.

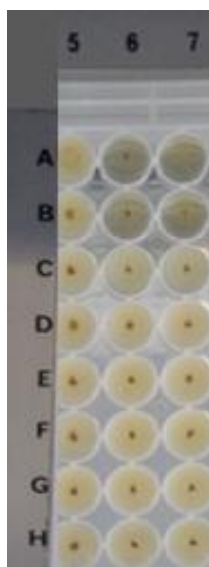
Preglednica 21: Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) spojine 1 (trihotekolon acetat) in spojine 2 (7 – hidroksitrihotekolon acetat)

Table 21: Minimum inhibitory concentration (MIC) of compound 1 (trichothecolone acetate) and compound 2 (7-hydroxytrichothecolone acetate)

Testni organizmi	Spojina 1 (µg/ml)	Spojina 2 (µg/ml)
<i>Colletotrichum fioriniae</i>	6,25	12,5
<i>Pichia anomala</i>	50	50
<i>Candida tenuis</i>	50	100
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6,25	12,5
<i>Bacillus subtilis</i>	>100	>100
<i>Escherichia coli</i>	>100	>100
<i>Staphylococcus aureus</i>	>100	>100

Slika 49 in Slika 50 prikazujeta primer 96 mikrodilucijske plošče proti dvem fitopatogenim glivam, *Pichia anomala* in *C. fioriniae*. Stolpci prikazujejo testirane spojine, medtem ko vrstice prikazujejo redčitve. V našem primeru smo testirali dve spojini, v stolpcu 6 spojino 7- hidroksitrihotekolon acetat in v stolpcu 7 spojino trihotekolon acetat.

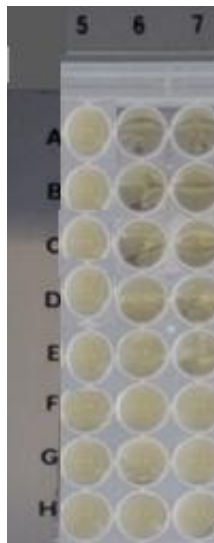
Mikrodilucijska plošča proti *P. anomala* (Slika 49) prikazuje inhibicijo spojine 7- hidroksitrihotekolon acetat do vrste B (6B) in enako pri spojini trihotekolon acetat (7B).



Slika 49: Test MIK pri *P. anomala*
stolpec 5 – kontrola, stolpec 6 je 7-hidroksitrihotekolon acetat; stolpec 7 je trihotekolon acetat

Figure 49: MIC assay for *P. anomala*
Column 5 – control, column 6 is 7-hydroxytrichothecolone acetate, column 7 is trichothecolone acetate

Mikrodilucijska plošča proti *C. fioriniae* (Slika 50) prikazuje inhibicijo spojine 7-hidroksitrihotekolon acetat do vrste D (6D) in pri spojini trihotekolon acetat do vrste E (7E).



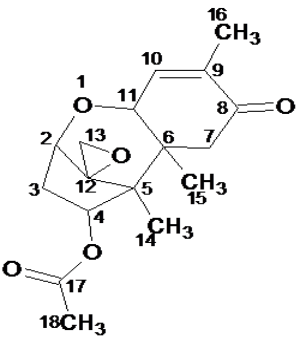
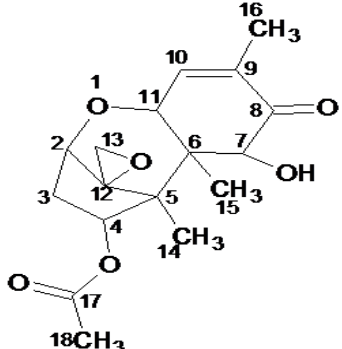
Slika 50: Test MIK pri *C. fioriniae*
Stolpec5 – kontrola, stolpec 6 je 7-hidroksitrihotekolon acetat, stolpec 7 je trihotekolon acetat
Figure 50: MIC assay for *C. fioriniae*
Column 5 – control, column 6 is 7-hydroxytrichothecolone acetate, column 7 is trichothecolone acetate

4.5.2.6 Strukturna identifikacija spojin (NMR)

Rezultati NMR so bili dobljeni naknadno. Spojina 1 je bila identificirana kot poznan metabolit trihotekolon acetat, medtem ko je druga spojina nepoznana in smo jo identificirali kot 7-hidroksitrihotekolon acetat.

Strukturi spojin 1 in 2, izoliranih iz kulture glive *M. tardicrescens*, sta prikazani v Preglednici 22.

Preglednica 22: Struktura izoliranih spojin
Table 22: Structure of isolated compounds

	Ime	Empirična formula	Molekulska masa	Struktura
Spojina 1	Trihotekolon acetat	$C_{17}H_{22}O_5$	306 Da	
Spojina 2	7-hidroksitrihotekolon acetat	$C_{17}H_{22}O_6$	322 Da	

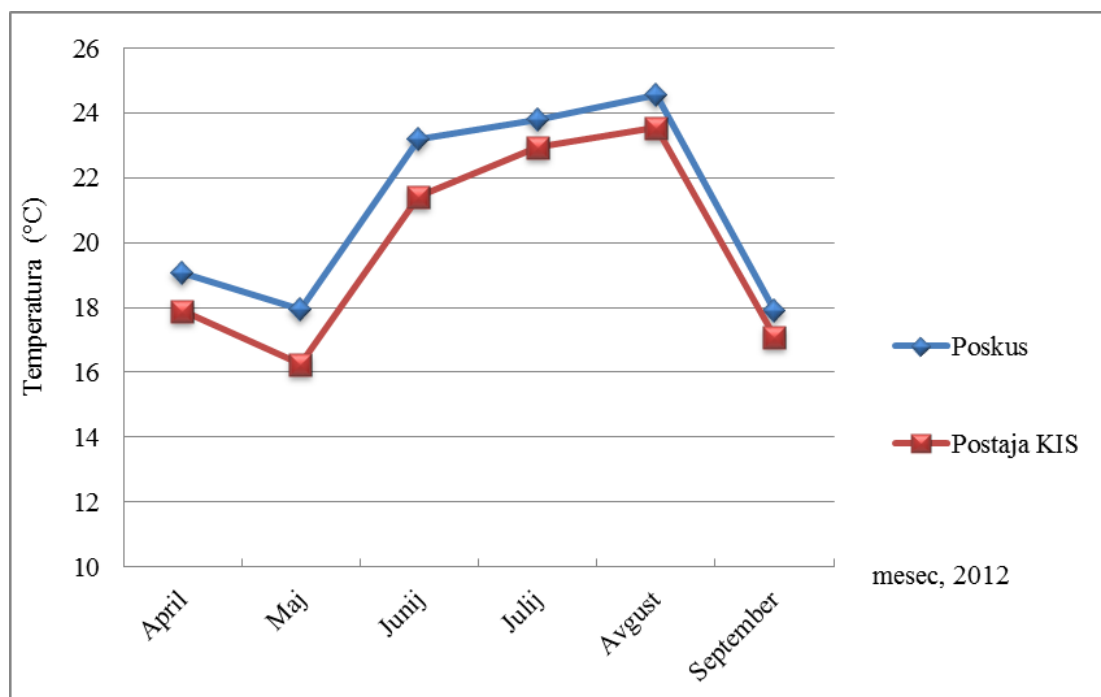
4.6 IN VIVO TEST

4.6.1 Pogoji testiranja

In vivo poskusi so se izvajali na Kmetijskem inštitutu Slovenije. Pogoji testiranja so opisani v poglavju 3.4.

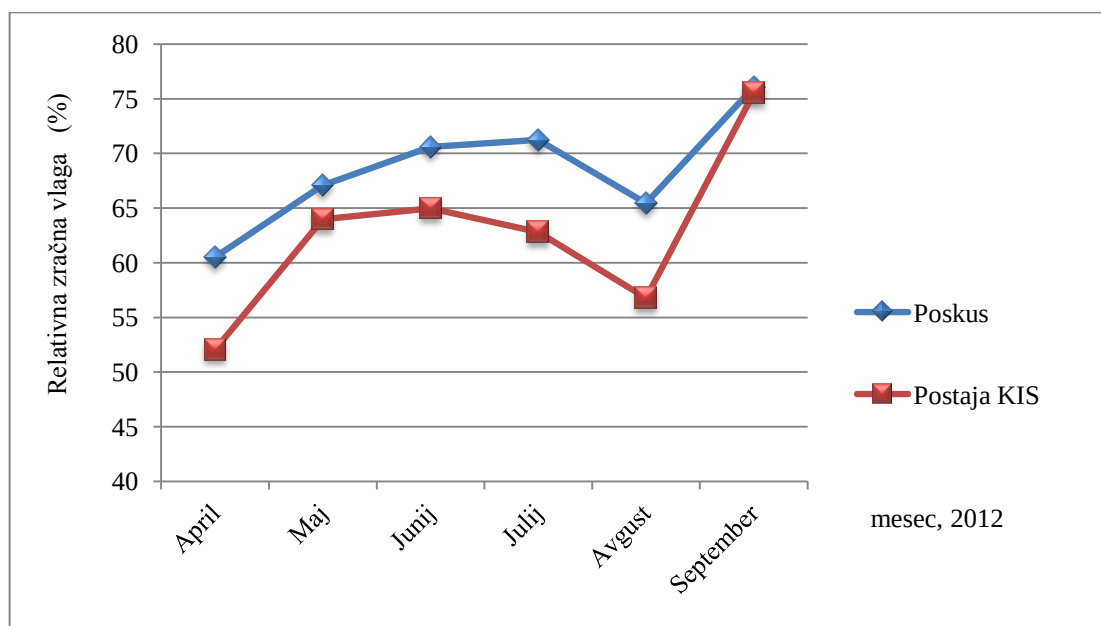
Tekom poskusa je higrotermometer vsako uro beležil povprečno temperaturo in relativno zračno vlago. Okoli poskusnih dreves smo želeli z oroševanjem umetno povišati relativno zračno vlago. Meritve smo primerjali z zunanjimi hidrološkimi meritvami iz postaje na Kmetijskem inštitutu Slovenije in hidrološkimi meritvami v Ljubljani.

Slika 51 in Slika 52 prikazujeta rezultate povprečnih mesečnih temperatur in vlažnosti na mestu poskusa in meritve iz postaje KIS ter Ljubljane.



Slika 51: Povprečne temperature pri izvajanju *in vivo* testiranja

Figure 51: Average temperature in *in vivo* assay



Slika 52: Povprečna relativna zračna vlaga pri izvajanju *in vivo* testiranja

Figure 52: Average relative area humidity in *in vivo* assay

Vse meritve so bile izvedene s higrotermometrom KMS-P.



Slika 53: Merilec temperature in relativne vlage
Figure 53: Gauge the temperature and relative humidity

Na Sliki 54 in Sliki 55 je prikazana velikost jabolk ob začetku poskusa in tri tedne po začetku okuževanja.



Slika 54: Začetek *in vivo* poskusa
Figure 54: Begging of *in vivo* assay



Slika 55: Jabolka v *in vivo* poskusu po treh tednih od začetne okužbe
Figure 55: Apples in the *in vivo* assay after three weeks from the first infection

4.6.2 Rezultati za glivo *Microcyclospora malicola*

V Prilogi G1 je prikazana preglednica rezultatov in vivo testiranja za glivo *M. malicola*. Na Sliki 56 so prikazane okužbe plodov na koncu poskusa.



Slika 56: Okužbe z glivo *M. malicola* na koncu in vivo poskusa

Figure 56: Infections with the fungus *M. malicola* at the end of the in vivo assay

4.6.3 Rezultati za glivo *Microcyclospora tardicrescens*

V Prilogi G2 je prikazana preglednica rezultatov in vivo testiranja za glivo *M. tardicrescens*. Na Sliki 57 so prikazane okužbe plodov na koncu poskusa.



Slika 57: Okužbe z glivo *M. tardicrescens* na koncu in vivo poskusa

Figure 57: Infections with the fungus *M. tardicrescens* at the end of the in vivo assay

4.6.4 Rezultati za glivo *Peltaster cerophilus*

V Prilogi G3 je prikazana preglednica rezultatov in vivo testiranja za glivo *P. cerophilus*. Na Sliki 58 so prikazane okužbe plodov na koncu poskusa.



Slika 58: Okužbe z glivo *P. cerophilus* na koncu *in vivo* poskusa

Figure 58: Infections with the fungus *P. cerophilus* at the end of the *in vivo* assay

4.6.5 Zaključki *in vivo* testiranja

Število okuženih plodov in delež okužene površine ploda sta se razlikovala med tretiranjem s posameznimi vrstami gliv. Rezultati so prikazani v Preglednici 23.

Preglednica 23: Pregled stopnje okuženosti plodov s tremi različnimi vrstami gliv

Table 23: Infection rates of fruits with three different fungal species

Gliva	Št. jabolk	Št. okuženih	Delež okuženih plodov (%)	Delež okužene površine (%) *	Delež okužene površine (%)**
Kontrola	83	/	/	/	/
<i>Microcyclospora tardicrescens</i>	104	57	58,76	11,07	18,84
<i>Microcyclospora malicola</i>	80	53	80,30	18,97	23,62
<i>Peltaster cerophilus</i>	130	58	51,79	9,31	17,98

*V povprečje so zajeta vsa jabolka, tako okužena kot neokužena

**V povprečje zajeta zgolj okužena jabolka

Iz dreves, okuženih z glivo *M. tardicrescens*, smo obrali 104 jabolka. Od teh je bilo 58,76 % okuženih. Z glivo *P. cerophilus* je bilo okuženih 51,79 %, medtem ko je bilo z glivo *M. malicola* okuženih največ, in sicer 80,30 % plodov.

Delež okužene površine ploda, kjer smo v povprečje zajeli vsa jabolka, je znašala pri glivi *M. tardicrescens* 11,07 %, medtem ko je delež okužene površine ploda med okuženimi jabolkami znašal 18,84 %. Pri glivi *P. cerophilus* so bile vrednosti za malenkost nižje, in sicer 9,31 % okužene površine ploda oziroma 17,98 % med samo okuženimi plodovi. Največji delež okužene površine ploda je dosegla gliva *M. malicola*, in sicer 18,97 % okužene površine ploda oziroma 23,62 % okužene površine med samo okuženimi plodovi (Preglednica 23).

4.7 SEMI IN VIVO TEST

V laboratoriju smo opazovali vpliv glive vrste *M. tardicrescens* na rast glive *C. fioriniae* na treh sortah jabolk (Gala, Gloster, Zlati delišes). Pogoji testiranja so opisani v poglavju 3.5.

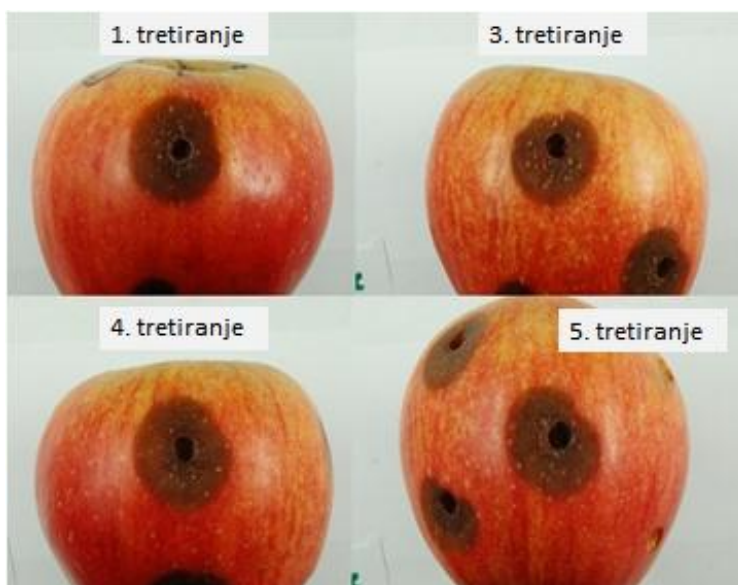


Slika 59: Okolje za *semi in vivo* testiranje

Figure 59: Environment for *semi in vivo* assay

4.7.1 Rezultati testiranja pri sorti Gala

Rezultati testiranja so prikazani v Prilogi H1. Primer tretiranja na drugem jabolku v četrti posodi pri sorti Gala je prikazan na Sliki 60.

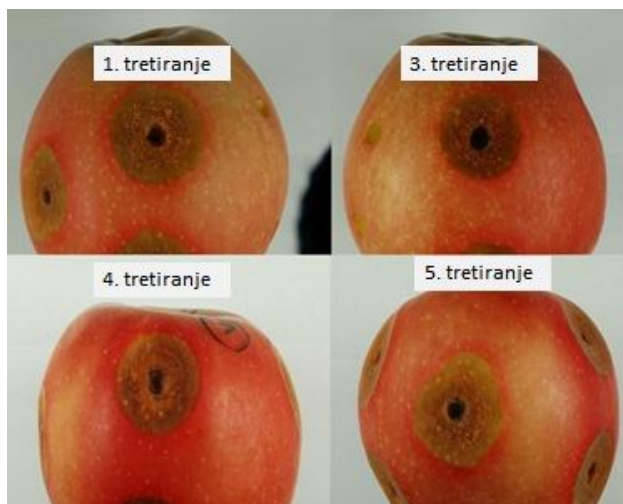


Slika 60: Antagonistični učinek glive *M. tardicrescens* na rast nekroze glive *C. fioriniae* pri sorti Gala

Figure 60: Antagonistic effect of fungus *M. tardicrescens* on necrosis growth of the fungus *C. fioriniae* on the variety Gala

4.7.2 Rezultati testiranja pri sorti Gloster

Rezultati testiranja so prikazani v Prilogi H2. Primer tretiranja na prvem jabolku v osmi posodi pri sorti Gloster je prikazan na Sliki 61.

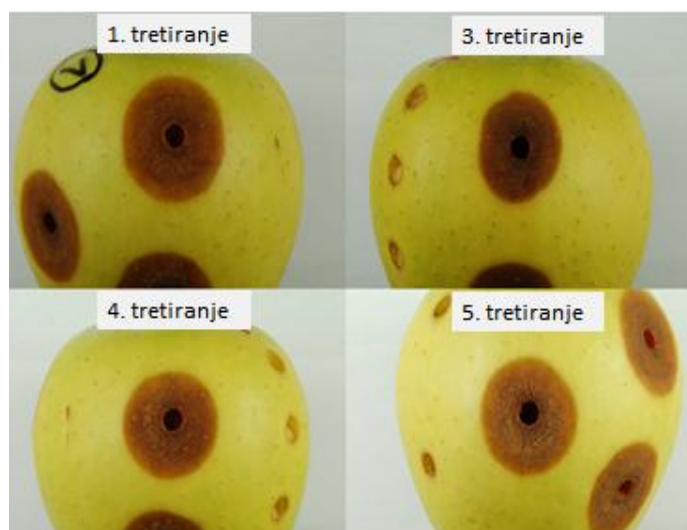


Slika 61: Antagonistični učinek glive *M. tardicrescens* na rast nekroze glive *C. fioriniae* pri sorti Gloster

Figure 61: Antagonistic effect of fungus *M. tardicrescens* on necrosis growth of the fungus *C. fioriniae* on the variety Gloster

4.7.3 Rezultati testiranja pri sorti Zlati delišes

Rezultati testiranja so prikazani v Prilogi H3. Primer tretiranja na prvem jabolku v prvi posodi pri sorti Zlati delišes je prikazan na Sliki 62.



Slika 62: Antagonistični učinek glive *M. tardicrescens* na rast nekroze glive *C. fioriniae* pri sorti Zlati delišes

Figure 62: Antagonistic effect of fungus *M. tardicrescens* on necrosis growth of the fungus *C. fioriniae* on the variety Golden delicious

4.7.4 Zaključki *semi in vivo* testiranja

Preglednica 24 prikazuje opisno statistiko za vsa opazovana jabolka, in sicer povprečno inhibicijo patogene glive, standardni odklon, minimalno, maksimalno vrednost in statistično značilnost inhibicije pri tretiranju 3 ali 4. Določili smo, da je minimalna vrednost znašala 0. Iz Preglednice 24 je razvidno, da razlike v inhibiciji med sortami in tretiranju obstajajo.

Preglednica 24: Opisna statistika za vpliv glive vrste *M. tardicrescens* na rast nekroze glive *C. fioriniae* na treh sortah jabolk

Table 24: Descriptive statistics for effect of fungul species *M. tardicrescens* on necrosis growth of fungus *C. fioriniae* on three apple varieties

Sorta	Št. opazovanj	Spremenljivka	Št. meritev	Povprečje inhibicije (%)	Standardni odklon (%)	Min (%)	Maks. (%)	Stat. znač.
Gala	46	I 4	45	19,17	10,68	0	50,00	<0,0001
		I 3	40	26,53	15,53	0	63,45	0,0005
Gloster	38	I 4	36	12,11	8,46	0	28,68	0,3028
		I 3	37	16,87	15,02	0	60,06	0,5485
Zlati delišes	43	I 4	42	9,84	9,37	0	40,08	<0,0001
		I 3	36	14,90	10,82	0	38,68	<0,0001

Inhibicija rasti nekroze glive *C. fioriniae* z glivo *M. tardicrescens* je bila izračunana pri vseh treh testiranih sortah, tako pri sočasnem nanosu glive *M. tardicrescens* in glive *C. fioriniae* (I4), kot tudi pri 3 urnem zamiku nanosa glive *C. fioriniae* (I3) (Preglednica 24).

Inhibicija rasti nekroze patogene glive *C. fioriniae*, nanesene sočasno z antagonistom *M. tardicrescens* (tretiranje 4), je znašala 19,17 % pri sorti Gala. Pri tretiranju 3 smo pričakovali, da bo antagonist izkoristil časovno prednost tako, da bo zaviral rast glive *C. fioriniae*. Inhibicija rasti nekroze patogene glive pri tretiranju 3 je bila večja, in sicer 26,53 %.

Pri sorti Gloster je prav tako tretiranje 3 pokazalo boljši inhibitorni učinek na glivo *C. fioriniae*. Pri jabolkih okuženih z antagonistom 3 ure pred nanosom patogene glive je bil inhibitorni učinek antagonista na rast nekroze patogene glive 16,87 %, medtem ko je bil inhibitorni učinek pri sočasnem tretiranju antagonista in patogena 12,11 %.

Tudi pri sorti Zlati delišes smo izračunali inhibitorni učinek glive *M. tardicrescens* na rast patogene glive *C. fioriniae*. Inhibicija rasti nekroze patogene glive pri tretiranju 4 je znašala 9,84 %, pri tretiranju 3 pa 14,90 %.

V Preglednici 25 vidimo vpliv sorte jabolk na velikost nekroze in da obstaja razlika med inhibicijama pri tretiranju 3 in tretiranju 4 znotraj posamezne sorte jabolk. Razlika med inhibicijama je prikazana v Preglednici 25.

Preglednica 25: Razlika med inhibicijama pri nanosu glive *C. fiorinae* 3 ure za glivo *M. tardicrescens* (I3) in pri sočasnem nanosu gliv *M. tardicrescens* in *C. fiorinae* (I4)

Table 25: Difference between inhibition I3 (added *C. fiorinae* 3 hours after fungus *M. tardicrescens*) and I4 (added *C. fiorinae* and *M. tardicrescens* at the same time)

Sorta	Št. opazovanj	Razlika	Št. meritev	Povprežje inhibicije (%)	Standardni odklon (%)	Min. (%)	Maks. (%)
Gala	46	I3 – I4	45 40	7,65	18,65	-30,98	52,67
Gloster	38	I3 – I4	36 37	5,12	16,51	-24,92	43,43
Zlati delišes	43	I3 – I4	42 36	4,97	14,40	-35,04	36,81

Razlike med inhibicijama so konstantne. V povprečju je pri vseh sortah jabolk I3 večja od I4. Pri sorti Gala znaša povprečna razlika med inhibicijama I4 in I3 7,65 %, pri sorti Gloster 5,12 % ter pri sorti Zlati delišes 4,97 %. Pojavljale so se tudi negativne vrednosti. V individualnih primerih so bili rezultati nasprotni povprečju, kar pomeni, da je bila v nekaterih primerih I4 večja od I3. Z izračunom razlike med inhibicijama različnih tretiranj smo videli, da je v povprečju večje inhibitorne učinke pokazalo tretiranje 3, kjer smo antagonistično glivo *M. tardicrescens* inokulirali 3 ure pred glivo *C. fiorinae* in ne istočasno z njo (tretiranje 3).

V nadaljevanju so prikazani rezultati obdelave podatkov v statističnem paketu SAS, kjer smo testirali vpliv sorte jabolk na inhibicijo in statistično potrdili razlike v inhibiciji rasti nekroze patogene glive med sortami in razlike med inhibicijama I3 in I4. To smo potrdili z enostavnim SAS modelom, kjer smo ocenili parametre pri I4 in parametre pri I3.

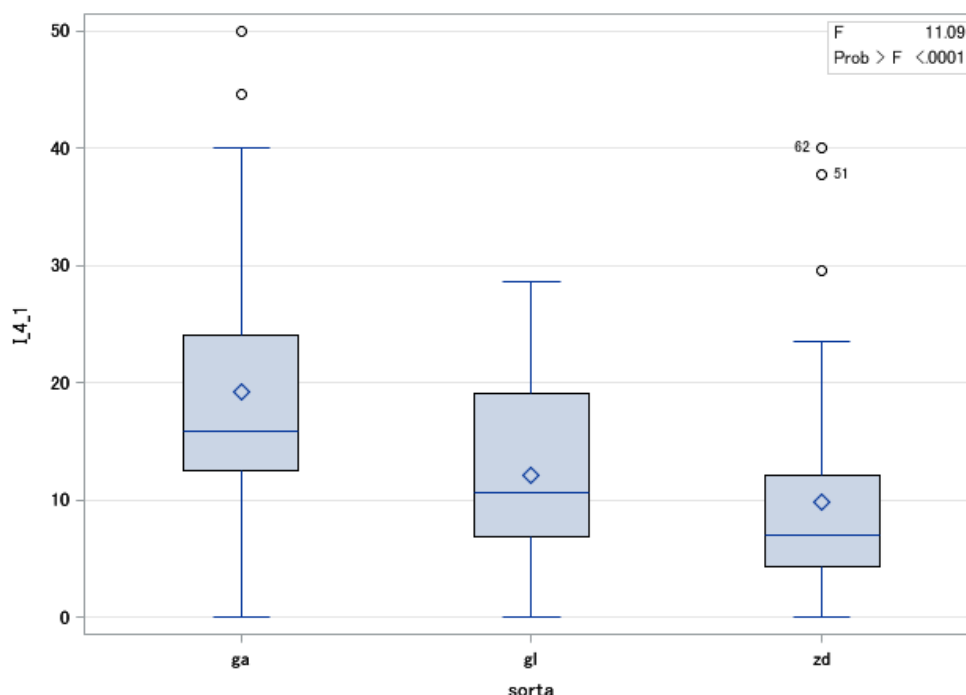
Model za inhibicijo pri I4 prikazuje koeficient determinacije 0,156, kar pomeni, da nam model, ki vključuje zgolj sorto jabolk, pojasni 1,6 % variabilnosti. P vrednost za vpliv sorte znaša <0,0001, kar pomeni da je vpliv statistično značilen. Sorta vpliva na inhibicijo rasti patogene glive.

Povprečna vrednost za inhibicijo pri sorti Zlati delišes znaša 9,84 %. Sorta Gala je imela inhibicijo največjo, in sicer je bila ocenjena na 19,17 % (9,84+9,33). Inhibicija pri sorti Gloster je bila v primerjavi z Galo za 2,26 % večja.

Preglednica 26: Ocena parametrov pri inhibiciji I4 (sočasni nanos gliv *M. tardicrescens* in *C. fiorinae*)
Table 26: Estimate of parameters for inhibition I4 (inoculation of fungi *M. tardicrescens* and *C. fiorinae* at the same time)

Parametri	Ocena	Napaka
Srednja vrednost	9,84	±1,49
Gala	9,33	2,06
Gloster	2,26	2,19
Zlati delišes	0,00	-

Distribucija za inhibicijo pri tretiranju 4 je prikazana na Sliki 63.



Slika 63: Distribucija za inhibicijo pri tretiranju I4 (SAS ..., 1999)

Figure 63: Distribution for inhibition by treatment I4 (SAS ..., 1999)

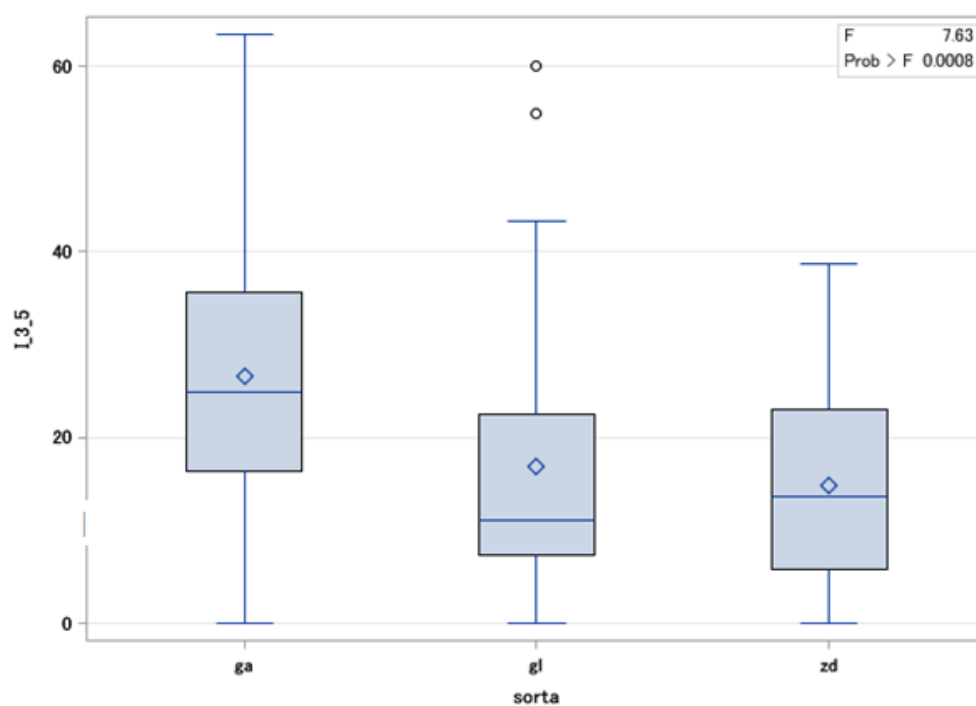
Model za inhibicijo pri tretiranju 3 prikazuje koeficient determinacije 0,122, kar pomeni, da nam model pojasni 1,2 % variabilnosti. P vrednost za vpliv sorte znaša 0,0008, kar pomeni da je vpliv statistično značilen. Sorta vpliva na inhibicijo rasti patogene glive. Povprečna vrednost za inhibicijo pri sorti Zlati delišes znaša 14,90 %. Pri sorti Gala je bila ocenjena inhibicija rasti nekroze patogene glive največja, 19,17 % (11,65+14,90) (Preglednica 27). Inhibicija pri sorti Gloster je bila 16,88 %.

Preglednica 27: Ocena parametrov pri inhibiciji I3 (nanos glive *C. fiorinae* 3 ure za *M. tardicrescens*)

Table 27: Estimate of parameters by inhibition I3 (fungus *C. fiorinae* added 3 hours after *M. tardicrescens*)

Parametri	Ocena	Napaka
Srednja vrednost	14,90	2,34
Gala	11,65	3,22
Gloster	1,98	3,28
Zlati delišes	0,00	

Distribucija za inhibicijo pri tretiranju 3 je prikazana na Sliki 64.



Slika 64: Distribucija za inhibicijo pri tretiranju I3 (SAS ..., 1999)

Figure 64: Distribution for inhibition by treatment I3 (SAS ..., 1999)

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V sodobnem ekstenzivnem sadjarstvu postaja uporaba fitofarmaceutskih sredstev ter njihovih razgradnih produktov vse bolj regulirana, saj utegne v prevelikih količinah škodljivo delovati na okolje in žive organizme. Podobna razmišljanja in regulativi veljajo tudi za mikotoksine, kajti nekaterih rastlinskih patogenov ne moremo kontrolirati niti s fitofarmaceutskimi sredstvi niti z drugimi tehnološkimi ukrepi. Jablanov škrlup (*V. inaequalis*) kontroliramo s pogostim nanašanjem fungicidov skozi celotno rastno sezono. Uporaba večine teh fungicidov bo regulirana z ukrepi Evropske unije (Council Regulation..., 2006). Z biološkimi metodami kontrole jablanovega škrlupa skušamo zmanjšati količino inokuluma/trosov v rastni sezoni. Čeprav so bili biokontrolni organizmi v preteklosti večinoma neučinkoviti, so rezultati novejših raziskav obetajoči (Köhl in sod., 2009). Izgube pridelka sadja po koncu obiranja so lahko zaradi glivičnih okužb velike. Zato predstavlja uporaba fungicidov še vedno glavno sredstvo za kontrolo glivičnih bolezni. Vendar pa so odpornost patogenov na fungicide, skrb za varnost potrošnikov ter deregistracija nekaterih učinkovitih fungicidov pripeljali do spoznanja, da je biotično varstvo alternativna metoda za zatiranje bolezni sadja (Wilson in sod., 1993). Doslej je bilo na področju biološkega nadzora in volje po razširitvi uporabe biofungicidov izdelanih vrsto študij vezanih na biotične agense, vendar učinkovitih rešitev v praksi še ni veliko.

5.1.1 Antagonistični potencial gliv v *in vitro* testu

Antagonistični potencial gliv SBFS *in vitro* smo določili z modificiranim testom dvojnih kultur (Hinton in Parry, 2008). V naši raziskavi smo testirali glive SBFS kot potencialne biotične agense. Strokovne literature na to temo nismo zasledili, zato naših rezultatov *in vitro* testiranja nismo primerjalno vrednotili in ocenili.

Iz celotne glivne zbirke (Priloga B) smo izbrali 83 izolatov različnih vrst in rodov gliv SBFS (Priloga C) ter testirali njihov antagonistični vpliv na rast micelija patogenih gliv *C. fioriniae*, *F. avenaceum*, *B. cinerea* in *V. inaequalis*. Noben od 83 testiranih izolatov gliv SBFS ni inhibiral rasti micelija patogenih gliv *F. avenaceum* in *B. cinerea*. Ugotovili smo, da samo gliva *M. tardicrescens* inhibira rast micelija glive *C. fioriniae*, in sicer 49 % po sedmih dneh inkubacije in 50 % po 14 dneh.

Rezultati testa dvojnih kultur med izolati gliv SBFS in patogeno glivo *V. inaequalis* so pokazali, da glive *S. pomi*, *P. cerophilus*, *M. malicola*, *M. mali* in *D. pseudoamericana* inhibirajo rast micelija patogene glive *V. inaequalis*. Izolata gliv *M. tardicrescens* in *M. pomicola* nista pokazala inhibitornega učinka na rast micelija patogene glive *V. inaequalis*. Inhibitorni učinek antagonistične glive *S. pomi* na rast micelija patogene glive *V. inaequalis* se je tekom inkubacije zniževal, medtem ko smo na koncu poskusa zabeležili inhibitorni učinek edinega izolata glive vrste *D. pseudoamericana* na rast micelija patogene glive *V. inaequalis*. Med celotno 30 dnevno inkubacijo je v povprečju inhibicija rasti micelija patogene glive naraščala pri izolatih gliv *P. cerophilus* in *M. malicola*. Pri *P. cerophilus* se je povprečni inhibitorni učinek na rast micelija patogene

glive *V. inaequalis* povečal iz 4,15 % po 14 dneh na 30,64 % na koncu poskus. Med vsemi testiranimi vrstami gliv je gliva *P. cerophilus* dosegla največji inhibični učinek na rast micelija patogene glive. Tudi pri *M. malicola* je povprečna vrednost inhibicije rasti patogena naraščala, in sicer iz 1,11 % po 14 dneh na 17,79 % po 35 dneh inkubacije.

V raziskavi smo testirali glive SBFS kot potencialne biotične agense. Strokovne literature na to temo nismo zasledili, zato naših rezultatov *in vitro* testiranja ne moremo primerjalno vrednotiti in oceniti.

Rezultati *in vitro* testa dvojnih kultur so potekali v smeri postavljene hipoteze o izločanju sekundarnih metabolitov v okolje in inhibiranju rasti drugih gliv. S testom smo ugotovili, da antagonistične glive tvorijo nehlapne sekundarne metabolite, kajti radialna micelijska rast patogena v agarni plošči je bila proti antagonistični glivi inhibirana, medtem ko je bila radialna rast patogena v nasprotni smeri od antagonista neinhibirana.

5.1.2 Filogenetski odnosi znotraj rodu glive *Peltaster*

Iz rezultatov analize DNA zaporedij regije ITS se vidi, da se nova opisana vrsta glive *P. cerophilus* razlikuje od vrste *P. fructicola*. Vrsti se ločita tudi geografsko, in sicer je gliva *P. cerophilus* vzorčena samo v Evropi in vrsta *P. fructicola* v Severni Ameriki in Evropi. Poleg zaporedij regije ITS glive *P. cerophilus* izolirane iz Slovenije smo v NCBI GenBank bazi našli par zaporedij iz Nemčije in Poljske, medtem ko smo glivo vrste *P. fructicola* redkokdaj izolirali iz Slovenije in Nemčije. Ločitev evropske vrste *P. cerophilus* od severno ameriške vrste *P. fructicola* je poleg analize DNA zaporedij regije ITS potrjena z analizo DNA zaporedij drugih genskih filogenetskih markerjev kot so del jedrne ribosomalne male podenote - 18S rDNA (SSU), velike podenote - 28S rDNA (LSU), del gena mitohondrijske ribosomalne male podenote in del gena za elongacijski faktor 1 - alfa (Medjedović in sod., 2014).

Klad, v katerega se uvršča vrsta *P. cerophilus* ima visoko podporo pri analizah zaporedij iz regije ITS (ML-BS = 100, p.v. = 1.0) (Slika 21) in prav tako pri analizah ostalih genov (ML-BS = 100, p.v. = 1.0) (Medjedović in sod., 2014). Klad vrste *P. fructicola* je bil prav tako enakovredno podprt (ML-BS = 100, p.v. = 1.0) pri analizi regije ITS (Slika 21), medtem ko je bila podpora s MP analizo pri ostalih testiranih genih zmerna (MP = 67) (Medjedović in sod., 2014).

Sestrski odnos izolatov glive *P. fructicola* z neopisano vrsto *Peltaster* sp. 65 rap je podprt z analizami zaporedij regije ITS (ML-BS = 73, p.v. = 0.96, MP-BS = 93) in tudi z analizami zaporedij ostalih testiranih genskih regij (ML-BS = 100, p.v. = 1,0, MP-BS = 99) (Medjedović in sod., 2014). Klad s številnimi vrstami *Peltaster* spp. tvori klad zunaj podprte monofiletske skupine z vrstami *P. cerophilus*, *Peltaster* sp. 65 rap in *P. fructicola* (MP = 70), medtem ko večgenske filogenetske analize nakazujejo, da se vrste rodu *Peltaster* uvrščajo v Dothideomycetes in so *P. cerophills*, *P. fructicola* ter tri druge, trenutno še neopisane vrste *Peltaster* monofiletske.

5.1.3 Antagonistični potencial gliv v *semi in vivo* test

Semi in vivo test smo izvedli z modificirano metodo po Boyd-Wilsonu in sod. (2006). Tudi rezultate tega poskusa nismo mogli primerjati, saj strokovne literature o glivah SBFS kot potencialnih biotičnih agensih za zaviranje različnih glivičnih bolezni ni.

Inhibitorni učinek suspenzije trosov glive *M. tardicrescens* na rast glive *C. fioriniae* je bil ugotovljen na vseh preizkušanih sortah in pri obeh tretiranjih, tako pri sočasnem nanosu antagonistične in patogene glive (Tretiranje 4), ali pri 3 urnem zamiku nanosa patogene glive (Tretiranje 3).

Inhibicija I4 rasti nekroze glive *C. fioriniae* pri sorti Gala je znašala 19,17 %, medtem ko je inhibicija I3 znašala 26,54 %, kar pomeni, da je tretiranje 3 pokazalo boljše inhibitorne učinke v primerjavi s tretiranjem 4. Pri sorti Gloster je prav tako tretiranje 3 pokazalo boljši inhibitorni učinek na glivo *C. fioriniae*. Pri jabolkih okuženih pri tretiranju 3 je bila inhibicija I3 rasti nekroze patogene glive 16,87 %, medtem ko je bila inhibicija I4 12,11 %. Tudi pri sorti Zlati delišes smo izračunali boljši inhibitorni potencial glive *M. tardicrescens* na rast nekroze patogene glive *C. fioriniae* pri tretiranju 3. Inhibicija I4 rasti nekroze je bila 9,84 %, inhibicija rasti nekroze I3 pa 14,90 %. Med vsemi testiranimi sortami se je najbolj izkazala sorta Gala in dosegla najvišje vrednosti I3 in I4. Sledita ji sorta Gloster in Zlati delišes. S statističnim paketom SAS smo testirali vpliv sorte jabolk na inhibicijo in statistično potrdili razlike v inhibiciji rasti nekroze patogene glive *C. fioriniae* med sortami in razlike med inhibicijama I3 in I4. Inhibicije rasti nekroze je torej sortno specifična. Z izračunom razlike med inhibicijama I3 in I4 smo ugotovili, da so v povprečju večji inhibitorni učinki doseženi pri tretiranju 3, kjer smo antagonistično glivo inokulirali 3 ure pred patogeno glivo.

Vpliv sorte jabolk na inhibicijo pri tretiranju 3 in tretiranju 4 smo statistično potrdili z enostavnim SAS modelom, kjer smo ocenili parametre pri I4 in parametre pri I3. Modela za inhibicijo pri I4 in I3 prikazujeta, da je P vrednost za vpliv sorte <0,0001 in 0,0008, kar pomeni da je vpliv sorte statistično značilen pri obeh modelih. Sorta je torej vplivala na inhibicijo rasti patogene glive.

Kemijska sestava jabolk je različna, zato je razlike v deležu inhibicije med sortami morebiti treba iskati v sestavi nutrientov pri posamezni sorti. Mineralna, vitaminska sestava, sestava aminokislin in drugih nutrientov v posamezni sorti bi lahko različno delovala na produkcijo sekundarnih metabolitov (Wu in sod., 2007)

.

Pri našem raziskovalnem delu smo ugotovili zaviralne učinke suspenzije trosov glive *M. tardicrescens* na patogeno glivo *C. fioriniae*. Zaradi prisotnosti trosov antagonista je viden določen učinek na patogeno glivo.

Za nadaljnje izvajanje raziskovalnega dela bi bilo treba testirati različna začetna razmerja (koncentracije) trosov med patogeno in antagonistično glivo, saj bi nam ti

rezultati dali pomembne podatke o količini, ki bi bolje zavrla delovanje patogene. S tem bi še dodatno potrdili učinkovitost našega antagonista. Teh raziskav tokrat ni bilo moč izvesti, zaradi velikega števila vzorcev.

V primeru, da bi razpolagali z večjo količino izoliranih spojin trihotekolon acetata in 7-hidroksitrihotekolon acetata bi lahko naredili še test obeh učinkovin na patogeno glivo na agarnih ploščah ali pa tudi na jabolkah. Prav tako bi lahko na jabolkih testirali učinkovitost spojine na patogeno glivo v različnih koncentracijah. Pri nadaljnjih testiranjih bi lahko škropili jabolka s suspenzijo trosov antagonista, nato ranili del povrhnjice in jo inokulirali s patogeno glivo. Morebiti bi lahko uporabili ta agens kot škropivo (pripravek) za biotično varstvo patogenov, povzročiteljev gnitje sadja. Rezultati so zgolj osnova za nadaljnje raziskave.

5.1.4 *In vivo* test

V sadovnjaku Kmetijskega inštituta Slovenije smo izbrali 6 jablan sorte Gloster in izvajali *in vivo* test le z najobetavnejšimi izolati gliv SBFS na osnovi rezultatov *in vitro* poskusov. Škropljenje jablan s suspenzijo trosov gliv smo izvajali 1 x tedensko od aprila do septembra 2012. Na koncu *in vivo* poskusa smo ocenjevali delež okuženih plodov in delež okužene površine ploda s tremi potencialnimi biotičnimi agensi. Med vsemi tremi glivami je največji delež okuženih plodov dosegla gliva *M. malicola* (80,30 %), nato gliva *M. tardicrescens* (58,76 %) in *P. cerophilus* (51,79 %). Tudi delež okužene površine plodov je bil največji pri *M. malicola* (23,62 %), nato pri *M. tardicrescens* (18,84 %) in nazadnje pri *P. cerophilus* (17,98 %). Gliva *M. malicola* in gliva *M. tardicrescens* tvorita sajast micelijski tip na gostitelju, medtem ko gliva *P. cerophilus* tvori pikast micelijski tip. Razliko v deležu okuženosti površine plodov med omenjenimi glivami lahko pripišemo dejstvu, da obstajajo korelacije med okoljskimi pogoji in pojavnostjo različnih micelijskih tipov (Sutton in Sutton, 1994). Omenjena raziskovalca sta prva odkrila, da pojavnost in stopnja okuženosti plodov variira glede na okoljske pogoje. Stopnja okuženosti pikastega tipa se je, namreč, zmanjšala z zvišanjem temperature, medtem ko sta se z večanjem števila ur izpostavljenosti visoki stopnji relativne zračne vlažnosti pojavnost in stopnja okuženosti povečali. Tudi v našem primeru je temperatura v času poskusa naraščala in na koncu poskusa smo pri pikastem micelijskem tipu opazili manjši delež okuženih plodov v primerjavi z drugima glivama s sajastim micelijskim tipom. Pri sajastem micelijskem tipu pa Sutton in Sutton (1994) nista našla statistično značilne korelacije med okoljskimi pogoji in pojavnostjo ter stopnjo okuženosti.

V poskusu smo se želeli približati optimalnim pogojem za razvoj gliv sajavosti, zato smo s higrotermometrom vsako uro merili temperaturo in vlago pod drevesi od konca aprila do konca septembra. Povprečna mesečna temperatura od meseca maja naprej je naraščala, in sicer od povprečnih 18 °C do maksimalne povprečne temperature 24,5 °C v avgustu. Tudi relativna zračna vlaga je v poskusu blago naraščala od 60 % v aprilu do 70 % v mesecu juniju in juliju, razen avgusta, ko smo zabeležili njen padec na 65 %. Z oroševanjem smo uspeli dvigniti relativno zračno vlago, vendar ne dovolj za razvoj gliv sajavosti, ki so v naravi vidne šele proti koncu poletja (september). Vendar pa smo pri glivi *M. tardicrescens* opazili blagi pojav bolezenskih znamenj že junija. Razlog za ta

pojav najdemo v raziskavah Sharpa in Yoderja (1985), kjer sta dokazala, da obstaja pozitivna korelacija med akumuliranimi urami relativne zračne vlage >95 % in deležem okuženih plodov in da je torej potrebnih od 50 do 100 ur visoke relativne zračne vlage, preden se pojavijo simptomi gliv sajavosti. V našem primeru smo imeli 86 % relativno zračno vlago 72 ur, kar je zadostovalo za pojav simptomov pri glivi *M. tardicrescens*. Tudi temperatura je v teh treh dneh padla iz 24 °C na 20 °C. Pri vseh treh glivah ni bilo videti nobenih bolezenskih znamenj do začetka septembra, kajti za to ni bilo ustreznih okoljskih pogojev (visoka relativna zračna vlaga). Julija in avgusta se je, namreč, temperatura zvišala do 24,5 °C, medtem ko je relativna zračna vlaga padla na 65 %. Neprimerne klimatske razmere so onemogočale izvedbo testa. Zadnje okuževanje smo opravili konec avgusta. V začetku septembra je temperatura padla na 20 °C, relativna zračna vlaga pa je bila v tem obdobju > 80 %. Povprečna relativna zračna vlaga pa je bila v naslednjih tednih meseca septembra 74 %. S slednjimi pogoji smo dosegli razvoj gliv na plodovih.

V severno ameriški raziskavi sta Sutton in Sutton (1994) testirala in spremljala pojavnost in stopnjo naravnih okužb različnih micelijskih tipov na več lokacijah. Primerjava z ameriško raziskavo ni možna, saj so njuni poskusi potekali v povsem naravnih pogojih, v našem primeru pa je testiranje potekalo v prirejenih, delno *in vivo* pogojih z umetnim oroševanjem. Na ta način smo želeli povišati relativno zračno vlago in se približati pogojem za razvoj gliv sajavosti in glive *V. inaequalis* v naravnem okolju, vendar temperatura ni padla kot v deževnih dneh v naravi. Razen tega smo spremljali pojavnost in stopnjo okuženosti le na strogo omejenen vzorcu intenzivnega nasada (6 dreves) na Kmetijskem inštitutu Slovenije in bi za bolj verodostojne rezultate potrebovali večje število vzorcev v sadovnjakih na različnih geografskih lokacijah po Sloveniji.

V *in vivo* poskusu smo želeli raziskati, ali kolonije gliv povzročiteljic sajavosti na plodovih jabolk preprečijo okužbo s patogeno glivo *V. inaequalis* v primarni ali sekundarni fazi razvoja. Neprimerne vremenske razmere so onemogočale izvedbo testa.

Ekologija razvoja glive SBFS je vezana na obdobje proti koncu poletja, kjer se temperature nižajo in je bistveno več deževnih dni in rose v jutranjih urah. To pomeni, da je za razvoj glive potreben visok delež relativne zračne vlage. Življenjski krog gliv SBFS je zelo slabo raziskan, za razliko od zelo dobro raziskane patogene glive *V. inaequalis*. Gliva *V. inaequalis* prične s primarnimi okužbami zgodaj spomladi in nadaljuje s sekundarnimi okužbami s trosi tekom celega poletja. Tudi pri glivi povzročiteljici sajavosti primarne okužbe nastopijo že v maju, juniju, vendar simptomov ni videti ali so redki. Razmah glive nastopi ob optimalnih klimatskih pogojih šele v času polne zrelosti sadežev. V našem poskusu smo želeli z glivami sajavosti preprečiti bodisi primarne ali sekundarne okužbe glive *V. inaequalis*, zato smo predčasno poskušali ustvariti pogoje za razvoj kolonij na plodu in posledično zmanjšati število sekundarnih okužb patogene glive. Poleg tega, da nismo zagotovili ustreznih okoljskih pogojev za predčasen razvoj gliv SBFS, pa tudi nismo uspeli umetno okužiti dreves s primarnim inokulumom glive *V. inaequalis*. Pod drevesa smo položili prezimelo listje, vendar do primarnih okužb z omenjeno glivo ni prišlo. To lahko pripišemo premajhni količini

začetnega inokuluma. Verjetno bi morali prenesti še večjo količino prezimelih listov iz drugih sadovnjakov in ustvariti debelejšo plast listov pod drevesi.

Uspešno izvedbo poskusa je ovirala tudi lokacija testiranja, saj smo poskus izvajali v intenzivnem, redno škropljenem nasadu na Kmetijskem inštitutu Slovenije, zato niso bili ustvarjeni pogoji za razvoj te glive. Poleg tega agrotehnični ukrepi, kot so zračna krošnja, malo zelene listne mase, nizka drevesa, plitka tla (manjše zadrževanje vode) v veliki meri zmanjšujejo oziroma preprečujejo okužbe s patogenimi organizmi.

5.1.5 Vpliv ekstraktov gliv SBFS na kalitev trosov glive *Colletotrichum fioriniae*

Izolate, ki so se najbolj izkazali v *in vitro* testu dvojnih kultur proti rasti gliv *V. inaequalis* in *C. fioriniae*, smo uporabili za testiranje vpliva ekstraktov teh gliv na kalitev trosov glive *C. fioriniae*. Ekstrakcijsko metodo smo povzeli po Andersen in sod. (2005) in v poskusu testirali bioaktivni potencial glivnih ekstraktov kot tudi vpliv organskega topila etil acetata na kalitev trosov in rast hif patogene glive *C. fioriniae*.

Ugotovili smo, da različni volumni dodanega etil acetata (10 µl, 20 µl, 30 µl, 40 µl) niso inhibirali rasti hif po 4, 12, 13 in 21 urah po inokulaciji. Med poskusom je dolžina hif v odvisnosti od časa linearno naraščala pri vseh testnih vzorcih. Dolžine hif so bile največje pri 40 µl dodanega volumna etil acetata. Rast hif je naraščala med posameznimi merjenji, ki so si časovno sledila v razmiku nekaj ur. Najdaljše hife so bile izmerjene po 21 urah. Zanimivo je, da so bile najdaljše hife izmerjene pri 40 µl etil acetata, nekoliko krajše pri 20 µl, medtem ko so bile dolžine hif skupine z dodatkom 10 in 30 µl etil acetata in kontrolne skupine z destilirano vodo po 21 urah na približno enakem nivoju. Pričakovali smo, da bodo hife najhitreje rasle v destilirani vodi, toda nasprotno, rezultati so pokazali hitrejšo rast hif pri dodanih 20 µl in 40 µl etil acetata.

S statistično analizo smo potrdili, da različni volumni dodanega organskega topila ne vplivajo na kalitev trosov in na rast hif glive *C. fioriniae*. Statistično značilen vpliv ($<0,05$) volumna se je pokazal pri opravljenih meritvah po 6 in 8 urah. V tem primeru bi lahko statistično značilno razliko pripisali nenatančnemu merjenju oziroma intervalu, ki ni bil v vseh primerih enak. Tako smo na primer dolžino hif pri vzorcih, katerim smo dodali 40 µl etil acetata, merili ne po 6 ampak po 7 urah inkubacije. Lahko pa trdimo, da dodan volumen etil acetata ni inhibiral rasti gliv v primerjavi s kontrolno ploščo brez dodanega etil acetata.

Vpliv posameznih ekstraktov je v testu pokazal zaviralne učinke na kalitev trosov in rast hif glive. Meritve na vzorcih z dodanimi ekstrakti so potekale v različnih intervalih, in sicer po 7, 9, 12, 13, 15 in 21 urah. Rezultati so pokazali, da sta ekstrakta glive *M. malicola* in glive *M. tardicrescens* preprečila kalitev trosov glive *C. fioriniae* v času 21 urne inkubacije. Slabše rezultate smo dobili pri drugih glivnih ekstraktih, kjer je prišlo do klitja trosov, vendar je bila rast hif kljub temu počasnejša od rasti pri kontrolni skupini z dodano destilirano vodo.

S statistično analizo smo potrdili dobljene rezultate. Ekstrakti gliv *M. malicola* (ekstrakt 1), *M. tardicrescens* (ekstrakt 2), *M. mali* (ekstrakt 3), *S. pomi* (ekstrakt 4) in *P. cerophilus* (ekstrakt 5) vplivajo na dolžino hif patogene glive. Ekstrakta gliv *M. malicola* in *M. tardicrescens* sta se izkazala za najbolj aktivna, saj sta 100 % inhibirala vzklitje trosov glive *C. fioriniae* tekom 21 urne inkubacije. Pri ostalih glivnih ekstraktih se je najbolje izkazal ekstrakt glive *S. pomi*, kjer smo izmerili dolžino hif slabih 20 μm . Sledil ji je ekstrakt glive *M. mali*, z dolžino hif okoli 60 μm . Najmanjši vpliv na kalitev trosov patogene glive pa je imel ekstrakt glive *P. cerophilus*. Pri slednjem ekstraktu so bile hife po 21 urah za 20 μm krajše v primerjavi s kontrolno skupino (160 μm). Statistično značilne razlike ($<0,005$) se pojavljajo v vseh intervalih, izjema je le interval 7 ur po inokulaciji. Omenjeno statistično neznačilno razliko ($\geq 0,005$) lahko pojasnimo s človeškim faktorjem, ki kljub natančnemu merjenju vodi do odstopanj pri meritvah. Poleg tega lahko statistično neznačilno razliko pripišemo dokumentiranju rezultatov v izbranih urnih intervalih, kjer se časovnemu zamiku nismo mogli izogniti.

5.1.6 Sekundarni metaboliti

Izolat glive *M. tardicrescens* je pokazal največjo antagonistično aktivnost v testu dvojnih kultur, zato smo ga uporabili za nadaljnje raziskave. Gliva *M. tardicrescens*, izolat št. A53, je inhibirala rast micelija glive *C. fioriniae*. Inhibicija rasti micelija glive *C. fioriniae* je bila na sedmi dan 46,08 % in je po 14 dneh inkubacije dosegla 55,26 %. Ekstrakt glive *M. tardicrescens* smo pridobili iz 30 agarnih plošč z glivno biomaso. Bioaktivnost ekstrakta smo najprej testirali z agarnim difuzijskim testom, sledilo je frakcioniranje in testiranje posameznih frakcij z biološko vodeno strategijo z glivo *C. fioriniae* kot indikatorskim organizmom. Frakcioniranje ekstrakta z reverzno fazno HPLC je rezultiralo v izolacijo aktivne frakcije z dvema bioaktivnima metabolitoma. Molekulska masa in posredno empirično formulo spojin dveh metabolitov v dvojnem bioaktivnem vrhu smo določili s HPLC-ESI-TOF-MS analizo robnih frakcij 50 in 46. Spojino 1 smo identificirali z empirično formulo $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_5$. Kot molekulski vrh $(\text{M}+1)^+$ je bil izoliran ion 307,13. NMR podatki so dali karakteristično strukturo 12,13-epoksitrihotek-9-en-8-onov in metabolit 1 je bil identificiran kot znani trihotekolon acetat. Pri spojini 2 je bil kot molekulski vrh $(\text{M}+1)^+$ izoliran ion 323,14, kateremu ustreza empirična formula spojine 2 $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_6$. Bolj polarno in novo spojino 2 smo identificirali kot 7-hidroksitrihotekolon acetat.

Trihoteceni so družina več kot 200 različnih spojin iz skupine seskviterpenoidov. (McCormick in sod., 2011). Trihoteceni so kmetijsko pomembnih mikotoksini in predstavljajo potencialno nevarnost za zdravje živali in ljudi po vsem svetu (Li in sod., 2011). Glive rodov *Fusarium*, *Myrothecium*, *Stachybotrys*, *Trichoderma* tvorijo te velike družine mikotoksinov. Vse našete rodove gliv uvrščamo v red Hypocreales, medtem ko glive SBFS uvrščamo v red Capnodiales. Do sedaj je za edino proizvajalko trihotecenov znotraj redu Capnodiales veljala gliva *Peltaster fructicola* (Venkatasubbaiah in sod., 1995). Med drugimi spojinami je ta vrsta glive proizvedla toksin trihotekolon acetat (spojina 1), trihotecen tipa B, ki je pokazal antimikrobno aktivnost v *in vitro* difuzijskem poskusu proti glivi *Botryosphaeria*, povzročiteljici grenke gnilobe (Venkatasubbaiah in sod., 1995). V naši raziskavi smo poročali o ponovnem odkritju spojine 1 (trihotekolon acetat) iz glive vrste *M. tardicrescens*, kar

kaže na to, da se trihoteceni lahko pojavijo tudi pri drugih rodovih gliv povzročiteljic sajavosti iz redu Capnodiales. Pojav istih sekundarnih metabolitov pri glivah iz različnih filogenetskih skupin ni nenavaden, saj je horizontalen prenos genskega materiala v drugo glivo ali bakterijo pogost. Gene za določene beta - laktamske antibiotike, npr. penicilin, najdemo tako v streptomicetah kot v bakterijah in glivah. Cela vrsta drugih sekundarnih metabolitov se lahko tako prenaša v habitatih, kjer je veliko mikrobov. Na ta način so nastali tako raznoliki sekundarni metaboliti.

Bioaktivnost spojin 1 in 2, trihotecena tipa B, smo ocenili z MIK proti široki testni paleti bakterij in gliv (Preglednica 22). Obe izolirani spojini (spojina 1, spojina 2) v dilucijskem testu nista pokazali antimikrobne aktivnosti proti bakterijam *B. subtilis*, *E. coli* in *S. aureus*, medtem ko sta spojini zmerno bioaktivnost pokazali proti glivi *C. fioriniae* in *S. cerevisiae* ter šibko aktivnost proti kvasovkama *P. anomala* in *C. tenuis*. Raziskave potekajo v smeri citotoksičnih učinkov obeh spojin in njunih tarčnih mest ter mehanizmov delovanja v celici.

Z raziskavo smo se približali naši hipotezi o antagonističnih sposobnostih gliv SBFS z mehanizmom antibiotičnih učinkov na delovanje drugih fitopatogenih gliv. Prvič smo identificirali dva derivata trihotecenov iz glive vrste *M. tardicrescens*. Biološka vloga opazovanih trihotecenov pri SBFS glivah v naravi še vedno ostaja nepoznana. Možno je, da gliva *M. tardicrescens* s tvorbo trihotecenov zavira kompetitorje gliv SBFS in tako zavzame isto ekološko nišo ali/in ima vlogo virulenčnega faktorja rastlinskega patogena ali oboje. Literatura o glivah SBFS, s katerimi se pri svojem delu ukvarjamo, je pogosto vezana na identifikacijo vrst povzročiteljic tega sindroma, ne pa na kontekst uporabe v smeri biotičnega varstva proti rastlinskim patogenim mikroorganizmom.

Do sedaj še ni raziskano, kakšno funkcijo opravljajo glive SBFS na površju plodov in rastlinskega tkiva. Ena od možnih in sprejemljivih hipotez bi lahko bila, da so glive SBFS sposobne inducirati odpornost same gostiteljske rastline, vendar šele tedaj, ko so te v stiku s površinsko kutikulo rastlinskega plodu. To pa ne nazadnje pomeni zaščito gostitelja pred drugimi uničujočimi patogenimi mikroorganizmi. Z naselitvijo in razraščanjem kolonij na povrhnjici plodu se zmanjša možnost rasti drugih patogenih mikroorganizmov, ki so tudi del površinske mikroflore plodu in ki bi utegnili radikalneje škodovati plodu z direktnim prodorom v globino rastlinskega tkiva.

Za dokaz morebitne vloge spojine 1 in 2 v naravi smo uporabili iz *in vivo* poskusa umetno okužene plodove jabolk z glivo *M. tardicrescens*. Glivo smo postrgali skupaj z jabolčnim voskom in jo analizirali na prisotnost obeh izoliranih spojin. Zaradi velike vsebnosti voska v ekstraktih nismo mogli odkriti ne spojine 1 ne spojine 2. Voski so preprečili enostavno odkrivanje spojin z analitsko HPLC. Dodatna optimizacija ekstrakcije in dodatno čiščenje vzorca bi pripomoglo k pridobivanju zadovoljivih rezultatov. Zato ne moremo oceniti morebitne nevarnosti trihotecenov tipa B, ki jih tvorijo glive SBFS. Vendar pa dejstvo, da so kolonije različnih SBFS gliv pogosto med seboj ločene na kutikuli sadja, kaže na to, da so lahko bioaktivni metaboliti izločeni na ali v sadni eksokarp.

Naši rezultati kažejo, da glive sajavosti lahko tvorijo sekundarne metabolite s širokim spektrom protiglivične aktivnosti. Potencialno so te snovi lahko primerne v farmaciji kot zdravilo ali v kmetijstvu kot fitofarmacevtsko sredstvo. Vsekakor pa bodo rezultati prispevali k razumevanju mehanizma delovanja SBFS gliv in njihovimi rastlinskimi gostitelji.

5.2 SKLEPI

Med vsemi izbranimi izolati različnih vrst gliv SBFS (*M. malicola*, *M. pomicola*, *M. mali*, *D. pseudoamericana*, *P. cerophilus*, *S. pomi*) je samo gliva *M. tardicrescens* pokazala antagonistični potencial proti patogeni glivi *C. fioriniae*. Inhibicija rasti micelija glive *C. fioriniae* je bila na sedmi dan 46,08 % in je po 14 dneh inkubacije dosegla 55,26 %.

Glive *S. pomi*, *P. cerophilus*, *M. malicola*, *M. mali* in *D. pseudoamericana* so v testu dvojnih kultur inhibirale rast glive *V. inaequalis*. Rast patogene glive *V. inaequalis* je najbolj zavirala gliva *P. cerophilus*, medtem ko so antagonistični učinki ostalih gliv bistveno slabši.

Antagonističnega učinka izolatov gliv SBFS na rast micelija patogenih gliv *Fusarium avenaceum* in *B. cinerea* nismo zaznali.

Filogenetske odnose gliv iz rodu *Peltaster* smo preučevali na podlagi nukleotidnega zaporedja regije ITS. Rezultati analize kažejo, da se nova opisana gliva *P. cerophilus* razlikuje od glive *P. fructicola*.

Suspenzija trosov glive *M. tardicrescens* je zaviralno delovala na rast glive *C. fioriniae* na vseh testiranih sortah (Gala, Gloster, Zlati delišes), tako pri istočasnem nanosu antagonista/patogena, kot tudi pri časovnem zamiku nanosa patogena. Med vsemi testiranimi sortami smo najvišje zaviralne učinke zabeležili pri sorti Gala. S statistično analizo smo potrdili razlike v inhibiciji med sortami in razlike med inhibicijama doseženima pri sočasnem nanosu antagonista/patogena ter pri tri urnem zamiku nanosa patogena. Zaviralni učinki glive *M. tardicrescens* so bili pri vseh treh sortah v povprečju večji, ko smo jo inokulirali tri ure pred patogeno glivo.

Med tremi potencialnimi biotičnimi agensi, s katerimi smo okuževali drevesa, je največji delež okuženih dosegla gliva *M. malicola*, medtem ko je bil delež okuženih plodov pri *M. tardicrescens* in *P. fioriniae* bistveno manjši. Prav tako je bil največji delež okužene površine plodov ugotovljen pri glivi *M. malicola*, vendar ta ni bistveno odstopal od drugih dveh gliv s približno enakim deležem okužene površine.

Organsko topilo etil acetat ni zaviralo kalivosti trosov in rasti hif glive *C. fioriniae* na gojišču tekom 21 urne inkubacije.

Ekstrakti antagonističnih gliv so pokazali zaviralne učinke na kalitev trosov in rast hif glive *C. fioriniae*. Ekstrakta gliv *M. malicola* in *M. tardicrescens* sta popolnoma (100

%) zavrla kalitev trosov glive *C. fioriniae*, medtem ko je imel najmanjši vpliv na rast hif patogene glive ekstrakt glive *P. cerophilus*.

Iz glive *M. tardicrescens*, izolat št. A53, smo prvič izolirali in identificirali dve bioaktivni spojini iz skupine trihotecenov tipa B. Frakcioniranje ekstrakta z reverzno fazno HPLC in testiranje bioaktivnosti posameznih frakcij z indikatorskim organizmom (*C. fioriniae*) je vodilo v izolacijo aktivne frakcije z dvema bioaktivnima metabolitoma. Molekulska masa in posledično empirično formulo obeh spojin smo določili s HPLC-DAD-ESI-TOF-MS analizo.

Spojino 1 smo strukturno identificirali z NMR kot znani mikotoksin trihotekolon acetat z empirično formulo $C_{17}H_{22}O_5$, medtem ko smo drugo, novo spojino z empirično formulo $C_{17}H_{22}O_6$ strukturno identificirali kot 7-hidroksitrihotekolon acetat. S tem smo potrdili hipotezo, da je za antagonistične učinke odločilna antibioza.

Rezultati minimalne inhibitorne koncentracije obeh izoliranih spojin, ki so bile testirane v dilucijsem testu, spojina 1 (trihotekolon acetat) in spojina 2 (7-hidroksitrihotekolon acetat) niso pokazali antimikrobne aktivnosti proti *B. subtilis*, *E. coli* in *S. aureus*. Spojini sta pokazali zmerno bioaktivnost proti glivi *C. fioriniae* in *S. cerevisiae* ter šibko aktivnost proti kvasovkama *P. anomala* in *C. tenuis*.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Glive sajavosti in mušje pegavosti (SBFS) so navzoče na površju zrelih plodov jablane, najdemo jih pa tudi na listih, steblih ter plodovih mnogih drugih rastlinskih vrst. Na površju substratov se lahko razvijejo kolonije različnih SBFS gliv, ki običajno mejijo druga na drugo. Nekatere vrste SBFS gliv so sposobne ostro omejiti svoja območja rasti od drugih SBFS gliv. Predpostavljamo, da medsebojno vplivajo druga na drugo bodisi neposredno z antibiozo ali posredno preko tekmovanja za hranila. Na osnovi opaženih antagonističnih interakcij med glivami SBFS na površju substratov smo raziskovali glive SBFS za namene biotičnega varstva rastlin oziroma testirali njihove antagonistične sposobnosti proti pomembnim rastlinskim patogenom.

Naša hipoteza je sledila raziskavi Venkatasubbaiaha in sod. (1995) o zaviralnih učinkih sekundarnih metabolitov proti drugim glivam. Ugotovili so, da gliva *Peltaster fructicola* tvori *in vitro* različne spojine, med njimi tudi trihotecene (trihotekolon acetat) s protiglivičnim delovanjem proti *Botryosphaeria* (grenka gniloba). Cilj naše raziskave je bil izolirati tiste glive SBFS, ki izkazujejo na jabolčnem površju inhibitorne učinke proti drugim glivam SBFS, testirati njihove antagonistične sposobnosti v testih dvojnih kultur in identificirati sekundarne metabolite s potencialnimi zaviralnimi učinki proti drugim glivam v *in vitro* pogojih in na sadnem površju.

V prvem delu smo testirali antagonistične sposobnosti izbranih SBFS gliv proti pomembnim rastlinskim patogenom v *in vitro* testu dvojnih kultur na Czapkovem agarju s kvasnim ekstraktom (CYA). Test smo izvedli tako, da smo na določeni razdalji inokulirali patogene izolate in potencialne antagoniste gliv SBFS. Rastlinski patogeni, vključeni v raziskavo, so iz vrst *Venturia inaequalis* (jablanov škrlup) *Fusarium avenaceum* (gniloba peščišča), *Botrytis cinerea* (siva plesen) ter *Colletotrichum fioriniae* (antraknoza). Izbrali smo 83 izolatov različnih vrst gliv SBFS. Vključene so bile glive *Microcyclospora malicola* (5 izolatov), *Microcyclospora pomicola* (1 izolat), *Microcyclospora tardicrescens* (1 izolat), *Microcyclosporella mali* (25 izolatov), *Schizothyrium pomi* (32 izolatov), *Peltaster cerophilus* (18 izolatov) in *Devriesia pseudoamericana* (1 izolat). Rezultati *in vitro* testov dvojnih kultur so pokazali, da je samo izolat *M. tardicrescens* A53 izrazil antagonistični učinek proti *C. fioriniae*. Inhibicija rasti micelija te patogene glive je bila 55,26 %. Rast micelija patogene glive *V. inaequalis* so inhibirale vrste *P. cerophilus* (30,60 %), *M. malicola* (17,80 %), *D. pseudoamericana* (5,40 %), *M. mali* (2,30 %) in *S. pomi* (1,10 %). Razlike v biotični aktivnosti smo zabeležili tudi med posameznimi izolati znotraj iste vrste gliv SBFS. Najbolj učinkoviti izbrani izolati znotraj posamezne vrste gliv so bili *P. cerophilus* A55, *M. malicola* A45, *M. mali* A46 in *S. pomi* A12. Noben izmed 83 testiranih izolatov SBFS gliv ni inhibiral rasti gliv *F. avenaceum* in *B. cinerea*.

Filogenetske odnose gliv iz rodu *Peltaster* smo preučevali na podlagi nukleotidnega zaporedja regije ITS in so prikazani v filogenetskem drevesu (Slika 23). Iz rezultatov analize se vidi, da se nova opisana vrsta glive *P. cerophilus* razlikuje od vrste *P.*

fructicola. Vrsti se ločita tudi geografsko, in sicer je gliva *P. cerophilus* vzorčena samo v Evropi in vrsta *P. fructicola* v Severni Ameriki in Evropi.

V nadaljevanju raziskav smo potencialni biotični agensi *M. tardicrescens* preverili v *semi in vivo* poskusu na jabolkah treh sort (Gala, Gloster, Zlati delišes) in ugotovili, da suspenzija trosov glive *M. tardicrescens*, inokulirana na obrana jabolka omenjenih sort, zavira rast in razvoj nekroze glive *C. fioriniae*. Inhibicija rasti nekroze glive *C. fioriniae*, nanesene sočasno z antagonistom *M. tardicrescens*, je znašala 19,17 % pri sorti Gala, 12,11 % pri sorti Gloster in 9,84 % pri sorti Zlati delišes, medtem ko je bila inhibicija rasti nekroze pri neistočasnem, 3 urnem zamiku nanosa patogenega pri vseh treh sortah višji, in sicer 26,54 % pri sorti Gala, 16,87 % pri sorti Gloster in 14,9 % pri sorti Zlati delišes.

V sadovnjaku Kmetijskega inštituta Slovenije smo izbrali 6 dreves sorte Gloster. V času rastne dobe smo enkrat tedensko od konca aprila do vključno septembra umetno okuževali drevesa s pršenjem suspenzij trosov gliv *M. tardicrescens*, *P. cerophilus* in *M. malicola*. Konec septembra smo ob obiranju plodov preverjali njihovo okuženost z omenjenimi glivami. Največ plodov je bilo okuženih z *M. malicola* (80,30 %), nato z *M. tardicrescens* (58,76 %) ter *P. cerophilus* (51,79 %). Povprečna okužena površina plodu je bila pri *M. malicola* 18,97 %, pri *M. tardicrescens* 11,07 % ter pri *P. cerophilus* 9,31 %.

Nato smo v *in vitro* pogojih preučevali vpliv ekstraktov antagonističnih izolatov SBFS na kalitev trosov glive *C. fioriniae* in ugotovili precejšen zaviralni učinek pri vseh testiranih ekstraktih. Izbrane izolate *M. tardicrescens* A53, *P. cerophilus* A55, *M. malicola* A45, *M. mali* A46 in *S. pomi* A12 smo inkubirali 12 dni pri 23 °C. Metabolite smo ultrazvočno ekstrahirali iz koščkov micelija in CYA gojišča z etil acetatom. Vpliv ekstraktov na čas vzkalitve trosov in rast primarnih kličnih hif smo dokumentirali 6 krat tekom 21 urne inkubacije. Ekstrakta gliv *M. malicola* in *M. tardicrescens* sta popolnoma inhibirala vzklitje trosov glive *C. fioriniae*, medtem ko so ostali glivni ekstrakti samo zavirali rast kličnih hif. Ekstrakt glive *S. pomi* je inhibiral rast kličnih hif za 86,10 %, *M. mali* za 68,91 % in *P. cerophilus* za 11,36 %.

Izolat *M. tardicrescens* z vidnim inhibitornim učinkom v *in vitro* testu dvojnih kultur in njegovim prav tako učinkovitim ekstraktom smo gojili na 30 CYA ploščah, da bi na ta način povečali obseg tvorbe sekundarnih metabolitov. Glivni ekstrakt smo testirali s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti sklopljeno z detektorjem z diodnim nizom in masno spektrometrijo (HPLC - DAD - MS). Nato smo z difuzijsko metodo s filter diski izvedli biotest za določevanje antibiotične aktivnosti ekstrakta z gram pozitivnima bakterijama *Bacillus subtilis* in *Escherichia coli* ter glivama *C. fioriniae* in *Mucor hiemalis*. Glivni ekstrakt je deloval inhibitorno proti glivama *C. fioriniae* in *M. hiemalis*. Dodatni poskusi so vključevali preparativni HPLC, da bi izolirali in očistili biološko aktivne spojine v ekstraktu. Zbrane frakcije smo uporabili za testiranje antimikrobnega učinka. Bioaktivni potencial vsake posamezne frakcije smo testirali z indikatorskim organizmom *C. fioriniae* na mikrotitrski plošči. Nadalje smo izolirali dve čisti aktivni substanci in jim določili strukturo ter elementno sestavo s spektralnima

metodama - jedrsko magnetno resonanco in masno spektrometrijo. Spojino 1 smo identificirali kot znani mikotoksin trihotekolon acetat z empirično formulo $C_{17}H_{22}O_5$, medtem ko smo drugo, novo spojino identificirali kot 7-hidroksitrihotekolon acetat z empirično formulo $C_{17}H_{22}O_6$. Obe identificirani bioaktivni spojini sodita v trihotecene tipa B.

Aktivnost izoliranih bioaktivnih spojin smo ocenili s testom minimalne inhibitorne koncentracije. Obe spojini sta pokazali zmerno bioaktivnost proti glivi *C. fioriniae* in kvasovki *S. cerevisiae*, in sicer 12,5 µg/ml pri novi spojini (7- hidroksitrihotekolon acetat) in zgolj 6,25 µg/ml pri spojini trihotekolon acetat. Šibko aktivnost sta spojini pokazali proti kvasovki *P. anomala* (50 µg/ml), medtem ko nobene antimikrobne aktivnosti nismo opazili proti bakterijam *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* in *Staphylococcus aureus* (>100 µg/ml). Do sedaj je za edino tvorko trihotecenov znotraj redu Capnodiales veljala gliva *Peltaster fructicola*. Med drugimi spojinami je ta vrsta glive proizvedla toksin trihotekolon acetat, trihotecen tipa B, ki je pokazal antimikrobno aktivnost v *in vitro* poskusu proti glivi *Botryosphaeria* (grenka gniloba) (Venkatasubbaiah in sod., 1995).

Ugotovitve kažejo, da lahko glive SBFS tvorijo zanimive biološko aktivne sekundarne metabolite, glede na to, da zavirajo rast drugih gliv v *in vitro* poskusih in tudi na naravnem substratu. Nadaljnje študije so priporočljive za pojasnitev in identifikacijo sekundarnih metabolitov pri drugih glivah SBFS. Možno je, da bi lahko nekatere sekundarne metabolite izkoriščali za biotehnološke procese ali za nadzor rastlinskih patogenih mikroorganizmov.

6.2 SUMMARY

Sooty blotch and flyspeck (SBFS) fungi can be encountered surprisingly often on the surface of apple fruits, but they are also present on leaves, stems and fruits of many other plant species. On the natural substrata, colonies of different SBFS fungi can co-occur and juxtapose each other. But some SBFS fungi are able to sharply demarcate their territories from each other. Thus, they seem to interact directly through antibiosis or indirectly through nutritional competition. Based on the observed antagonistic interactions between different SBFS fungi on the natural substratum, we were testing how these SBFS fungi may interact with other fungal plant pathogens.

Our hypotheses follow those of Venkatasubbaiah et al (1995) who targeted secondary metabolites that could have an inhibitory potential against other fungi. The authors of this study showed that *Peltaster fructicola* can form trichothecolone, trichothecolone acetate, 6-methylsalicylic acid, and 2,5-dihydroxybenzoic acid, of which trichothecolone acetate and 6-methylsalicylic acid showed antifungal properties *in vitro* against the plant pathogenic *Botryosphaeria*, which causes bitter rot. The aim of the current study was to isolate pairs of juxtaposing SBFS taxa from apples, to test their inhibitory capacity against plant pathogens in dual culture assays and to identify secondary metabolites in assays that could have inhibitory effects against other fungi *in vitro* and on fruit surfaces.

In the first part of the research, the antagonistic potential of selected SBFS fungi against important plant pathogens was tested in *in vitro* dual culture assays on Czapek yeast agar (CYA). Plant pathogenic fungi included in the study were the species *Venturia inaequalis* (causal agent of apple scab), *Fusarium avenaceum*, (causal agent of core rot), *Botrytis cinerea* (cause of grey mould disease on many plants) and *Colletotrichum fioriniae* (causal agent of anthracnose). A total of eighty-three strains of SBFS fungi including *Microcyclospora malicola* (5 strains), *Microcyclospora pomicola* (1 strain), *Microcyclospora tardicrescens* (1 strain), *Microcyclosporella mali* (25 strains), *Schizothyrium pomi* (32 strains), *Peltaster cerophilus* (18 strains), newly described in the context of this study, and *Devriesia pseudoamericana* (1 strain) were tested. Results of *in vitro* dual culture assay showed that a single strain of *M. tardicrescens* was the only SBFS fungus showing antagonistic effects against *C. fioriniae*. Mycelial growth of this pathogen was suppressed by 55,26 %. Species *Peltaster* sp., described in the context of this study as *Peltaster cerophilus* sp. nov., reduced the colony growth of *V. inaequalis* by 30,6 %, *Microcyclospora malicola* by 17,8 %, *Devriesia pseudoamericana* by 5,4 %, *Microcyclosporella mali* by 2,3 % and *Schizothyrium pomi* by 1,1 %. Selected strains *P. cerophilus* A55, *M. malicola* A45, *M. mali* A46 and *S. pomi* A12 were the most effective strains. None of these tested strains showed antagonistic effects against *F. avenaceum* and *B. cinerea*.

Closely related species of the genus *Peltaster* were phylogenetically analyzed by using nucleotide sequences of the internal transcribed spacer regions of the ribosomal rRNA gene cluster. The analyses support the distinction of the European *Peltaster* sp. (described as *P. cerophilus* sp. nov. in the context of this study), from *P. fructicola*, which is known from North America and Europe.

In other experiments, the biological control potential of this *M. tardicrescens* strain was tested. A spore suspension of the strain was inoculated on ripe fruits of the three apple varieties (Gala, Golden Delicious and Gloster) and reduced the necrotic development of the simultaneously applied *C. fioriniae*. The average percent of the observed reduction was 19,17 % on Gala, 12,11% on Gloster and 9,84% on Golden Delicious. When *M. tardicrescens* was applied 3 hours before the pathogen was inoculated, even higher reductions were observed: 26,54% on varieties Gala, 16,87% on Gloster and 14,9% on Golden Delicious.

Spore suspensions of *M. tardicrescens*, *P. cerophilus* and *M. malicola* were inoculated on developing apples (variety Gloster) in an experimental orchard once a week from the end of April till September. At the end of the growing season, 80,30 % of the infected apples were colonized with *M. malicola*, 58,76 % with *M. tardicrescens* and by 51,79 % with *P. cerophilus*. On average, *M. malicola* colonized 18,97 % of fruit areas. These percentages were 11,07 % for *M. tardicrescens* and 9,31% for *P. cerophilus*.

The effect of extracts of strains of antagonistic SBFS species on the germination of *C. fioriniae* was tested. Selected strains *M. tardicrescens* A53, *P. cerophilus* A55, *M. malicola* A45, *M. mali* A46 and *S. pomi* A12 were grown for 12 days at 23 °C.

Metabolites were ultrasonically extracted from pieces of mycelium and CYA with ethyl acetate. Extracts of *M. malicola* and *M. tardicrescens* strains completely inhibited spore germination for at least 21 h, while extracts from other taxa only reduced the growth of the germinating hyphae. *Schizothyrium pomi* extracts reduced the length of the germination tubes by 86,10 %, those of *M. mali* by 68,91 % and those of *P. cerophilus* by 11,36 %.

The strain of *M. tardicrescens* inhibiting the colony growth of *C. fioriniae* in dual culture tests and suppressing the germination of the conidia of this pathogen was cultured on 30 CYA plates for scaling-up the formation of secondary metabolites. The metabolites were ultrasonically extracted from the agar and the mycelium with ethyl acetate and analyzed by high performance liquid chromatography coupled with diode array detector and mass spectrometry (HPLC - DAD - MS). In addition, a bioassay consisting of a diffusion method with filter discs was done for the determination of the antibiotic effect of the extract against gram positive bacteria *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* and the fungi *C. fioriniae* and *Mucor hiemalis*. The extract showed inhibitory activity against *C. fioriniae* and *Mucor hiemalis*. Additional assays included preparative HPLC, by which individual secondary metabolites become fractionated and purified. The isolated fractions were used for testing their potential antimicrobial effects against *C. fioriniae* in microtiter plates. The structure and elemental composition of two fractions showing significant antimicrobial effects were determined with nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectrometry (MS). Compound 1 was identified as the known mycotoxin trichothecolone acetate; it had the empirical formula $C_{17}H_{22}O_5$. Compound 2 was identified as the novel 7 - hydroxytrichothecolone acetate and had the empirical formula $C_{17}H_{22}O_6$. Both identified bioactive compounds belong to type B trichothecenes.

The biological activity of trichothecolone acetate and 7 - hydroxytrichothecolone acetate was determined in a minimal inhibitory concentration (MIC) test. Both isolated compounds showed moderate bioactivity against *C. fioriniae* and *Saccharomyces cerevisiae*. Obtained MIC values were 12,5 mg/ml for 7 - hydroxytrichothecolone acetate and only 6,25 mg/ml for trichothecolone acetate. Low activity of these compounds was observed against *Pichia anomala* (50 mg/ml), while no antimicrobial activity was observed against *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* (>100 mg/ml). The only other SBFS fungus previously reported to produce trichothecenes is *Peltaster fructicola*. Among other compounds, this species produced trichothecolone acetate, type B trichothecenes, which showed antifungal properties *in vitro* against *Botryosphaeria* causing bitter rot (Venkatasubbaiah et al., 1995).

The findings suggest that SBFS fungi may produce interesting secondary metabolites. Because they seem to inhibit other fungi in *in vitro* tests and also on the natural substratum, some of their metabolites might be biologically active. Further studies are required to elucidate the metabolic potential of additional other SBFS fungi. It is possible that some of their secondary metabolites could be exploited for biotechnological processes or for the control of plant pathogenic microorganisms.

7 VIRI

- Agrios G. N. 2005. Plant pathology, 5th ed., Burlington, Elsevier Academic Press: 922 str.
- Andersen B., Hansen M. E., Smedsgaard J. 2005. Automated and unbiased image analyses as tools in phenotypic classification of small-spored *Alternaria* spp. *Phytopathology*, 95: 1021-1029
- Andrews J. H., Berbee F. M., Nordheim E. V. 1983. Microbial antagonism to the imperfect stage of the apple scab pathogen, *Venturia inaequalis*. *Phytopathology*, 73: 228-234
- Andrews J. H. 1992. Biological control in the phyllosphere. *Annual Review of Phytopathology*, 30: 603-635
- Baker R. 1991. Diversity in biological control. *Crop Protection*, 10: 85-94
- Batzer J. C., Gleason M. L., Tiffany L. H. 2002. Discrete speck, a putative newly discovered fungus in the sooty blotch and flyspeck complex on apples. *Phytopathology*, 92: 520-532
- Batzer J. C., Díaz-Arias M. M., Harrington T. C., Gleason M. L., Groenewald J. Z., Crous P. W. 2008. Four species of *Zygophiala* (Schizothyriaceae, Capnodiales) are associated with the sooty blotch and flyspeck complex on apple. *Mycologia*, 100: 246-258
- Batzer J. C., Gleason, M. L., Harrington, T. C., Tiffany, L. H. 2005. Expansion of the sooty blotch and flyspeck complex on apples based on analysis of ribosomal DNA gene sequences and morphology. *Mycologia*, 97: 1268-1286
- Batzer J. C., Dias Arias M. M., Harrington T. C., Gleason M. L. 2009. Four species of *Zygophiala* (Schizothyriaceae, Capnodiales) are associated with the sooty blotch and flyspeck complex on apple. *Mycologia*, 100: 246-258
- Batzer J. C., Rincon S. H., Mueller D. S., Petersen B. J., Le Corronc F., McManus P. S., Dixon P. M., Gleason M. L. 2010. Effect of temperature and nutrient concentration on the growth of six species of sooty blotch and flyspeck fungi. *Phytopathologia Mediterranea*, 49: 3-10
- Belding R. D., Sutton T. B., Blankenship S. M., Young E. 2000. Relationship between apple fruit epicuticular wax and growth of *Peltaster fructicola* and *Leptodontidium elatius*, two fungi that cause sooty blotch disease. *Plant Disease*, 84: 767-772
- Benhamou N., Garand C., Goulet A. 2002. Ability of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 to induce resistance against *Pythium ultimum* infection in cucumber. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 4044-4060
- Bennett J. W., Klich M. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Review*, 16: 497-516
- Blum L. E. B., Amarante C. V. T., Valdebenito-Sanhueza R. M. 2005. Postharvest application of the yeast *Cryptococcus laurentii* reduces apple rots. *Acta Horticultura*, 682: 2109-2114
- Boyd-Wilson K. S. H, Glithero N., Ma Q., Alspach P., Walter M. 2006. Yeast isolates to inhibit blue mold and bitter rot of apples. *New Zealand Plant Protection*, 59: 86-91
- Bull C. T., Shetty K.G. and Subbarao K. V. 2002. Interactions between Myxobacteria, plant pathogenic fungi, and biocontrol agents. *Plant Disease*, 86: 889-896

- Burr T. J., Matteson M. C., Smith C. A., Corral-Garcia M. R., Huang T. C. 1996. Effectiveness of bacteria and yeasts from apple orchards as biological control agents of apple scab. *Biological Control*, 6: 151-157
- Carisse O., Dewdney M. 2002. A review of non-fungicidal approaches for the control of apple scab. *Phytoprotection*, 83: 1-29
- Carisse O., Jobin T. 2006. Apple scab: improving understanding for better management. Toronto, Agriculture and Agri-Food Canada: 15 str.
<http://www.agr.gc.ca/eng/science-and-innovation/science-publications-and-resources/technical-factsheets/apple-scab-improving-understanding-for-better-management/?id=1234199585484> (avgust, 2013)
- Carisse O., Philion V., Rolland D., Bernier J. 2000. Effect of fall application of fungal antagonists on spring ascospore production of the apple scab pathogen *Venturia inaequalis*. *Phytopathology*, 90: 31-37
- Carsolio C., Benhamou N., Haran S., Cortès C., Gutiérrez A., Chet I., Herrera-Estrella A. 1999. Role of *Trichoderma harzanium* endochitinase gene, ech 42 in mycoparasitism. *Applied Environmental Microbiology*, 65: 929-935
- Celar F. 2000. Mehanizmi nasprotij med talnimi saprofitskimi in parazitskimi glivami. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 118 str.
- Celar F. 2003. Competition for ammonium and nitrate forms of nitrogen between some phytopathogenic and antagonistic soil fungi. *Biological Control*, 28: 19-24
- Chand-Goyal T., Eckert J. W., Droby S., Atkinson K. 1998. A method for studying the population dynamics of *Candida oleophila* on oranges in the grove, using a selective isolation medium and PCR technique. *Journal of Microbiological Research*, 153: 265-270
- Chugh J. K., Wallace B. A. 2001. Peptaibols: Models for ion channels. *Biochemical Society Transactions*, 29: 565-570
- Colby A. S. 1920. Sooty blotch of pomaceous fruits. *Transactions of the Illinois State Academy of Science*, 13: 139-179
- Council Regulation (EC) No 1991/2006 of 21 December 2006 amending Regulation (EEC) No 2092/91 on organic production of agricultural products and indications referring thereto on agricultural products and foodstuffs. 2006. Official Journal of the European Union, 89, L198: 11-14
- Council Regulation (EC) No 2092/91 of 24 June 1991 on organic production of agricultural products and indications referring there to on agricultural products and foodstuffs. 1991. Official Journal of the European Union, 22, L198: 1-89
- Couteaudier Y. 1992. Competition for carbon in soil and rhizosphere, a mechanism involved in biological control of *Fusarium* wilts. V: *Biological control of plant diseases*. Tjamos E.C., Papavizas A.C., Cook R.J. (eds). New York, Plenum Press: 99-104
- Crosby J. A., Janik J., Pecknold P. C., Korban S. S., O'Connor P. A., Ries S. M., Gotfreda J., Voordeckers A. 1992. Breeding apples for scab resistance. *Fruit Varieties Journal*, 46: 145-166
- Cullen D., Barbee F. M., Andrews J. H. 1984. *Chaetomium globosum* antagonizes the apple scab pathogen, *Venturia inaequalis*, under field conditions. *Canadian Journal of Botany*, 62: 1814-1818

- Damm U., Cannon P. F., Woudenberg J. H. C., Crous P. W. 2012. The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in Mycology*, 73: 37–113
- Dangl J. L., Jones J. D. G. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, 411: 826–833
- Deacon J. W. 1976. Studies of *Phytium oligandrum*, an aggressive parasite of other fungi. *British Mycological Society*, 66: 383–391
- Dean R., Van Kan J. A. L., Pretorius Z. A., Hammond-Kosack K. E., Di Pietro A. 2012. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13: 414–430
- Díaz Arias M. M., Batzer J. C., Harrington T. C., Wong W. W., Bost S. C., Cooley D. R., Ellis M. A., Hartman J. R., Rosenberger D. A., Sundin G. W., Sutton T. B., Travis J. W., Wheeler M. J., Yoder K. S., Gleason M. L. 2010. Diversity and biogeography of sooty blotch and flyspeck fungi on apple in the Eastern and Midwestern United States. *Phytopathology*, 100: 345–355
- Dinis A. M. P., Lino C.M., Pena A. S., 2007. Ochratoxin A in nephropathic patients from two cities of central zone in Portugal. *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis*, 44: 553–557
- Elad Y., Steward A. 2004. Microbial control of *Botrytis* spp. V: *Botrytis*: biology, pathology and control. Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Delen N. (eds). Groningen, Kluwer Academic Publishers: 223–241
- El-Ghaouth A., Smilanick J., Brown G. E., Ippolito A., Wilson C. L. 2001. Control of decay of apple and citrus fruits in semicommercial tests with *Candida saitoana* and 2-Deoxy-D-glucose. *Biological Control*, 20: 96–101
- Fokkema N. J. 1981. Fungal leaf saprophytes, beneficial or detrimental? V: Microbial ecology of the phylloplane. Blakeman J. P. (ed.). New York, Academic Press: 433–435
- Fokkema N. J., 1993. Opportunities and problems of control of foliar pathogens with micro organism. *Journal of Pest Science*, 37: 411–416
- Frank J., Crous P., Groenewald W., Oertel J. Z., Hyde B., Phengsintham K. D., Schroers H. J. 2010. *Microcyclospora* and *Microcyclosporella*: novel genera accommodating epiphytic fungi causing sooty blotch on apple. *Persoonia*, 24: 93–105
- Fiss M., Kucheryava N., Schonherr J., Kollar A., Arnold A., Auling G. 2003. Isolation and characterization of epiphytic fungi from the phyllosphere of apple as potential biocontrol agents against apple scab (*Venturia inaequalis*). *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 107: 1–11
- Gams W., Hoekstra E. S., Aptroot A. 1998. *CBS Course of Mycology*, 4th ed. Baarn, Centraalbureau voor Schimmelcultures: 42 str.
- Gleason M. L., Batzer J. C., Díaz Arias M. M., Sutton T. B., Crous P. W., Ivanović M., McManus P. S., Cooley D. R., Mayr U., Weber R. W. S., Yoder K. S., Del Ponte E. M., Biggs A. R., Oertel B. 2011. A new view of sooty blotch and flyspeck. *Plant Disease*, 95: 368–383
- Ghisalberti E. L., Sivasithamparan K. 1991. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. *Soil Biology and Biochemistry*, 23:1011–1020

- Grove G. G., Boal R. J. 1997. Apple powdery mildew control trials using the mycoparasite *Ampelomyces quisqualis* (AQ10). *Fungicide and Nematicide Tests*, 52:7
- Groves A. B. 1933. A study of the sooty blotch disease of apples and casual fungus *Gloeodes pomigena*. *Virginia Agricultural Experimental Station Bulletin*, 50: 1–43
- Guelldner R. C., Riley C. C., Pusy P. L., Costello C. E., Arrendale R. F. 1988. Isolation and identification of iturins as antifungal peptides in biological control of peach brown rot with *Bacillus subtilis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36: 366-370
- Gupta S., Arora D. K, Shrivastava A. K. 1995. Growth promotion of tomato plants by Rhizobacteria and imposition of energy stress on *Rhizoctonia solani*. *Soil Biology and Bio Chemistry*, 27: 1051-1058
- Harman G. E. 2000. Myths and dogmas of bio control: Changes in the perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease*, 84: 377-393
- Holb I. J., de Jong P. F., Heijne B. 2003. Efficacy and phytotoxicity of lime sulphur in organic apple production. *Annals of Applied Biology*, 142: 225–233
- Hooker J. E., Jaizme-Vega M., Atkinson D. 1994. Biocontrol of plant pathogens using arbuscular mycorrhizal fungi. V: Impact of mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems. Gianinazzi S., Schuepp H. (eds.). Basel, Birkhauser Verlag: 191-200
- Hughes S. J. 1976. Sooty moulds. *Mycologia*, 68, 4: 693-820
- Hymery N. Sibiril Y., Parent-Massin D. 2006. In vitro effects of trichothecenes on human dendritic cells. *Toxicology in Vitro*, 20: 899–909
- Ivanović M. M., Ivanović M. S., Batzer J. C., Tatalović N., Oertel B., Latinović J., Latinović N., Gleason M. L. 2010. Fungi in the apple sooty blotch and flyspeck complex from Serbia and Montenegro. *Journal of Plant Pathology*, 92: 65-72
- Ippolito A., El-Ghaouth A., C. L. Wilson, Wisniewski M. 2000. Control of postharvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense responses. *Postharvest Biology and Technology*, 19: 265-272
- Ippolito A., Nigro F. 2000. Impact of preharvest application of biological control agents on postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. *Crop Protection*, 19: 715-723
- Janisiewicz W. J., Peterson D. L., Bors R. 1994. Control of storage decay of apples with *Sporobolomyces roseus*. *Plant Disease*, 78: 446-470
- Janisiewicz W. J., Jeffers S. N. 1997. Efficacy of commercial formulation of two biofungicides for control of blue mold and gray mold of apples in cold storage. *Crop Protection*, 16: 629-633
- Janisiewicz W. J., Yourman L., Roitman J., Mahoney N. 1991. Postharvest control of blue mold and grey mold of apples and pears by dip treatment with pyrrolnitrin, a metabolite of *Pseudomonas cepacia*. *Plant Disease*, 75: 490-494
- Jeffries P., Young T. W. K. 1994. Interfungal parasitic relationships. *International hypothesis. Trends in Ecology and Evolution*, 4: 164-170
- Jijakli M. H., Lepoivre P. 1998. Characterization of an exo-B-1,3-glucanase produced by *Pichia anomala* strain K, antagonist of *Botrytis cinerea* on apples. *Phytopathology*, 88: 335-343
- Johnson E. M., Sutton T. B., Hodges C. S. 1996. *Peltaster fructicola*: a new species in the complex of fungi causing apple sooty blotch disease. *Mycologia*, 88: 114–120

- Johnson E. M., Sutton T. B. 1994. First report of *Geastrumia polystigmatis* on apple and common blackberry in North America. *Plant Disease*, 78: 1219
- Johnson E. M., Sutton T. B., Hodges C. S. 1997. Etiology of apple sooty blotch disease in North Carolina. *Phytopathology*, 87: 88–95
- Johnson E. M., Sutton T. B. 2000. Response of two fungi in the apple sooty blotch complex to temperature and relative humidity. *Phytopathology*, 90: 362–367
- Kapooria R. G. 2007. An overview of biological control of fruit and vegetable diseases, V: Biological control of plant diseases. Vol. 8. Chincholkar S. B., Mukerji K. G. (eds.). New York, The Haworth Press, Inc.: 191–222
- Keller N. P., Turner G., Bennett J. W. 2005. Fungal secondary metabolism-from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology*, 3: 937–947
- Kiss L. 2003. A review of fungal antagonists of powdery mildews and their potential as biocontrol agents. *Pest Management Science*, 59: 475–483
- Knoll D., Schreiber L. 1998. Influence of epiphytic microorganisms on leaf wettability: wetting of the upper leaf surface of *Juglans regia* and model surfaces in relation to colonization by microorganisms. *New Phytology*, 54: 167–172
- Köhl J. J., Molhoek W., Belia B. H., Haas G., Goossen-van de Geijn H. 2008. Selection and orchard testing of antagonists suppressin conidial production by the apple scab pathogen *Venturia inaequalis*. *European Journal of Plant Pathology*, 123: 401–414
- Konstantinou S., Karaoglanidis G. S., Bardas G. A., Minas I. S., Doukas E., Markoglou A. N. 2011. Postharvest fruit rots of apple in Greece: pathogen incidence and relationships between fruit quality parameters, cultivar susceptibility, and patulin production. *Plant Disease*, 95: 666–672
- Krishma P. K., McSpadden B. 2006. Biological control of plant pathogens. *The Plant Health Instructor*, 10: 1–25
- 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
- Leverentz B., Conway W. S., Janisiewicz W. J., Saftner R. A., Camp M. J. 2003. Effect of combining MCP treatment, heat treatment, and biocontrol on the reduction of postharvest decay of 'Golden Delicious' apples. *Postharvest Biology and Technology*, 27, 3: 221–233
- Li Y., Wang Z., Beier R. C., Shen J., De Smet D., De Saeger, S., Zhang S. 2011. T-2 toxin, a trichothecene mycotoxin: Review of toxicity, metabolism, and analytical methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 3441–3453
- Lorito M., Peterbauer C., Hayes C. K., Harman G. E. 1994. Synergistic action between fungal cell wall degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination. *Microbiology*, 140: 623–629
- Martin J. F., Casqueiro J., Liras P. 2005. Secretion systems for secondary metabolites: how producer cells send out messages of intercellular communication. *Current Opinion in Microbiology*, 8: 282–293
- McCormick S. P., Stanley A. M., Stover N. A., Alexander N. J. 2011. Trichothecenes: from simple to complex mycotoxins. *Toxins*, 3: 802–814
- Medjedović A., Frank J., Schroers H-J, Oertel B., Batzer J.C. 2014. *Peltaster cerophilus* is a new species of the apple sooty blotch complex from Europe. *Mycologia*, DOI: 10.3852/106.3.000: 12 str. [v tisku]

- Mycotoxins - risks in plant, animal and human systems. Task Force Report. No. 139. 2003. Iowa, Council for Agricultural Science and Technology: 191 str.
- Nasu H., Kunoh H. 1987. Scanning electron microscopy of flyspeck of apple, pear, Japanese persimmon, plum, Chinese quince, and pawpaw. *Plant Disease*, 71: 361-364
- Nigro F., Ippolito A., Lima G. 1998. Use of UV- C light to reduce *Botrytis* storage rot of table grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 13: 171-181
- Nishie K., Cutler H. G., Cole R. J. 1989. Toxicity of trichothecenes, moniliformin, zearalenone / ol, griseofulvin, patulin, pr toxin and rubratoxin B on protozoan *Tetrahymena pyriformis*. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*, 65: 197-210
- Pal K. K., McSpadden B. 2006. Biological control of plant pathogens. *The Plant Health Instructor*, 10: 1-25
- Peres N. A., Timmer L. W., Adaskaveg J. E., Correll J. C. 2005. Life styles of *Colletotrichum Acutatum*. *Plant Disease*, 89, 8: 784-796
- Persson Y., Veenhuis M., Nordbring-Hertz B. 1985. Morphogenesis and significance of hyphal coiling by nematode-trapping fungi in mycoparasitic relationships. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology*, 31:283-291
- Phillion V., Carisse O., Paulitz T. C. 1997. In vitro evaluation of fungal isolates for their ability to influence leaf rheology, production of pseudothecia, and ascospores of *Venturia inaequalis*. *European Journal of Plant Pathology*, 103: 441-452
- Richard J. L. 2007. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses-an overview. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 3-10
- Rocha O., Ansari K., Doohan F. M. 2005. Effects of trichothecene mycotoxins on eucaryotic cells: A review. *Food Additives and Contaminants*, 22, 4: 369-378
- Rosas S. 2007. Role of rhizobacteria in biological control of plant diseases. V: *Biological control of plant diseases*. Vol. 8. Chincholkar S. B., Mukerji K. G. (eds.). New York, The Haworth Press, Inc.: 75-103
- Rotem J., Wooding B., Aylor D. E., 1985. The role of solar radiation, especially ultraviolet, in the mortality of fungal spores. *Phytopathology*, 75: 510-514
- Samir D., Wisniewski M., Macarasin D., Wilson C. 2009. Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? *Postharvest Biology and Technology*, 52: 137-145
- SAS Software. Version 8.01. 1999. Cary, SAS Institute Inc. (programska oprema)
- Schreiber L. 2001. Effects of temperature on cuticular transpiration of isolated cuticular membranes and leaf discs. *Journal of Experimental Botany*, 52: 1893-1900
- Schroers H.-J., Sorensen J. L., Thrane U., Nielsen K. F., Žerjav M., Munda A., Frank J. 2008. High incidence of *Fusarium avenaceum* (Ascomycota, Nectriaceae, Gibberella) and moniliformin in apples showing wet core rot symptoms. *Journal of Plant Pathology*, 90, Supplement 2: 326
- Schweinitz L. D. 1832. Synopsis fungorum in America Boreali media degentium. Philadelphia, Transactions of the American Philosophical Society: 232 str.
- Sever Z., Ivić D., Kos T., Miličević T. 2012. Identification of *fusarium* species isolated from stored apple fruit in Croatia. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 63: 463-470

- Sharp W. L., Yoder K. S. 1985. Correlation between humidity periods and sooty blotch and flyspeck incidence in Virginia apple orchards. *Phytopathology*, 75: 628-630
- Sorensen J. L., Phipps R. K., Nielsen K. F., Schroers H.-J., Frank J., Thrane U. 2009. Analysis of *Fusarium avenaceum* metabolites produced during wet apple core rot. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 1632-1639
- Smilanick J. L., Denis-Arrue R., Bosch J. R., Gonzales A. R., Henson D., Janisiewicz W. J. 1993. Control of postharvest brown rot of nectarines and peaches by *Pseudomonas* species. *Crop Protection*, 12: 513-520
- Spadaro D., Vola R., Piano S., Gullino M. L. 2002. Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples. *Postharvest Biology and Technology*, 24: 123-134
- Standard Nucleotide BLAST. 2013. Bethesda, National Center for Biotechnology Information.
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (december, 2013)
- Sutton A. L., Sutton T. B. 1994. The distribution of the mycelial types of *Gloeodes pomigena* on apples in North Carolina and their relationship to environmental conditions. *Plant Disease*, 78: 668-673
- Teixidó H. N., Viñas I., Usall J., Magan N. 1998. Control of blue mould of apples by preharvest application of *Candida sake* grown in media with different water activity. *Phytopathology*, 88: 960-964
- Teixidó H. N., Usall J., Viñas I. 1999. Efficacy of preharvest and postharvest *Candida sake* biocontrol treatments to prevent blue mould on apples during cold storage. *International Journal of Food Microbiology*, 50: 203-210
- Tetlow I., Matthew K. 2004. Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants. *Journal of Experimental Botany*, 52: 1893-1900
- Tsuneda A., Skoropad W. P. 1980. Interactions between *Nectria inventa*, a destructive mycoparasite and fourteen fungi associated with rapeseed. *Transactions of the British Mycological Society*, 74: 501-507
- Usall J., Teixido N., Torres R., Ochoa de Eribe X., Viñas I. 2001. Pilot tests of *Candida sake* (CPA-1) applications to control postharvest blue mold on apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 21: 147-156
- Venkatasubbaiah P., Sutton T. B., Chilton W. S. 1995. The structure and biological properties of secondary metabolites produced by *Peltaster fructicola*, a fungus associated with apple sooty blotch disease. *Plant Disease*, 79: 1157-1160
- Vey A., Hoagland R. E., Butt T. M. 2001. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. V: Fungi as biocontrol agents. Butt T. M., Jackson C. W., Magan N. (eds). Wallingford, CAB International: 322-357
- Williamson S. M., Sutton T. B. 2000. Sooty blotch and flyspeck of apple: etiology, biology and control. *Plant Disease*, 84: 714-724
- Wisniewski M., Biles C., Droby S., McLaughlin R., Wilson C., Chalutz E. 1991. Mode of action of the postharvest biocontrol yeast, *Pichia guilliermondii* I. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 39: 245-258

- Wrona B., Grabowski M. 2004. Influence of fructose and glucose occurring on fruit surface on the growth of fungi that cause sooty blotch of apple. *Journal of Plant Protection Research*, 44: 287-291
- Wrona B., Gleason M. 2005. Effect of surface amino acids on the growth of *Peltaster fructicola* – fungus associated with sooty blotch complex. *Journal of Plant Protection Research*, 45: 273-278
- Wu J., Gao H., Zhao L., Liao X., Chen F. 2007. Chemical compositional characterization of some apple cultivars. *Food Chemistry*, 103: 88–93
- Zhou T., Northover J., Schneider K. E., Lu X. 2002. Interaction between *Pseudomonas syringae* MA-4 and cyprodinil in the control of blue mold and gray mold of apple. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 24: 154-161
- Zhou T., Yu H., Errampalli D. 2007. Strategies for biological control of fungal diseases of temperate fruits. V: *Biological control of plant diseases*. Vol. 8. Chincholkar S. B., Mukerji K. G. (eds.). New York, The Haworth Press, Inc.: 239-282

ZAHVALA

Javni agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije za financiranje podiplomskega študija in projekta.

Kmetijskemu inštitutu Slovenije za izvedbo raziskovalnega dela.

Mentorju dr. Hansu-Josefu Schroersu za strokovno pomoč in znanje ter za možnost preučevanja še neraziskanega biotehnološkega področja.

Predsednici komisije prof. dr. Branki Javornik in članu komisije prof. dr. Franciju Celarju se iskreno zahvaljujem za neprecenljive nasvete pri strokovnem pregledu dela in slednjemu še za recenzijo doktorske disertacije.

Dr. Alenki Munda in dr. Špeli Velikonja Bolta velja posebna zahvala za strokovno pomoč in nasvete pri biološkem in kemijskem delu doktorata.

Marcu Stadlerju in njegovi ekipi na inštitutu HZI (Helmholtz Centre for Infection Research, Department Microbial Drugs) v Braunschweigu se zahvaljujem za pomoč pri izvedbi iskanja in identifikacije bioaktivnih sekundarnih metabolitov, predstojniku doc. dr. Gregorju Ureku pa gre zahvala, da mi je bilo omogočeno tovrstno raziskovanje v Nemčiji.

Posebna zahvala velja dr. Dušanu Žigonu na Inštitutu Jožef Stefan za takojšnjo pripravljenost, strokovno pomoč in testiranje glivnih ekstraktov s tekočinsko kromatografijo sklopljeno s tandemsko masno spektrometrijo.

Še posebej se zahvaljujem mag. Erihu Skočirju za strokovne nasvete in pomoč ter za njegov neprecenljiv prispevek pri vizualni podobi doktorskega dela.

Zahvaliti se moram tudi mag. Vesni Ješe Janežič z referata za doktorski študij za njene zasluge in nasvete v proceduralnem postopku izpeljave doktorske disertacije.

Ne nazadnje se zahvaljujem kolegici Martini Planinc za pomoč pri statistični obdelavi podatkov, vsem sodelavkam in sodelavcem z Oddelka za varstvo rastlin Kmetijskega inštituta Slovenije, še zlasti Aleksandri Podboj Ronta, Vojku Škerlavaju in Marku Mechori.

PRILOGE

Priloga A

Naprave in pripomočki

Naprave in pripomočki	Proizvajalec
avtoklav A-500/700	Kambič
stereomikroskopska lupa SMZ 800	Nikon
elektronska analitska tehtnica BP 301S	Sartorius
neavtomatska Precizno Elektromehanska Tehnica ET 1111	Tehnica Železniki
laminarna vertikalna komora SMBC 122 A	Iskra Pio d.o.o.
centrifuga 5417	Eppendorf
rastna komora RK – 720 VPC	Kambič
Inkubator IPP500	Memmert
digitalna kamera Sight DS-Fi1	Nikon
rotacijski stresa lnik 95HT	Infrost HT
rotacijski vakuumski evaporator	Heidolph, Nemčija
ultrazvočna kopel Sonorex digital 10p	Bandelin
UHPLC-DAD Agilent 1260 series	Agilent Technologies
TOF – MS Maxis	Bruker
programsko opremo Compass Data Analysis 4.0	Bruker Daltonics
ITMS Amazon	Bruker
Preparativna RF-UHPLC	Agilent Technologies
analitična kolona RF C18 Acquity UPLC BEH dimenzije (2.1 × 50 mm, 1.7 μm)	Waters
analitična kolona VP Nucleodur C18 Gravity 5 μm (250 mm x 21 mm)	Machery-Nagel
svetlobni mikroskop	Carl Zeiss, Nemčija
digitalna kamera Axiocam MRC	Carl Zeiss Vision, Halber. Nemčija
pH meter MP 225K	Mettler Toledo
Magnetni mešalnik Rotamix SHP-10	Tehnica Železniki
Filtrirni papir	Schleicher and Schuell, Nemčija
Preparirna igla	Micro Polo
Pasterjeve pipete	Brand, Nemčija
mikrotitrna plošča s 96 luknjicami	Brand, Nemčija
Objektna stekla (76 x 26 x 1 mm)	Brand, Nemčija
Krovna stekla (20 x 20 mm)	Brand, Nemčija
Steklene čaše	Ilmabor TGI, Nemčija
Števne ploščice Bürker- turk	Brand, Nemčija
Sterilni filter	Sartorius, Nemčija
pipete	Eppendorf, Nemčija
Higrotermometer KMS-P	PAAP, Graz, Avstrija
mikrocentrifugirke	Eppendorf, Nemčija
Tube s pokrovčkom (57 x 16,5 mm)	Sarstedt, Nemčija
Mikrotitrski evaporator Mini Vap	Porvair sciences, Velika Britanija
Stresalnik Titramax 100	Heidolph, Nemčija

Priloga B: Vsi izolati

Št. izolata	takson	Micelij ski tip	Opis	substrat (gostitelj)	država	lokacija	Vzorčevalec	Leto vzorčenja	Glivo izoliral
001/01	<i>Venturia inaequalis</i>			zrela jabolčna lupina	SLO	Brdo pri Lukovici	Mavec R.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
002/01	<i>Venturia inaequalis</i>			zrela jabolčna lupina	SLO	Stari trg pri Ložu,	Žerjav M.	septem., 2009	Medjedović A., okt. 2009
006/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Fly speck	Okrogla, sklerocijem podobna struktura	zrela jabolčna lupina	SLO	Trbovlje	Burja G.	septem., 2009	Medjedović A., okt. 2009
006/02	<i>Microcyclus spora malicola</i>	Fuliginous	Zelen razvejan micelij	zrela jabolčna lupina	SLO	Trbovlje	Burja G.	septem., 2009	Medjedović A., okt. 2009
006/03	<i>Venturia inaequalis</i>			zrela jabolčna lupina	SLO	Trbovlje	Burja G.	septem., 2009	Medjedović A., okt. 2009
007/01	<i>Peltaster</i>	Punctate	Micelij s sklerocijem podobnimi strukturami trosišč	zrela jabolčna lupina	SLO	Trebnje	Schroers H.-J.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
007/02	<i>Peltaster cerophilus</i>	Punctate	Micelij s sklerocijem podobnimi strukturami trosišč	zrela jabolčna lupina	SLO	Trebnje	Schroers H.-J.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
008/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Fly speck	Okrogla, sklerocijem podobna struktura	zrela jabolčna lupina	SLO	Trebnje	Schroers H.-J.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
008/02	<i>Microcyclus sporella mali</i>	Ridged honeycomb	Micelij z grebenasto urejenimi micelijskimi skupki	zrela jabolčna lupina	SLO	Trebnje	Schroers H.-J.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
009/01	<i>Peltaster cerophilus</i>	Punctate	Micelij s sklerocijem podobnimi strukturami trosišč	zrela jabolčna lupina	SLO	Trebnje	Schroers H.-J.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
010/01	<i>Microcyclus spora malicola</i>	Fuliginous	Zelen razvejan micelij	zrela jabolčna lupina	SLO	Trebnje	Schroers H.-J.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
010/02	<i>Peltaster cerophilus</i>	Punctate	Micelij s sklerocijem podobnimi strukturami trosišč	zrela jabolčna lupina	SLO	Trebnje	Schroers H.-J.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
011/01	<i>Peltaster cerophilus</i>	Punctate	Micelij s sklerocijem podobnimi strukturami trosišč	zrela jabolčna lupina	SLO	Trebnje	Schroers H.-J.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009

se nadaljuje ...

nadaljevanje Priloge B: Vsi izolati

Št. izolata	takson	Micelij ski tip	Opis	substrat (gostitelj)	država	lokacija	Vzorčevalec	Leto vzorčenja	Glivo izoliral
011/02	<i>Schizothyrium pomi</i>	Fly speck	Okrogla, sklerocijem podobna struktura	zrela jabolčna lupina	SLO	Trebnje	Schroers H.-J.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
012/01	<i>Venturia inaequalis</i>			zrela jabolčna lupina	SLO	Trbovlje	Burja G.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
013/01	<i>Venturia inaequalis</i>			zrela jabolčna lupina	SLO	Trbovlje	Burja G.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
015/01	<i>Venturia inaequalis</i>			zrela jabolčna lupina	SLO	Podbrezje	Korošec R.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
017/01	<i>Venturia inaequalis</i>			zrela jabolčna lupina	SLO	Podbrezje	Korošec R.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
018/01	<i>Venturia inaequalis</i>			zrela jabolčna lupina	SLO	Podbrezje	Korošec R.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
019/01	<i>Venturia inaequalis</i>			zrela jabolčna lupina	SLO	Podbrezje	Korošec R.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
020/02	<i>Schizothyrium pomi</i>	Fly speck	Okrogla, sklerocijem podobna struktura	zrela jabolčna lupina	SLO	Trbovlje	Burja G.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
021/01	<i>Microcyclosporella mali</i>	Ridget honeycomb,	Micelij z grebenasto urejenimi micelijskimi skupki	zrela jabolčna lupina	SLO	Trbovlje	Burja G.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
021/02	<i>Schizothyrium pomi</i>	Fly speck	Okrogla, sklerocijem podobna struktura	zrela jabolčna lupina	SLO	Trbovlje	Burja G.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
022/02	<i>Schizothyrium pomi</i>	Fly speck	Okrogla, sklerocijem podobna struktura	zrela jabolčna lupina	SLO	Trbovlje	Burja G.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
023/01	<i>Peltaster cerophilus</i>	Punctate	Micelij s sklerocijem podobnimi strukturami trosišč	zrela jabolčna lupina	SLO	Brdo pri Lukovici	Mavec R.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
023/02	<i>Peltaster cerophilus</i>	Punctate	Micelij s sklerocijem podobnimi strukturami trosišč	zrela jabolčna lupina	SLO	Brdo pri Lukovici	Mavec R.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
023/03	<i>Peltaster cerophilus</i>	Punctate	Micelij s sklerocijem podobnimi strukturami trosišč	zrela jabolčna lupina	SLO	Brdo pri Lukovici	Mavec R.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009

se nadaljuje ...

nadaljevanje Priloge B: Vsi izolati									
Št. izolata	takson	Micelij ski tip	Opis	substrat (gostitelj)	država	lokacija	Vzorče- valec	Leto vzorčenja	Glivo izoliral
035/01	<i>Microcyclo sporella mali</i>	Ridged honeycomb	Micelij z grebenasto urejenimi micelijskimi skupki	zrela jabolčna lupina	SLO	Brdo pri Lukovici	Mavec R.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
035/02	<i>Peltaster cerophilus</i>	Punctate	Micelij s sklerocijem podobnimi strukturami trosišč	zrela jabolčna lupina	SLO	Brdo pri Lukovici	Mavec R.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
036/01	<i>Peltaster cerophilus</i>	Punctate	Micelij s sklerocijem podobnimi strukturami trosišč	zrela jabolčna lupina	SLO	Brdo pri Lukovici	Mavec R.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
036/02	<i>Peltaster cerophilus</i>	Punctate	Micelij s sklerocijem podobnimi strukturami trosišč	zrela jabolčna lupina	SLO	Brdo pri Lukovici	Mavec R.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
037/01	<i>Microcyclo sporella mali</i>	Ridged honeycomb	Micelij z grebenasto urejenimi micelijskimi skupki	zrela jabolčna lupina	SLO	Brdo pri Lukovici	Mavec R.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
037/02	<i>Microcyclo sporella mali</i>	Ridged honeycomb	Micelij z grebenasto urejenimi micelijskimi skupki	zrela jabolčna lupina	SLO	Brdo pri Lukovici	Mavec R.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
038/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Fly speck	Okrogla, sklerocijem podobna struktura	zrela jabolčna lupina	SLO	Bela Krajina, Predgrad	Korošec R.	oktober, 2009	Medjedović A., nov. 2009
039/01	<i>Microcyclo sporella mali</i>	Ridged honeycomb	Micelij z grebenasto urejenimi micelijskimi skupki	zrela jabolčna lupina	SLO	Predgrad	Korošec R.	oktober, 2009	Medjedović A., nov. 2009
041/01	<i>Peltaster cerophilus</i>	Punctate	Micelij s sklerocijem podobnimi strukturami trosišč	zrela jabolčna lupina	SLO	Predgrad	Korošec R.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
042/01	<i>Microcyclo spora malicola</i>	Fuliginous (FG)	Zelen razvejan micelij	zrela jabolčna lupina	SLO	Predgrad	Korošec R.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
042/02	<i>Peltaster cerophilus</i>	Punctate	Micelij s sklerocijem podobnimi strukturami trosišč	zrela jabolčna lupina	SLO	Predgrad	Korošec R.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
043/01	<i>Microcyclo spora malicola</i>	Fuliginous (FG)	Zelen razvejan micelij	zrela jabolčna lupina	SLO	Predgrad	Korošec R.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009

nadaljevanje Priloge B: Vsi izolati

Št. izolata	takson	Micelij ski tip	Opis	substrat (gostitelj)	država	lokacija	Vzorčevalec	Leto vzorčenja	Glivo izoliral
043/02	<i>Peltaster cerophilus</i>	Punctate	Micelij s sklerocijem podobnimi strukturami trosišč	zrela jabolčna lupina	SLO	Predgrad	Korošec R.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
044/01	<i>Microcyclosporella mali</i>	Ridged honeycomb	Micelij z grebenasto urejenimi micelijskimi skupki	zrela jabolčna lupina	SLO	Predgrad	Korošec R.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
044/02	<i>Peltaster cerophilus</i>	Punctate	Micelij s sklerocijem podobnimi strukturami trosišč	zrela jabolčna lupina	SLO	Predgrad	Korošec R.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
045/01	<i>Microcyclospora malicola</i>	Fuliginous (FG)	Zelen razvejan micelij	zrela jabolčna lupina	SLO	Predgrad	Korošec R.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
045/02	<i>Peltaster cerophilus</i>	Punctate	Micelij s sklerocijem podobnimi strukturami trosišč	zrela jabolčna lupina	SLO	Predgrad	Korošec R.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
045/03	<i>Peltaster cerophilus</i>	Punctate	Micelij s sklerocijem podobnimi strukturami trosišč	zrela jabolčna lupina	SLO	Predgrad	Korošec R.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
047/02	<i>Peltaster cerophilus</i>	Punctate		zrela jabolčna lupina	SLO	Vas Čeplje	Korošec R.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
048/01	<i>Microcyclosporella mali</i>	Ridged honeycomb	Micelij z grebenasto urejenimi micelijskimi skupki	zrela jabolčna lupina	SLO	Vas Čeplje	Korošec R.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
048/02	<i>Peltaster cerophilus</i>	Punctate	Micelij s sklerocijem podobnimi strukturami trosišč	zrela jabolčna lupina	SLO	Vas Čeplje	Korošec R.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
049/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Fly speck	Okrogla, sklerocijem podobna struktura	zrela jabolčna lupina	SLO	Vesela gora	Schroers H.-J.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
049/02	<i>Microcyclosporella mali</i>	Ridged honeycomb	Micelij z grebenasto urejenimi micelijskimi skupki	zrela jabolčna lupina	SLO	Vesela gora	Schroers H.-J.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
050/01	<i>Peltaster cerophilus</i>	Punctate	Micelij s sklerocijem podobnimi strukturami trosišč	zrela jabolčna lupina	SLO	Vesela gora	Schroers H.-J.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009

se nadaljuje ...

nadaljevanje Priloge B: Vsi izolati

Št. izolata	takson	Micelij ski tip	Opis	substrat (gostitelj)	država	lokacija	Vzorčevalec	Leto vzorčenja	Glivo izoliral
051/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Fly speck	Okrogla, sklerocijem podobna struktura	zrela jabolčna lupina	SLO	Vesela gora	Schroers H.-J.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
052/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Fly speck	Okrogla, sklerocijem podobna struktura	zrela jabolčna lupina	SLO	Vesela gora	Schroers H.-J.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
052/02	<i>Microcyclosporella mali</i>	Ridged honeycomb	Micelij z grebenasto urejenimi micelijскими skupki	zrela jabolčna lupina	SLO	Vesela gora	Schroers H.-J.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
052/03	<i>Peltaster cerophilus</i>	Punctate	Micelij s sklerocijem podobnimi strukturami trosišč	zrela jabolčna lupina	SLO	Vesela gora	Schroers H.-J.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
053/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Fly speck	Okrogla, sklerocijem podobna struktura	zrela lupina kakija	SLO	Nova Gorica	Frank J.	novemb., 2009	Medjedović A., okt. 2009
054/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Fly speck	Okrogla, sklerocijem podobna struktura	zrela lupina kakija	SLO	Nova Gorica	Frank J.	novemb., 2009	Medjedović A., okt. 2009
055/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Fly speck	Okrogla, sklerocijem podobna struktura	zrela lupina kakija	SLO	Nova Gorica	Frank J.	novemb., 2009	Medjedović A., okt. 2009
058/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Fly speck	Okrogla, sklerocijem podobna struktura	zrela lupina kakija	SLO	Bertoki	Modic Š.	novemb., 2009	Medjedović A., okt. 2009
059/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Fly speck	Okrogla, sklerocijem podobna struktura	zrela lupina kakija	SLO	Bertoki	Modic Š.	novemb., 2009	Medjedović A., okt. 2009
060/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Fly speck	Okrogla, sklerocijem podobna struktura	zrela jabolčna lupina	SLO	Limbarska gora (pri Moravčah)	Škerleva j V.	novemb., 2009	Medjedović A., okt. 2009
060/02	<i>Peltaster cerophilus</i>	Punctate	Micelij s sklerocijem podobnimi strukturami trosišč	zrela jabolčna lupina	SLO	Limbarska gora (pri Moravčah)	Škerleva j V.	novemb., 2009	Medjedović A., okt. 2009
062/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Fly speck	Okrogla, sklerocijem podobna struktura	zrela jabolčna lupina	SLO	Limbarska gora (pri Moravčah)	Škerleva j V.	novemb., 2009	Medjedović A., okt. 2009

se nadaljuje ...

nadaljevanje Priloge B: Vsi izolati									
Št. izolata	takson	Micelij ski tip	Opis	substrat (gostitelj)	država	lokacija	Vzorčevalc	Leto vzorčenja	Glivo izoliral
062/02	<i>Peltaster cerophilus</i>	Punctate	Micelij s sklerocijem podobnimi strukturami trosišč	zrela jabolčna lupina	SLO	Limbarska gora (pri Moravčah)	Škerleva J. V.	novemb., 2009	Medjedović A., okt. 2009
063/01	<i>Peltaster cerophilus</i>	Punctate	Micelij s sklerocijem podobnimi strukturami trosišč	zrela jabolčna lupina	SLO	Limbarska gora (pri Moravčah)	Škerleva J. V.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
064/01	<i>Peltaster cerophilus</i>	Punctate	Micelij s sklerocijem podobnimi strukturami trosišč	zrela jabolčna lupina	SLO	Limbarska gora (pri Moravčah)	Škerleva J. V.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
066/01	<i>Peltaster cerophilus</i>	Punctate	Micelij s sklerocijem podobnimi strukturami trosišč	zrela jabolčna lupina	SLO	Vesela gora	Schroers H.-J.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
068/01	<i>Peltaster cerophilus</i>	Punctate	Micelij s sklerocijem podobnimi strukturami trosišč	zrela jabolčna lupina	SLO	Vesela gora	Schroers H.-J.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
068/02	<i>Peltaster cerophilus</i>	Punctate	Micelij s sklerocijem podobnimi strukturami trosišč	zrela jabolčna lupina	SLO	Vesela gora	Schroers H.-J.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
069/01	<i>Microcyclus spora malicola</i>	Fuliginous	Zelen razvejan micelij	zrela jabolčna lupina	SLO	Vesela gora	Schroers H.-J.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
070/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Fly speck	Okrogla, sklerocijem podobna struktura	zrela jabolčna lupina	SLO	Vesela gora	Schroers H.-J.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
070/02	<i>Microcyclus spora malicola</i>	Fuliginous (FG)	Zelen razvejan micelij	zrela jabolčna lupina	SLO	Vesela gora	Schroers H.-J.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
071/01	<i>Microcyclus spora malicola</i>	Fuliginous	Zelen razvejan micelij	zrela jabolčna lupina	SLO	Vesela gora	Schroers H.-J.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
072/01	<i>Microcyclus spora malicola</i>	Fuliginous	Zelen razvejan micelij	zrela jabolčna lupina	SLO	Vesela gora	Schroers H.-J.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
073/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Fly speck	Okrogla, sklerocijem podobna struktura	zrela jabolčna lupina	SLO	Podutik	Medjedović A.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
073/02	<i>Peltaster cerophilus</i>	Punctate	Micelij s sklerocijem podobnimi strukturami trosišč	zrela jabolčna lupina	SLO	Podutik	Medjedović A.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009

se nadaljuje ...

nadaljevanje Priloge B: Vsi izolati

Št. izolata	takson	Micelij ski tip	Opis	substrat (gostitelj)	država	lokacija	Vzorčevalec	Leto vzorčenja	Glivo izoliral
074/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Fly speck	Okrogla, sklerocijem podobna struktura	zrela jabolčna lupina	SLO	Podutik	Medjedović A.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
074/02	<i>Peltaster cerophilus</i>	Punctate	Micelij s sklerocijem podobnimi strukturami trosišč	zrela jabolčna lupina	SLO	Podutik	Medjedović A.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
074/03	<i>Microcyclosporella mali</i>	Ridged honeycomb	Micelij z grebenasto urejenimi micelijskimi skupki	zrela jabolčna lupina	SLO	Podutik	Medjedović A.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
075/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Fly speck	Okrogla, sklerocijem podobna struktura	zrela jabolčna lupina	SLO	Podutik	Medjedović A.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
075/02	<i>Peltaster cerophilus</i>	Punctate	Micelij s sklerocijem podobnimi strukturami trosišč	zrela jabolčna lupina	SLO	Podutik	Medjedović A.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
076/01	<i>Microcyclosporella mali</i>	Ridged honeycomb	Micelij z grebenasto urejenimi micelijskimi skupki	zrela jabolčna lupina	SLO	Podutik	Medjedović A.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
076/02	<i>Peltaster cerophilus</i>	Punctate	Micelij s sklerocijem podobnimi strukturami trosišč	zrela jabolčna lupina	SLO	Podutik	Medjedović A.	oktober, 2009	Medjedović A., okt. 2009
077/01	<i>Microcyclospora malicola</i>	Fuliginous (FG)	Zelen razvejan micelij	zrela jabolčna lupina	SLO	Podutik	Medjedović A.	septem., 2009	Medjedović A., okt. 2009
077/02	<i>Peltaster cerophilus</i>	Punctate	Micelij s sklerocijem podobnimi strukturami trosišč	zrela jabolčna lupina	SLO	Podutik	Medjedović A.	septem., 2009	Medjedović A., okt. 2009
077/03	<i>Peltaster cerophilus</i>	Punctate	Micelij s sklerocijem podobnimi strukturami trosišč	zrela jabolčna lupina	SLO	Podutik	Medjedović A.	septem., 2009	Medjedović A., okt. 2009
077/04	<i>Microcyclosporella mali</i>	Ridged honeycomb	Micelij z grebenasto urejenimi micelijskimi skupki	zrela jabolčna lupina	SLO	Podutik		septem., 2009	Medjedović A., okt. 2009
078/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Fly speck	Okrogla, sklerocijem podobna struktura	zrela jabolčna lupina	Črna gora	Morača	Latinović J.	septem., 2009	Medjedović A., okt. 2010

se nadaljuje ...

nadaljevanje Priloge B: Vsi izolati

Št. izolata	takson	Micelij ski tip	Opis	substrat (gostitelj)	država	lokacija	Vzorčevalc	Leto vzorčenja	Glivo izoliral
099/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Fly speck	Okrogla, sklerocijem podobna struktura	zrela jabolčna lupina	SLO	Poljanska dolina ob Kolpi	Korošec R.	oktober, 2010	Medjedović A., okt. 2010
100/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Fly speck	Okrogla, sklerocijem podobna struktura	zrela jabolčna lupina	SLO	Podutik	Medjedović A.	oktober, 2010	Medjedović A., okt. 2011
100/02	<i>Peltaster cerophilus</i>	Punctate	Micelij s sklerocijem podobnimi strukturami trosišč	zrela jabolčna lupina	SLO	Podutik	Medjedović A.	septem., 2009	Medjedović A., okt. 2011
101/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Fly speck	Okrogla, sklerocijem podobna struktura	zrela jabolčna lupina	SLO	Podutik	Medjedović A.	septem., 2009	Medjedović A., okt. 2011
101/02	<i>Microcyclosporella mali</i>	Ridged honeycomb	Micelij z grebenasto urejenimi micelijskimi skupki	zrela jabolčna lupina	SLO	Podutik	Medjedović A.	septem., 2009	Medjedović A., okt. 2011
102/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Fly speck	Okrogla, sklerocijem podobna struktura	zrela jabolčna lupina	SLO	Podutik	Medjedović A.	septem., 2009	Medjedović A., okt. 2011
102/02	<i>Microcyclosporella mali</i>	Ridged honeycomb	Micelij z grebenasto urejenimi micelijskimi skupki	zrela jabolčna lupina	SLO	Podutik	Medjedović A.	septem., 2009	Medjedović A., okt. 2011
103/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Fly speck	Okrogla, sklerocijem podobna struktura	zrela jabolčna lupina	SLO	Podutik	Medjedović A.	septem., 2009	Medjedović A., okt. 2011
103/02	<i>Microcyclospora malicola</i>	Fuliginous (FG)	Zelen razvejan micelij	zrela jabolčna lupina	SLO	Podutik	Medjedović A.	septem., 2009	Medjedović A., okt. 2011
104/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Fly speck	Okrogla, sklerocijem podobna struktura	zrela jabolčna lupina	SLO	Podutik	Medjedović A.	septem., 2009	Medjedović A., okt. 2011
105/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Fly speck	Okrogla, sklerocijem podobna struktura	zrela jabolčna lupina	SLO	Trebnje	Schroers H.-J.	oktober, 2011	Medjedović A., okt. 2011
105/03	<i>Microcyclosporella mali</i>	Ridged honeycomb	Dolenska_Trebnje	zrela jabolčna lupina	SLO	Trebnje	Schroers H.-J.	oktober, 2011	Medjedović A., okt. 2011
107/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Fly speck	Okrogla, sklerocijem podobna struktura	zrela jabolčna lupina	SLO	Trebnje	Schroers H.-J.	oktober, 2011	Medjedović A., okt. 2011

se nadaljuje ...

nadaljevanje Priloge B: Vsi izolati									
Št. izolata	takson	Micelij ski tip	Opis	substrat (gostitelj)	država	lokacija	Vzorče- valec	Leto vzorčenja	Glivo izoliral
107/02	<i>Peltaster cerophilus</i>	Punctat e	Micelij s sklerocijem podobnimi strukturami trosišč	zrela jabolčna lupina	SLO	Trebnje	Schroers H.-J.	oktober, 2011	Medjedović A., okt. 2011
108/01	<i>Schizothyri um pomi</i>	Fly speck	Okrogla, sklerocijem podobna struktura	zrela jabolčna lupina	SLO	Trebnje	Schroers H.-J.	oktober, 2011	Medjedović A., okt. 2011
109/01	<i>Schizothyri um pomi</i>	Fly speck	Okrogla, sklerocijem podobna struktura	zrela jabolčna lupina	SLO	Trebnje	Schroers H.-J.	oktober, 2011	Medjedović A., okt. 2011
109/02	<i>Peltaster cerophilus</i>	Punctat e	Micelij s sklerocijem podobnimi strukturami trosišč	zrela jabolčna lupina	SLO	Trebnje	Schroers H.-J.	oktober, 2011	Medjedović A., okt. 2011
110/01	<i>Schizothyri um pomi</i>	Fly speck	Okrogla, sklerocijem podobna struktura	zrela jabolčna lupina	SLO	Trebnje	Schroers H.-J.	oktober, 2011	Medjedović A., okt. 2011
110/02	<i>Peltaster cerophilus</i>	Punctat e	Micelij s sklerocijem podobnimi strukturami trosišč	zrela jabolčna lupina	SLO	Trebnje	Schroers H.-J.	oktober, 2011	Medjedović A., okt. 2011
113/01	<i>Peltaster cerophilus</i>	Punctat e	Micelij s sklerocijem podobnimi strukturami trosišč	zrela jabolčna lupina	SLO	Trebnje	Schroers H.-J.	oktober, 2011	Medjedović A., okt. 2011
115/01	<i>Schizothyri um pomi</i>	Fly speck	Okrogla, sklerocijem podobna struktura	zrela jabolčna lupina	SLO	Trebnje	Schroers H.-J.	oktober, 2011	Medjedović A., okt. 2011
115/02	<i>Peltaster cerophilus</i>	Punctat e	Micelij s sklerocijem podobnimi strukturami trosišč	zrela jabolčna lupina	SLO	Trebnje	Schroers H.-J.	oktober, 2011	Medjedović A., okt. 2011
117/01	<i>Schizothyri um pomi</i>	Fly speck	Okrogla, sklerocijem podobna struktura	zrela jabolčna lupina	SLO	Želimplje	Medjed ović A.	oktober, 2011	Medjedović A., okt. 2011
117/02	<i>Peltaster cerophilus</i>	Punctat e	Micelij s sklerocijem podobnimi strukturami trosišč	zrela jabolčna lupina	SLO	Želimplje	Medjed ović A.	oktober, 2011	Medjedović A., okt. 2011
118/01	<i>Schizothyri um pomi</i>	Fly speck		zrela jabolčna lupina	SLO	Želimplje	Medjed ović A.	oktober, 2011	Medjedović A., okt. 2011
119/01	<i>Schizothyri um pomi</i>	Fly speck		zrela jabolčna lupina	SLO	Želimplje	Medjed ović A.	oktober, 2011	Medjedović A., okt. 2011

Št. izolata	takson	Micelij ski tip	Opis	substrat (gostitelj)	država	lokacija	Vzorče- valec	Leto vzorčenja	Glivo izoliral
-------------	--------	-----------------	------	----------------------	--------	----------	---------------	----------------	----------------

se nadaljuje ...

nadaljevanje Priloge B: Vsi izolati									
Št. izolata	takson	Micelij ski tip	Opis	substrat (gostitelj)	država	lokacija	Vzorčevalc	Leto vzorčenja	Glivo izoliral
129/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Fly speck	Okrogla, sklerocijem podobna struktura	zrela jabolčna lupina	SLO	Želimlje	Medjed ovič A.	oktober, 2011	Medjedovič A., okt. 2011
132/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Fly speck	Okrogla, sklerocijem podobna struktura	zrela jabolčna lupina	SLO	Želimlje	Medjed ovič A.	oktober, 2011	Medjedovič A., okt. 2011
132/02	<i>Peltaster cerophilus</i>	Punctate	Micelij s sklerocijem podobnimi strukturami	zrela jabolčna lupina	SLO	Želimlje	Medjed ovič A.	oktober, 2011	Medjedovič A., okt. 2011
133/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Fly speck	Okrogla, sklerocijem podobna struktura	zrela jabolčna lupina	SLO	Želimlje	Medjed ovič A.	oktober, 2011	Medjedovič A., okt. 2011
133/02	<i>Peltaster cerophilus</i>	Punctate	Micelij s sklerocijem podobnimi strukturami	zrela jabolčna lupina	SLO	Želimlje	Medjed ovič A.	oktober, 2011	Medjedovič A., okt. 2011
134/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Fly speck	Okrogla, sklerocijem podobna struktura	zrela jabolčna lupina	SLO	Želimlje	Medjed ovič A.	oktober, 2011	Medjedovič A., okt. 2011
134/02	<i>Peltaster cerophilus</i>	Punctate	Micelij s sklerocijem podobnimi strukturami	zrela jabolčna lupina	SLO	Želimlje	Medjed ovič A.	oktober, 2011	Medjedovič A., okt. 2011
135/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Fly speck	Okrogla, sklerocijem podobna struktura	zrela jabolčna lupina	SLO	Želimlje	Medjed ovič A.	oktober, 2011	Medjedovič A., okt. 2011
135/02	<i>Peltaster cerophilus</i>	Punctate	Micelij s sklerocijem podobnimi strukturami	zrela jabolčna lupina	SLO	Želimlje	Medjed ovič A.	oktober, 2011	Medjedovič A., okt. 2011
142/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Fly speck	Okrogla, sklerocijem podobna struktura	zrela jabolčna lupina	SLO	Spodnje blato, Grosuplje	Medjed ovič A.	oktober, 2011	Medjedovič A., nov. 2011
145/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Fly speck	Okrogla, sklerocijem podobna struktura	zrela jabolčna lupina	SLO	Spodnje blato, Grosuplje	Medjed ovič A.	oktober, 2011	Medjedovič A., nov. 2011
145/02	<i>Microcyclus spora tardicrescens</i>	Fuliginous	Zelen razvejan micelij	zrela jabolčna lupina	SLO	Spodnje blato, Grosuplje	Medjed ovič A.	oktober, 2011	Medjedovič A., nov. 2011
145/03	<i>Microcyclus sporella mali</i>	Ridged honeycomb	Micelij z grebenasto urejenimi micelijskimi skupki	zrela jabolčna lupina	SLO	Spodnje blato, Grosuplje	Medjed ovič A.	oktober, 2011	Medjedovič A., nov. 2011

nadaljevanje Priloge B: Vsi izolati

Št. izolata	takson	Micelij ski tip	Opis	substrat (gostitelj)	država	lokacija	Vzorčevalec	Leto vzorčenja	Glivo izoliral
146/02	<i>Microcyclosporella mali</i>	Ridget honeycomb	Micelij z grebenasto urejenimi micelijskimi skupki	zrela jabolčna lupina	SLO	Spodnje blato, Grosuplje	Medjedović A.	oktober, 2011	Medjedović A., nov. 2011
151/02	<i>Microcyclosporella mali</i>	Ridget honeycomb	Micelij z grebenasto urejenimi micelijskimi skupki	zrela jabolčna lupina	SLO	Spodnje blato, Grosuplje	Medjedović A.	oktober, 2011	Medjedović A., nov. 2011
152/02	<i>Microcyclosporella mali</i>	ridget honeycomb	Micelij z grebenasto urejenimi micelijskimi skupki	zrela jabolčna lupina	SLO	Spodnje blato, Grosuplje	Medjedović A.	oktober, 2011	Medjedović A., nov. 2011
157/02	<i>Microcyclosporella mali</i>	Ridget honeycomb	Micelij z grebenasto urejenimi micelijskimi skupki	zrela jabolčna lupina	SLO	Spodnje blato, Grosuplje	Medjedović A.	oktober, 2011	Medjedović A., nov. 2011
158/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Fly speck	Okrogla, sklerocijem podobna struktura	zrela jabolčna lupina	SLO	Spodnje blato, Grosuplje	Medjedović A.	oktober, 2011	Medjedović A., nov. 2011
158/02	<i>Peltaster cerophilus</i>	Punctate	Micelij s sklerocijem podobnimi strukturami trosišč	zrela jabolčna lupina	SLO	Spodnje blato, Grosuplje	Medjedović A.	oktober, 2011	Medjedović A., nov. 2011
159/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Fly speck	Okrogla, sklerocijem podobna struktura	zrela jabolčna lupina	SLO	Spodnje blato, Grosuplje	Medjedović A.	oktober, 2011	Medjedović A., nov. 2011
159/02	<i>Microcyclosporella mali</i>	Ridget honeycomb	Micelij z grebenasto urejenimi micelijskimi skupki	zrela jabolčna lupina	SLO	Spodnje blato, Grosuplje	Medjedović A.	oktober, 2011	Medjedović A., nov. 2011
160/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Fly speck	Okrogla, sklerocijem podobna struktura	zrela jabolčna lupina	SLO	Spodnje blato, Grosuplje	Medjedović A.	oktober, 2011	Medjedović A., nov. 2011
160/02	<i>Microcyclosporella mali</i>	Ridget honeycomb	Micelij z grebenasto urejenimi micelijskimi skupki	zrela jabolčna lupina	SLO	Spodnje blato, Grosuplje	Medjedović A.	oktober, 2011	Medjedović A., nov. 2011
161/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Fly speck	Okrogla, sklerocijem podobna struktura	zrela jabolčna lupina	SLO	Spodnje blato, Grosuplje	Medjedović A.	oktober, 2011	Medjedović A., nov. 2011
161/02	<i>Microcyclosporella mali</i>	Ridget honeycomb	Micelij z grebenasto urejenimi micelijskimi skupki	zrela jabolčna lupina	SLO	Spodnje blato, Grosuplje	Medjedović A.	oktober, 2011	Medjedović A., nov. 2011

se nadaljuje ...

.....

nadaljevanje Priloge B: Vsi izolati									
Št. izolata	takson	Micelij ski tip	Opis	substrat (gostitelj)	država	lokacija	Vzorčevalec	Leto vzorčenja	Glivo izoliral
176/01	<i>Peltaster cerophilus</i>	Punctate	Micelij s sklerocijem podobnimi strukturami trosišč	zrela jabolčna lupina	SLO	Radeče	Travnikar T.	oktober, 2011	Medjedović A., nov. 2011
179/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Fly speck	Okrogla, sklerocijem podobna struktura	zrela jabolčna lupina	SLO	Želimlje	Travnikar T.	oktober, 2011	Medjedović A., nov. 2011
183/02	<i>Peltaster cerophilus</i>	Punctate	Micelij s sklerocijem podobnimi strukturami trosišč	zrela jabolčna lupina	SLO	Želimlje	Travnikar T.	oktober, 2011	Medjedović A., nov. 2011
183/02	<i>Peltaster cerophilus</i>	Punctate	Micelij s sklerocijem podobnimi strukturami trosišč	zrela jabolčna lupina	SLO	Želimlje	Travnikar T.	oktober, 2011	Medjedović A., nov. 2011
185/02	<i>Peltaster cerophilus</i>	Punctate	Micelij s sklerocijem podobnimi strukturami trosišč	zrela jabolčna lupina	SLO	Želimlje	Travnikar T.	oktober, 2011	Medjedović A., nov. 2011
186/03	<i>Peltaster cerophilus</i>	Punctate	Micelij s sklerocijem podobnimi strukturami trosišč	zrela jabolčna lupina	SLO	Želimlje	Travnikar T.	oktober, 2011	Medjedović A., nov. 2011
187	<i>Colletotrichum fioriniae</i>				SLO	Brdo pri Lukovici	Schroers H.-J.	septem., 2009	Medjedović A., sep. 2011
188	<i>Colletotrichum fioriniae</i>				SLO	Brdo pri Lukovici	Schroers H.-J.	septem., 2009	Medjedović A., sep. 2011
189	<i>Colletotrichum fioriniae</i>				SLO	Brdo pri Lukovici	Schroers H.-J.	septem., 2009	Medjedović A., sep. 2011
190	<i>Colletotrichum fioriniae</i>				SLO	Brdo pri Lukovici	Schroers H.-J.	septem., 2009	Medjedović A., sep. 2011
191	<i>Colletotrichum fioriniae</i>				SLO	Brdo pri Lukovici	Schroers H.-J.	septem., 2009	Medjedović A., sep. 2011
192	<i>Colletotrichum fioriniae</i>				SLO	Brdo pri Lukovici	Schroers H.-J.	septem., 2009	Medjedović A., sep. 2011
193	<i>Fusarium avenaceum</i>				SLO	Brdo pri Lukovici	Schroers H.-J.	septem., 2009	Medjedović A., sep. 2011
194	<i>Fusarium avenaceum</i>				SLO	Brdo pri Lukovici	Schroers H.-J.	septem., 2009	Medjedović A., sep. 2011
195	<i>Fusarium avenaceum</i>				SLO	Brdo pri Lukovici	Schroers H.-J.	septem., 2009	Medjedović A., sep. 2011

Priloga C

Izbrani izolati za test dvojnih kultur

Oznaka izolatov v testu dvojnih kultur	številka izolata	Vrsta	Lokacija	Leto vzorčenja	Vzorčevalec	GenBank NCBI številka nukleotidnega zaporedja
1A	129/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Želimlje	november, 2011	Medjedović A.	GU570543.1
2A	134/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Želimlje	november, 2011	Medjedović A.	GU570543.1
3A	108/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Dolenska Trebnje	oktober, 2011	Schroers H.-J.	GU570543.1
4A	127/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Želimlje	november, 2011	Medjedović A.	GU570543.1
5A	145/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Spodnje blato Grosuplje	november, 2011	Medjedović A.	GU570543.1
6A	062/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Limbarska gora	november, 2009	Škerlavaj V.	GU570543.1
7A	107/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Dolenska Trebnje	oktober, 2011	Schroers H.-J.	GU570543.1
8A	104/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Podutik	oktober, 2011	Medjedović A.	GU570543.1
9A	094	<i>Schizothyrium pomi</i>	Filovci	november, 2010	Trebušak A.	GU570543.1
10A	119/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Želimlje	november, 2011	Medjedović A.	GU570543.1
11A	095/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Filovci	november, 2010	Trebušak A.	GU570543.1
12A	099/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Poljanska dolina ob kolpi	oktober, 2010	Korošec R.	GU570543.1
13A	179/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Želimlje	november, 2011	Medjedović A.	GU570543.1
14A	033/B01_ B02W	<i>Schizothyrium pomi</i>	Brdo pri Lukovici	oktober, 2009	Mavec R.	GU570543.1
15A	097/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Želimlje	november, 2011	Medjedović A.	GU570543.1
16A	090/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Sostro	november, 2010	Lužar S.	GU570543.1
17A	089/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Sostro	november, 2010	Lužar S.	GU570543.1
18A	173/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Radeče	november, 2011	Travnikar T.	EF134949.1
19A	172/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Radeče	november, 2011	Travnikar T.	EF134949.1
20A	171/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Radeče	november, 2011	Travnikar T.	EF134949.1
21A	103/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Podutik	oktober, 2011	Medjedović A.	GU570543.1
22A	125/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Želimlje	november, 2011	Medjedović A.	EF134949.1

se nadaljuje ...

nadaljevanje Priloge C: Izbrani izolati za test dvojnih kultur

Oznaka izolatov v testu dvojnih kultur	številka izolata	Vrsta	Lokacija	Leto vzorčenja	Vzorčevalec	GenBank NCBI številka nukleotidnega zaporedja
23A	100/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Podutik	oktober, 2011	Medjedović A.	GU570543.1
24A	102/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Podutik	oktober, 2011	Medjedović A.	GU570543.1
25A	030/01W	<i>Schizothyrium pomi</i>	Brdo pri Lukovici	oktober, 2009	Mavec R.	EF134949.1
26A	105/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Dolenska Trebnje	oktober, 2011	Schroers H.- J.	GU570543.1
27A	117/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Želimlje	november, 2011	Medjedović A.	EF134949.1
28A	121/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Želimlje	november, 2011	Medjedović A.	EF134949.1
29A	123/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Želimlje	november, 2011	Medjedović A.	EF134949.1
30A	158/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Spodnje blato Grosuplje	november, 2011	Medjedović A.	EF134949.1
31A	165/01	<i>Schizothyrium pomi</i>	Radeče	november, 2011	Travnikar T.	EF134949.1
32A	045/01	<i>Microcyclospora malicola</i>	Bela Krajina (Predgrad)	oktober, 2009	Korošec R.	GU570538.1
33A	021/02	<i>Schizothyrium pomi</i>	Trbovlje	oktober, 2009	Medjedović A.	GU570536.1
34A	044/02	<i>Peltaster cerophilus</i>	Bela Krajina (Predgrad)	oktober, 2009	Korošec R.	JN573674.1
35A	044/01	<i>Microcyclosporella mali</i>	Bela Krajina (Predgrad)	oktober, 2009	Korošec R.	JQ358791.1
36A	119/03	<i>Peltaster cerophilus cerophilus</i>	Želimlje	november, 2011	Medjedović A.	-
37A	161/02	<i>Microcyclosporella mali</i>	Spodnje blato Grosuplje	november, 2011	Medjedović A.	JQ358791.1
38A	049/02	<i>Microcyclosporella mali</i>	Vesela gora	oktober, 2009	Schroers H.-J.	JQ358791.1
39A	045/02	<i>Peltaster cerophilus</i>	Bela Krajina (Predgrad)	oktober, 2009	Korošec R.	JN573674.1
40A	175/02	<i>Microcyclosporella mali</i>	Radeče	november, 2011	Travnikar T.	GU570532.1
41A	117/02	<i>Peltaster cerophilus cerophilus</i>	Želimlje	november, 2011	Medjedović A.	JN573672.1
42A	145/03	<i>Microcyclosporella mali</i>	Spodnje blato Grosuplje	november, 2011	Medjedović A.	JQ358791.1
43A	035/01	<i>Microcyclosporella mali</i>	Brdo pri Lukovici	oktober, 2009	Mavec R.	GU570532.1
44A	152/02	<i>Microcyclosporella mali</i>	Spodnje blato Grosuplje	november, 2011	Medjedović A.	JQ358791.1
45A	042/01	<i>Microcyclospora malicola</i>	Bela Krajina (Predgrad)	oktober, 2009	Korošec R.	GU570538.1

se nadaljuje ...

nadaljevanje Priloge C: Izbrani izolati za test dvojnih kultur

Oznaka izolatov v testu dvojnih kultur	številka izolata	Vrsta	Lokacija	Leto vzorčenja	Vzorčevalec	GenBank NCBI številka nukleotidnega zaporedja
46A	173/03	<i>Microcyclosporella mali</i>	Radeče	november, 2011	Travnikar T.	GU570532.1
47A	043/02	<i>Peltaster cerophilus</i>	Bela Krajina (Predgrad)	oktober, 2009	Korošec R.	JN573674.1
48A	160/02	<i>Microcyclosporella mali</i>	Spodnje blato Grosuplje	november, 2011	Medjedović A.	JQ358791.1
49A	133/02	<i>Peltaster cerophilus</i>	Želimlje	november, 2011	Medjedović A.	GU570543.1
50A	035/02	<i>Peltaster cerophilus</i>	Brdo pri Lukovici	oktober, 2009	Mavec R.	JN573672.1
51A	028/02	<i>Peltaster cerophilus</i>	Brdo pri Lukovici	oktober, 2009	Mavec R.	JN573674.1
52A	165/03	<i>Microcyclosporella mali</i>	Radeče	november, 2011	Travnikar T.	GU570536.1
53A	145/02	<i>Microcyclospora tardicrescens</i>	Spodnje blato Grosuplje	november, 2011	Medjedović A.	GU570541.1
54A	151/02	<i>Microcyclosporella mali</i>	Spodnje blato Grosuplje	november, 2011	Medjedović A.	JQ358791.1
55A	121/03	<i>Peltaster cerophilus</i>	Želimlje	november, 2011	Medjedović A.	JN573674.1
56A	157/02	<i>Microcyclosporella mali</i>	Spodnje blato Grosuplje	november, 2011	Medjedović A.	JQ358791.1
57A	132/02	<i>Peltaster cerophilus</i>	Želimlje	november, 2011	Medjedović A.	JN573674.1
58A	146/02	<i>Microcyclosporella mali</i>	Spodnje blato Grosuplje	november, 2011	Medjedović A.	GU570536.1
59A	159/02	<i>Microcyclosporella mali</i>	Spodnje blato Grosuplje	november, 2011	Medjedović A.	JQ358791.1
60A	110/02	<i>Peltaster cerophilus</i>	Dolenska Trebnje	oktober, 2011	Schroers H.-J.	-
61A	124/02	<i>Peltaster cerophilus</i>	Želimlje	november, 2011	Medjedović A.	JN573674.1 ali JN573673.1
62A	095/02	<i>Peltaster cerophilus</i>	Želimlje	oktober, 2010	Medjedović A.	-
63A	077/02	<i>Peltaster cerophilus</i>	Podutik	oktober, 2010	Medjedović A.	JN573672.1
64A	077/04	<i>Microcyclosporella mali</i>	Podutik	oktober, 2010	Medjedović A.	GU570536.1
65A	183/02	<i>Peltaster cerophilus</i>	Brdo pri Lukovici	november, 2011	Mavec R.	JN573674.1
66A	109/02	<i>Peltaster cerophilus</i>	Dolenska Trebnje	oktober, 2011	Schroers H.-J.	JN573674.1

se nadaljuje ...

nadaljevanje Priloge C: Izbrani izolati za test dvojnih kultur

Oznaka izolatov v testu dvojnih kultur	številka izolata	Vrsta	Lokacija	Leto vzorčenja	Vzorčevalec	GenBank NCBI številka nukleotidnega zaporedja
67A	186/03	<i>Peltaster cerophilus</i>	Brdo pri Lukovici	november, 2011	Mavec R.	JN573674.1
68A	170/02	<i>Microcyclosporella mali</i>	Radeče	november, 2011	Travnikar T.	GU570532.1
69A	100/02	<i>Peltaster cerophilus</i> <i>sp. 1 HJS 2011</i> <i>strain 1.1a</i>	Podutik	september, 2011	Medjedović A.	JN573674.1
70A	105/03	<i>Microcyclosporella mali</i>	Dolenska Trebnje	oktober, 2011	Schroers H.-J.	GU570532.1
71A	010/01	<i>Microcyclospora malicola</i>	Dolenska Trebnje	oktober, 2009	Schroers H.-J.	GU570538.1
72A	026/03	<i>Microcyclospora malicola</i>	Brdo pri Lukovici	oktober, 2009	Mavec R.	GU570538.1
73A	029/01	<i>Microcyclospora malicola</i>	Brdo pri Lukovici	oktober, 2009	Mavec R.	GU570538.1
74A	052/02	<i>Microcyclosporella mali</i>	Vesela gora	oktober, 2009	Schroers H.-J.	JQ358791.1
75A	43/1A	<i>Microcyclospora pomicola</i>	Nemčija	-	Kern S.	GU570540.1
76A	31.1b	<i>Devriesia pseudoamericana</i>	Nemčija	-	Kern S.	GU570527.1
77A	261/07-1	<i>Microcyclosporella mali</i>	Slovenija	-	Frank J.	GU570532.1
78A	026/02	<i>Microcyclosporella mali</i>	Brdo pri Lukovici	oktober, 2009	Mavec R.	GU570531
79A	367/07-3	<i>Microcyclosporella mali</i>	Slovenija	-	Frank J.	GU570536.1
80A	025/02	<i>Microcyclosporella mali</i>	Brdo pri Lukovici	oktober, 2009	Mavec R.	JQ358791.1
81A	408/07	<i>Microcyclosporella mali</i>	Slovenija	-	Frank J.	GU570533.1
82A	407/07	<i>Microcyclosporella mali</i>	Slovenija	-	Frank J.	GU570534.1
83A	029/02	<i>Microcyclosporella mali</i>	Brdo pri Lukovici	oktober, 2009	Mavec R.	JQ358791.1

Priloge D

Meritev radialne rasti patogenih gliv proti izbranim izolatom

Priloga D1

Meritev radialne rasti glive *C. fiorinae* proti izbranim izolatom

Ozna- ka izolata	Radialna rast patogena v testu proti antagonistu (cm)				Radialna rast patogena v nasprotni smeri od antagonista (cm)				% inhib.
	I.	II.	III.	Pov.	I.	II.	III.	Pov.	
A1	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20	0,00
A2	2,20	2,30	2,20	2,23	2,20	2,30	2,20	2,23	0,00
A3	2,30	2,30	2,30	2,30	2,30	2,30	2,30	2,30	0,00
A4	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20	0,00
A5	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20	0,00
A6	2,30	2,30	2,30	2,30	2,30	2,30	2,30	2,30	0,00
A7	2,30	2,30	2,30	2,30	2,30	2,30	2,30	2,30	0,00
A8	2,30	2,30	2,30	2,30	2,30	2,30	2,30	2,30	0,00
A9	2,20	2,30	2,20	2,23	2,20	2,30	2,20	2,23	0,00
A10	2,20	2,20	2,30	2,23	2,20	2,20	2,30	2,23	0,00
A11	2,30	2,30	2,20	2,27	2,30	2,30	2,20	2,27	0,00
A12	2,20	2,20	2,30	2,23	2,20	2,20	2,30	2,23	0,00
A13	2,20	2,30	2,20	2,23	2,20	2,30	2,20	2,23	0,00
A14	2,20	2,20	2,30	2,23	2,20	2,20	2,30	2,23	0,00
A15	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20	0,00
A16	2,30	2,30	2,30	2,30	2,30	2,30	2,30	2,30	0,00
A17	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20	0,00
A18	2,30	2,30	2,30	2,30	2,30	2,30	2,30	2,30	0,00
A19	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20	0,00
A20	2,30	2,30	2,30	2,30	2,30	2,30	2,30	2,30	0,00
A21	2,10	2,20	2,20	2,17	2,10	2,20	2,20	2,17	0,00
A22	2,30	2,1	2,20	2,20	2,30	2,10	2,20	2,20	0,00
A23	2,20	2,2	2,30	2,23	2,20	2,20	2,30	2,23	0,00
A24	2,10	2,1	2,10	2,10	2,10	2,10	2,10	2,10	0,00
A25	2,40	2,1	2,20	2,23	2,40	2,10	2,20	2,23	0,00
A26	2,20	2,2	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20	0,00
A27	2,30	2,3	2,30	2,30	2,30	2,30	2,30	2,30	0,00
A28	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20	0,00
A29	2,30	2,30	2,30	2,30	2,30	2,30	2,30	2,30	0,00
A30	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20	0,00
A31	2,60	2,45	2,30	2,45	2,60	2,45	2,30	2,45	0,00
A32	3,00	3,00	3,20	3,07	3,00	3,00	3,20	3,07	0,00
A33	3,00	2,80	2,90	2,90	3,00	2,80	2,90	2,90	0,00
A34	2,95	3,00	3,05	3,00	2,95	3,00	3,05	3,00	0,00
A35	3,05	3,00	2,95	3,00	3,05	3,00	2,95	3,00	0,00
A36	3,00	3,10	3,05	3,05	3,00	3,10	3,05	3,05	0,00
A37	3,15	3,00	3,00	3,05	3,15	3,00	3,00	3,05	0,00
A38	2,90	2,80	3,10	3,93	2,90	2,80	3,10	2,93	0,00
A39	2,95	2,90	2,75	2,87	2,95	2,90	2,75	2,87	0,00
A40	2,90	2,85	2,90	2,88	2,90	2,85	2,90	2,88	0,00
A41	3,00	3,10	-	3,05	3,00	3,10	-	3,05	0,00
A42	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	0,00
A43	2,90	3,00	3,10	3,00	2,90	3,00	3,10	3,00	0,00

se nadaljuje ...

nadaljevanje Priloge D1: Meritev radialne rasti glive *C. fiorinae* proti izbranim izolatom

[illegible]

Priloga D2

Meritev radialne rasti patogene glive *Fusarium avenaceum* proti izbranim izolatom

Oznaka izolata	Radialna rast patogena v testu proti antagonistu (cm)				Radialna rast patogena v nasprotno smer od antagonistista (cm)			
	I.	II.	III.	Pov.	I.	II.	III.	Pov.
A1	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20
A2	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20
A3	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20
A4	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20
A5	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20
A6	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20
A7	4,00	4,00	4,00	4,20	4,00	4,00	4,00	4,20
A8	4,00	4,00	4,00	4,20	4,00	4,00	4,00	4,20
A9	4,00	4,00	4,00	4,20	4,00	4,00	4,00	4,20
A10	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20
A11	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20
A12	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20
A13	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20
A14	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20
A15	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20
A16	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20
A17	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20
A18	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20
A19	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20
A20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20
A21	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20
A22	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20
A23	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20
A24	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20
A25	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20
A26	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20
A27	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20
A28	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20
A29	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20
A30	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20
A31	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20
A32	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20
A33	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20
A34	4,00	4,00	4,00	4,20	4,00	4,00	4,00	4,20
A35	4,00	4,00	4,00	4,20	4,00	4,00	4,00	4,20
A36	4,00	4,00	4,00	4,20	4,00	4,00	4,00	4,20
A37	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20
A38	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20
A39	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20
A40	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20
A41	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20
A42	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20
A43	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20
A44	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20
A45	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20
A46	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20
A47	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20
A48	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20

se nadaljuje ...

nadaljevanje Priloge D2: Meritev radialne rasti patogene glive *F. avenaceum* proti izbranim izolatom

[illegible]

Priloga D3

Meritev radialne rasti patogene glive *B. cinerea* proti izbranim izolatom

Oznaka izolata	Radialna rast patogena v testu proti antagonistu (cm)				Radialna rast patogena v nasprotni smeri od antagonist (cm)			
	I.	II.	III.	Pov.	I.	II.	III.	Pov.
A1	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70
A2	2,90	2,70	2,70	2,00	2,90	2,70	2,70	2, 00
A3	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70
A4	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70
A5	2,80	2,80	2,70	2,77	2,80	2,80	2,70	2,77
A6	2,70	2,60	2,70	2,00	2,700	2,60	2,70	2, 00
A7	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70
A8	2,80	2,80	2,80	2,80	2,80	2,80	2,80	2,80
A9	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70
A10	3,10	3,00	3,00	3,00	3,10	3,00	3,00	2,70
A11	2,90	2,70	2,80	2,00	2,90	2,70	2,80	2, 00
A12	2,70	2,70	2,70	2,70	2,700	2,70	2,70	2,70
A13	2,70	2,70	2,70	2,70	2,700	2,70	2,70	2,70
A14	2,60	2,70	2,70	2,00	2,60	2,70	2,70	2, 00
A15	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70
A16	2,70	2,70	2,700	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70
A17	2,80	2,70	2,80	2,00	2,80	2,70	2,80	2, 00
A18	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70
A19	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70
A20	2,70	2,80	2,90	2,00	2,70	2,80	2,90	2, 00
A21	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	-
A22	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70
A23	2,90	2,90	2,90	2,90	2,90	2,90	2,90	2,90
A24	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70
A25	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
A26	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70
A27	2,70	2,70	2,70	2,70	2,700	2,70	2,70	2,70
A28	2,90	2,90	2,90	2,90	2,900	2,90	2,90	2,90
A29	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70
A30	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70
A31	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70
A32	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70
A33	2,70	2,70	2,70	2,7	2,70	2,70	2,70	2,70
A34	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70
A35	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70
A36	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70
A37	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70
A38	2,80	2,800	2,80	2,80	2,80	2,80	2,80	2,80
A39	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70
A40	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70
A41	2,70	2,80	2,80	2,77	2,70	2,80	2,80	2,77
A42	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70
A43	2,90	2,900	2,90	2,90	2,90	2,90	2,90	2,90
A44	2,70	2,80	2,70	2,00	2,70	2,80	2,70	2, 00
A45	2,90	2,90	2,90	2,90	2,90	2,90	2,90	2,90
A46	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70
A47	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70
A48	2,80	2,70	2,70	2,73	2,80	2,70	2,70	2,73

se nadaljuje ...

nadaljevanje Priloge D3: Meritev radialne rasti patogene glive *B. cinerea* proti izbranim izolatom

Oznaka izolata	Radialna rast patogena v testu proti antagonistu (cm)				Radialna rast patogena v nasprotni smeri od antagonistu (cm)			
	I.	II.	III.	Pov.	I.	II.	III.	Pov.
A49	2,90	2,80	2,70	2,00	2,90	2,80	2,70	2,00
A50	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70
A51	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,7	2,70	2,70
A52	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,7	2,70	2,70
A53	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,0	3,00	3,00
A54	3,00	3,00	3,10	-	3,00	3,00	3,10	-
A55	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70
A56	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70
A57	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70
A58	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70
A59	2,80	2,80	2,80	2,80	2,80	2,80	2,80	2,80
A60	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70
A61	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70
A62	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70
A63	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70
A64	2,80	2,70	2,70	2,73	2,80	2,70	2,70	2,73
A65	2,700	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70
A66	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70
A67	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70
A68	2,90	2,90	2,90	2,90	2,90	2,90	2,90	2,90
A69	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70
A70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70
A71	2,80	2,80	2,80	2,80	2,80	2,80	2,80	2,80
A72	2,80	2,80	2,80	2,80	2,80	2,80	2,80	2,80
A73	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70
A74	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70
A75	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70
A76	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70
A77	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
A78	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70
A79	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70
A80	3,00	3,00	3,00	3,00	3,000	3,00	3,00	3,00
A81	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70
A82	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70
A83	2,80	2,80	2,70	2,77	2,80	2,80	2,70	2,77

Priloge E

Meritev radialne rasti glive *Venturia inaequalis* po 14, 21 in 35 dnevih inkubacije

Priloga E1

Meritev radialne rasti glive *Venturia inaequalis* po 14 dnevih inkubacije

Ozna- ka izolata	Radialna rast patogena v testu proti antagonistu (cm)				Radialna rast patogena v nasprotni smeri od antagonista (cm)				% inhibi cije
	I.	II.	III.	Pov.	I.	II.	III.	Pov.	
A1	0,20	0,30	0,25	0,25	0,30	0,30	0,30	0,30	16,67
A2	0,30	0,25	0,20	0,25	0,30	0,25	0,25	0,27	7,41
A3	0,35	0,20	0,20	0,25	0,30	0,25	0,25	0,27	7,41
A4	0,15	0,20	0,15	0,17	0,15	0,20	0,30	0,22	22,73
A5	0,20	0,15	0,25	0,20	0,20	0,20	0,30	0,23	13,04
A6	0,25	0,15	0,25	0,22	0,30	0,25	0,30	0,28	21,43
A7	0,30	0,20	0,20	0,23	0,30	0,30	0,30	0,30	23,33
A8	0,15	0,20	0,20	0,18	0,15	0,20	0,20	0,18	0,00
A9	0,20	0,20	0,20	0,20	0,25	0,25	0,25	0,25	20,00
A10	0,25	0,15	0,20	0,20	0,30	0,15	0,25	0,23	13,04
A11	0,15	0,15	0,10	0,13	0,15	0,15	0,10	0,13	0,00
A12	0,40	0,35	0,35	0,37	0,40	0,40	0,40	0,40	7,50
A13	0,40	0,45	0,35	0,40	0,40	0,45	0,35	0,40	0,00
A14	0,35	0,40	0,40	0,38	0,40	0,40	0,35	0,38	0,00
A15	0,25	0,30	0,30	0,28	0,30	0,25	0,3	0,28	0,00
A16	0,15	0,20	0,20	0,18	0,20	0,20	0,30	0,23	13,04
A17	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,00
A18	0,20	0,25	0,15	0,20	0,20	0,25	0,15	0,20	0,00
A19	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,30	0,23	13,04
A20	0,30	0,20	0,25	0,25	0,35	0,25	0,25	0,28	10,71
A21	0,15	0,20	0,10	0,15	0,20	0,20	0,10	0,17	11,76
A22	0,25	0,20	0,25	0,23	0,25	0,30	0,25	0,27	14,81
A23	0,20	0,20	0,15	0,18	0,20	0,20	0,15	0,18	0,00
A24	0,15	0,20	0,10	0,15	0,15	0,20	0,10	0,15	0,00
A25	0,15	0,20	0,10	0,15	0,15	0,20	0,10	0,15	0,00
A26	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,25	0,22	9,09
A27	0,20	0,30	0,20	0,23	0,20	0,30	0,20	0,23	0,00
A28	0,20	0,20	0,15	0,18	0,20	0,20	0,15	0,18	0,00
A29	0,15	0,15	0,20	0,17	0,15	0,15	0,20	0,17	0,00
A30	0,15	0,15	0,10	0,13	0,15	0,15	0,10	0,13	0,00
A31	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,00
A32	0,25	0,30	0,30	0,28	0,30	0,25	0,3	0,28	0,00
A33	0,35	0,40	0,40	0,38	0,40	0,40	0,35	0,38	0,00
A34	0,40	0,35	0,45	0,40	0,45	0,45	0,45	0,45	11,11
A35	0,45	0,40	0,40	0,42	0,45	0,40	0,40	0,42	0,00
A36	0,40	0,35	0,35	0,37	0,40	0,40	0,40	0,40	7,50
A37	0,40	0,35	0,35	0,37	0,40	0,40	0,40	0,40	7,50
A38	0,40	0,45	0,30	0,38	0,45	0,45	0,35	0,42	9,52
A39	0,50	0,50	0,40	0,47	0,50	0,50	0,45	0,48	2,10
A40	0,40	0,45	0,35	0,40	0,40	0,45	0,35	0,40	0,00
A41	0,40	0,35	0,35	0,37	0,40	0,40	0,35	0,38	2,63
A42	0,40	0,30	0,40	0,37	0,40	0,30	0,40	0,37	0,00

se nadaljuje ...

nadaljevanje Priloge E1: Meritev radialne rasti glive *V. inaequalis* po 14 dnevih inkubacije

Ozna- ka izolata	Radialna rast patogena v testu proti antagonistu (cm)				Radialna rast patogena v nasprotni smeri od antagonista (cm)				% inhibi cije
	I.	II.	III.	Pov.	I.	II.	III.	Pov.	
A43	0,50	0,45	0,40	0,45	0,50	0,45	0,40	0,45	0,00
A44	0,35	0,35	0,35	0,35	0,40	0,35	0,40	0,38	7,90
A45	0,15	0,20	0,15	0,17	0,20	0,20	0,15	0,18	5,56
A46	0,40	0,40	0,35	0,38	0,40	0,40	0,40	0,40	5,00
A47	0,35	0,40	0,40	0,38	0,40	0,40	0,40	0,40	5,00
A48	0,40	0,35	0,35	0,37	0,40	0,40	0,40	0,40	8,11
A49	0,15	0,10	0,10	0,12	0,10	0,20	0,15	0,15	20,00
A50	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,50	0,35	0,42	5,00
A51	0,45	0,50	0,60	0,52	0,45	0,50	0,60	0,52	0,00
A52	0,35	0,40	0,40	0,38	0,30	0,40	0,50	0,40	5,00
A53	0,40	0,35	0,35	0,37	0,40	0,35	0,35	0,37	0,00
A54	0,35	0,40	0,40	0,38	0,45	0,40	0,40	0,42	9,52
A55	0,45	0,40	0,40	0,42	0,45	0,40	0,40	0,42	0,00
A56	0,35	0,40	0,30	0,35	0,35	0,40	0,30	0,35	0,00
A57	0,30	0,35	0,40	0,35	0,40	0,45	0,40	0,42	16,67
A58	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,00
A59	0,35	0,40	0,35	0,37	0,35	0,40	0,35	0,37	0,00
A60	0,35	0,35	0,50	0,40	0,40	0,35	0,50	0,42	4,76
A61	0,35	0,35	0,30	0,33	0,35	0,35	0,30	0,33	0,00
A62	0,30	0,30	0,25	0,28	0,30	0,30	0,25	0,28	0,00
A63	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,00
A64	0,15	0,10	0,10	0,12	0,15	0,10	0,10	0,12	0,00
A65	0,10	0,30	0,20	0,20	0,10	0,30	0,20	0,20	0,00
A66	0,40	0,40	0,35	0,38	0,40	0,40	0,35	0,38	0,00
A67	0,40	0,50	0,40	0,43	0,40	0,50	0,40	0,43	0,00
A68	0,30	0,35	0,40	0,35	0,30	0,35	0,40	0,35	0,00
A69	0,20	0,20	0,30	0,23	0,20	0,20	0,30	0,23	0,00
A70	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,00
A71	0,40	0,35	0,40	0,38	0,40	0,35	0,40	0,38	0,00
A72	0,20	0,40	0,30	0,30	0,20	0,40	0,30	0,30	0,00
A73	0,20	0,30	0,20	0,23	0,20	0,30	0,20	0,23	0,00
A74	0,45	0,10	0,40	0,32	0,45	0,10	0,40	0,32	0,00
A75	0,35	0,15	0,30	0,27	0,35	0,15	0,30	0,27	0,00
A76	0,40	0,50	0,40	0,43	0,40	0,50	0,40	0,43	0,00
A77	0,35	0,30	0,35	0,33	0,35	0,30	0,35	0,33	0,00
A78	0,45	0,45	0,40	0,43	0,45	0,45	0,40	0,43	0,00
A79	0,35	0,50	0,45	0,43	0,35	0,50	0,45	0,43	0,00
A80	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,00
A81	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,00
A82	0,50	0,60	0,50	0,53	0,50	0,60	0,50	0,53	0,00
A83	0,40	0,50	0,45	0,45	0,40	0,50	0,45	0,45	0,00

Priloga E2

Meritev radialne rasti glive *Venturia inaequalis* po 21 dnevih inkubacije

Oznaka izolata	Radialna rast patogena v testu proti antagonistu (cm)				Radialna rast patogena v nasprotni smeri od antagonista (cm)				% inhibicije
	I.	II.	III.	Pov.	I.	II.	III.	Pov.	
A1	0,30	0,40	0,40	0,37	0,40	0,45	0,45	0,43	13,95
A2	0,40	0,40	0,30	0,37	0,40	0,45	0,35	0,40	7,50
A3	0,50	0,50	0,40	0,47	0,50	0,40	0,50	0,47	0,00
A4	0,25	0,40	0,30	0,32	0,30	0,40	0,50	0,40	12,50
A5	0,35	0,30	0,45	0,37	0,35	0,30	0,45	0,37	0,00
A6	0,45	0,30	0,35	0,37	0,45	0,50	0,45	0,47	21,27
A7	0,40	0,30	0,40	0,37	0,40	0,40	0,45	0,42	11,90
A8	0,30	0,40	0,35	0,35	0,30	0,40	0,35	0,35	0,00
A9	0,30	0,40	0,25	0,32	0,50	0,40	0,35	0,42	23,81
A10	0,30	0,20	0,30	0,27	0,35	0,20	0,35	0,30	10,00
A11	0,10	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,00
A12	0,50	0,50	0,50	0,50	0,65	0,55	0,70	0,63	20,63
A13	0,50	0,70	0,60	0,60	0,50	0,70	0,60	0,60	0,00
A14	0,50	0,60	0,55	0,55	0,50	0,65	0,50	0,55	0,00
A15	0,40	0,40	0,35	0,38	0,40	0,40	0,35	0,38	0,00
A16	0,40	0,25	0,40	0,35	0,40	0,25	0,40	0,35	0,00
A17	0,45	0,40	0,40	0,42	0,45	0,40	0,40	0,42	0,00
A18	0,30	0,50	0,30	0,37	0,30	0,50	0,30	0,37	0,00
A19	0,40	0,30	0,30	0,33	0,30	0,30	0,40	0,33	0,00
A20	0,40	0,30	0,40	0,37	0,40	0,40	0,30	0,37	0,00
A21	0,30	0,30	0,20	0,27	0,35	0,30	0,20	0,28	3,57
A22	0,35	0,40	0,40	0,38	0,40	0,40	0,40	0,40	2,00
A23	0,20	0,40	0,20	0,27	0,30	0,40	0,30	0,33	18,18
A24	0,25	0,25	0,20	0,23	0,25	0,25	0,20	0,23	0,00
A25	0,30	0,35	0,25	0,30	0,30	0,35	0,25	0,30	0,00
A26	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,3	0,27	7,41
A27	0,25	0,35	0,25	0,28	0,25	0,35	0,25	0,28	0,00
A28	0,20	0,15	0,30	0,22	0,20	0,20	0,25	0,22	0,00
A29	0,30	0,20	0,15	0,22	0,30	0,30	0,15	0,25	12,00
A30	0,10	0,20	0,20	0,17	0,2	0,20	0,20	0,20	15,00
A31	0,20	0,20	0,80	0,40	0,20	0,20	0,80	0,40	0,00
A32	0,40	0,40	0,35	0,38	0,40	0,40	0,35	0,38	0,00
A33	0,50	0,60	0,55	0,55	0,50	0,65	0,50	0,55	0,00
A34	0,50	0,50	0,60	0,53	0,70	0,60	0,65	0,65	18,46
A35	0,50	0,55	0,40	0,48	0,50	0,55	0,40	0,48	0,00
A36	0,50	0,50	0,50	0,50	0,65	0,55	0,70	0,63	20,63
A37	0,50	0,50	0,60	0,53	0,60	0,60	0,60	0,60	11,67
A38	0,65	0,70	0,55	0,63	0,60	0,70	0,60	0,63	0,00
A39	0,60	0,60	0,60	0,60	0,95	1,05	0,95	0,98	38,78
A40	0,50	0,70	0,60	0,60	0,50	0,70	0,60	0,60	0,00
A41	0,45	0,40	0,50	0,45	0,55	0,65	0,90	0,70	35,72
A42	0,45	0,40	0,45	0,43	0,50	0,50	0,60	0,53	18,87
A43	0,70	0,70	0,70	0,70	0,60	0,65	1,0	0,75	6,67
A44	0,70	0,45	0,50	0,55	0,70	0,60	0,70	0,67	17,91
A45	0,30	0,25	0,30	0,28	0,25	0,40	0,30	0,32	12,5
A46	0,50	0,50	0,50	0,50	0,55	0,65	0,60	0,60	16,67
A47	0,50	0,65	0,60	0,58	0,70	0,65	0,70	0,68	14,71

se nadaljuje ...

nadaljevanje Priloge E2: Meritev radialne rasti glive *V. inaequalis* po 21 dnevih inkubacije

Oznaka izolata	Radialna rast patogena v testu proti antagonistu (cm)				Radialna rast patogena v nasprotni smeri od antagonista (cm)				% inhibicije
	I.	II.	III.	Pov.	I.	II.	III.	Pov.	
A48	0,50	0,50	0,40	0,47	0,50	0,50	0,45	0,48	1,00
A49	0,20	0,30	0,30	0,27	0,30	0,30	0,30	0,30	10,00
A50	0,45	0,40	0,50	0,45	0,65	0,65	0,70	0,67	32,84
A51	0,60	0,70	0,60	0,63	0,70	0,80	0,75	0,75	16,00
A52	0,60	0,60	0,50	0,57	0,60	0,75	0,60	0,65	12,31
A53	0,50	0,50	0,60	0,53	0,50	0,50	0,60	0,53	0,00
A54	0,65	0,65	0,60	0,63	0,60	0,70	0,65	0,65	3,08
A55	0,55	0,65	0,50	0,57	0,70	0,70	0,80	0,73	21,92
A56	0,70	0,50	0,90	0,70	0,70	0,50	0,90	0,70	0,00
A57	0,50	0,60	0,50	0,53	0,60	0,70	0,60	0,73	27,40
A58	0,70	0,75	0,70	0,72	0,70	0,75	0,70	0,72	0,00
A59	0,80	0,60	0,70	0,70	0,80	0,60	0,70	0,70	0,00
A60	0,50	0,60	0,50	0,53	0,60	0,85	0,50	0,65	18,46
A61	0,40	0,40	0,50	0,47	0,50	0,65	0,60	0,58	18,97
A62	0,10	0,50	0,50	0,37	0,50	0,50	0,50	0,50	26,00
A63	0,20	0,10	0,20	0,17	0,20	0,10	0,20	0,17	0,00
A64	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,00
A65	0,20	0,30	0,30	0,27	0,20	0,30	0,30	0,27	0,00
A66	0,50	0,50	0,50	0,50	0,60	0,60	0,65	0,62	19,35
A67	0,70	0,70	0,70	0,70	0,90	0,70	0,88	0,83	15,66
A68	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,00
A69	0,35	0,30	0,25	0,30	0,35	0,30	0,25	0,30	0,00
A70	0,60	0,60	0,65	0,62	0,60	0,60	0,65	0,62	0,00
A71	0,50	0,60	0,60	0,57	0,50	0,60	0,80	0,63	9,52
A72	0,55	0,35	0,50	0,47	0,55	0,35	0,50	0,47	0,00
A73	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,00
A74	0,60	0,60	0,30	0,50	0,60	0,60	0,30	0,50	0,00
A75	0,50	0,50	0,20	0,40	0,50	0,50	0,20	0,40	0,00
A76	0,80	0,70	0,70	0,73	0,80	0,70	0,70	0,73	0,00
A77	0,60	0,55	0,65	0,60	0,60	0,55	0,65	0,60	0,00
A78	0,60	0,60	0,70	0,63	0,60	0,60	0,70	0,63	0,00
A79	0,60	0,70	0,70	0,67	0,60	0,70	0,70	0,67	0,00
A80	0,50	0,45	0,40	0,45	0,50	0,45	0,40	0,45	0,00
A81	0,55	0,60	0,60	0,58	0,55	0,60	0,60	0,58	0,00
A82	0,70	0,70	0,70	0,70	0,60	0,80	0,70	0,70	0,00
A83	0,70	0,70	0,65	0,68	0,70	0,70	0,65	0,68	0,00

Priloga E3

Meritev radialne rasti glive *Venturia inaequalis* po 35 dnevih inkubacije

Ozn. izol.	Radialna rast patogena v testu proti antagonistu (cm)				Radialna rast patogena v nasprotni smeri od antagonista (cm)				% inhibicije
	I.	II.	III.	Pov.	I.	II.	III.	Pov.	
A1	0,90	0,90	0,80	0,87	0,90	0,90	0,80	0,87	0,00
A2	0,90	0,90	0,80	0,87	0,90	0,90	0,80	0,87	0,00
A3	1,0	0,90	0,90	0,93	1,0	0,90	0,90	0,93	0,00
A4	0,60	0,85	0,65	0,70	0,60	0,85	0,65	0,70	0,00
A5	0,80	0,85	0,90	0,85	0,80	0,85	0,90	0,85	0,00
A6	0,90	0,80	0,90	0,87	0,90	0,80	0,90	0,87	0,00
A7	0,90	0,80	0,80	0,83	0,90	0,80	0,80	0,83	0,00
A8	0,80	0,70	0,60	0,70	0,80	0,70	0,60	0,70	0,00
A9	0,70	0,60	0,70	0,67	0,70	0,60	0,70	0,67	0,00
A10	0,30	0,30	0,40	0,33	0,30	0,30	0,40	0,33	0,00
A11	0,50	0,40	0,50	0,47	0,50	0,40	0,50	0,47	0,00
A12	0,80	0,85	0,75	0,80	1,10	0,90	1,10	1,00	20,00
A13	0,90	1,40	0,80	1,03	0,90	1,40	0,80	1,03	0,00
A14	1,00	0,90	0,90	0,93	1,00	0,90	0,90	0,93	0,00
A15	0,70	0,50	0,60	0,60	0,70	0,50	0,60	0,60	0,00
A16	0,70	0,40	0,50	0,53	0,70	0,40	0,50	0,53	0,00
A17	0,75	0,70	0,90	0,78	0,75	0,70	0,9	0,78	0,00
A18	0,50	0,80	0,40	0,57	0,50	0,80	0,40	0,57	0,00
A19	0,70	0,40	0,80	0,63	0,70	0,40	0,80	0,63	0,00
A20	0,40	0,60	0,70	0,57	0,40	0,60	0,70	0,57	0,00
A21	0,30	0,50	1,0	0,60	0,30	0,50	1,0	0,60	0,00
A22	1,0	1,5	1,25	1,25	1,0	1,5	1,25	1,25	0,00
A23	0,60	0,8	0,50	0,63	0,60	0,80	0,50	0,63	0,00
A24	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,00
A25	0,70	0,65	0,75	0,70	0,70	0,65	0,75	0,70	0,00
A26	0,45	0,60	0,53	0,53	0,45	0,60	0,80	0,62	14,52
A27	0,60	0,50	0,5	0,53	0,60	0,50	0,50	0,53	0,00
A28	0,50	0,40	0,40	0,43	0,50	0,40	0,40	0,43	0,00
A29	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,00
A30	0,50	0,40	0,50	0,47	0,50	0,40	0,50	0,47	0,00
A31	0,50	0,60	0,55	0,55	0,50	0,60	0,55	0,55	0,00
A32	0,40	0,50	0,60	0,50	0,70	0,50	0,60	0,60	16,67
A33	1,0	0,90	0,90	0,93	1,0	0,90	0,90	0,93	0,00
A34	0,60	0,70	0,90	0,73	1,2	1,40	1,40	1,33	45,11
A35	0,90	1,10	1,20	1,07	0,90	1,10	1,20	1,07	0,00
A36	0,80	0,85	0,70	0,78	1,40	1,00	1,40	1,27	38,58
A37	1,0	1,0	1,40	1,13	1,00	1,00	1,40	1,13	0,00
A38	1,20	1,50	1,00	1,23	1,20	1,50	1,00	1,23	0,00
A39	0,90	0,85	0,80	0,85	1,70	1,50	1,50	1,57	45,86
A40	0,90	1,40	0,80	1,03	0,90	1,40	0,80	1,03	0,00
A41	0,60	0,60	0,60	0,60	1,10	1,00	1,40	1,17	48,72
A42	0,80	0,70	0,70	0,73	0,80	0,90	0,90	0,87	16,09
A43	1,60	1,00	1,20	1,27	1,60	1,00	1,20	1,27	0,00
A44	1,20	1,10	1,20	1,17	1,20	1,10	1,20	1,17	0,00
A45	0,50	0,40	0,44	0,43	0,40	0,70	0,60	0,57	24,56
A46	0,90	0,60	0,60	0,70	0,90	1,20	1,30	1,13	38,05
A47	0,90	0,80	0,90	0,87	1,25	1,20	1,40	1,28	32,03

se nadaljuje ...

nadaljevanje Priloge E3: Meritev radialne rasti glive *V. inaequalis* po 35 dnevih inkubacij

Ozn. izol.	Radialna rast patogena v testu proti antagonistu (cm)				Radialna rast patogena v nasprotni smeri od antagonista (cm)				% inhibi cije
	I.	II.	III.	Pov.	I.	II.	III.	Pov.	
A48	1,30	0,90	0,80	1,00	1,30	0,90	0,80	1,00	0,00
A49	0,50	0,40	0,30	0,40	0,50	0,40	0,30	0,40	0,00
A50	0,65	0,80	0,70	0,72	1,30	1,10	1,10	1,17	38,46
A51	0,80	0,90	0,80	0,83	1,50	1,50	1,60	1,53	45,75
A52	1,00	1,20	0,90	1,03	1,00	1,20	0,90	1,03	0,00
A53	1,00	1,00	1,40	1,13	1,00	1,00	1,40	1,13	0,00
A54	1,10	1,30	1,20	1,20	1,10	1,30	1,20	1,20	0,00
A55	0,70	0,60	0,60	0,63	1,10	1,50	1,20	1,27	50,39
A56	1,40K	1,50	0,90	1,27	1,40	1,50	0,90	1,27	0,00
A57	0,80	0,90	0,80	0,83	1,10	1,10	1,20	1,13	26,55
A58	1,20	1,30	1,40	1,30	1,20	1,30	1,40	1,30	0,00
A59	1,10	1,20	1,20	1,17	1,10	1,20	1,20	1,17	0,00
A60	0,90	0,80	0,80	0,83	1,65	1,20	1,10	1,32	37,12
A61	0,80	0,60	0,80	0,47	0,70	1,20	0,90	0,93	49,46
A62	0,60	0,70	0,60	0,63	0,80	0,80	0,80	0,80	21,25
A63	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,00
A64	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,00
A65	1,00	0,10	1,05	1,05	1,00	0,10	1,05	1,05	0,00
A66	0,70	0,60	0,60	0,63	1,20	1,00	1,15	1,12	43,75
A67	1,00	1,10	0,90	1,00	1,30	1,40	1,50	1,40	28,57
A68	1,10	0,80	1,00	0,97	1,10	0,80	1,00	0,97	0,00
A69	0,50	0,40	0,50	0,47	0,50	0,40	0,50	0,47	0,00
A70	1,10	1,40	1,40	1,30	1,10	1,40	1,40	1,30	0,00
A71	0,80	0,80	0,90	0,83	0,90	1,30	0,90	1,03	19,42
A72	0,60	0,80	0,70	0,70	0,60	1,00	1,00	0,87	19,54
A73	1,10	0,70	0,40	0,73	1,20	0,80	0,40	0,80	8,75
A74	0,30	1,20	1,40	0,97	0,30	1,20	1,40	0,97	0,00
A75	0,90	0,90	0,30	0,70	0,90	0,90	0,30	0,70	0,00
A76	1,30	1,30	1,10	1,23	1,30	1,30	1,30	1,30	5,39
A77	1,00	1,10	1,05	1,05	1,0	1,10	1,05	1,05	0,00
A78	1,00	0,80	0,90	0,90	1,00	0,80	0,90	0,90	0,00
A79	1,20	1,20	1,10	1,17	1,20	1,20	1,10	1,17	0,00
A80	0,70	0,80	1,00	0,83	0,70	0,80	1,00	0,83	0,00
A81	1,10	1,20	0,70	1,00	1,10	1,20	0,70	1,00	0,00
A82	1,3	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	0,00
A83	1,3	1,20	1,30	1,27	1,30	1,20	1,30	1,27	0,00

Priloge F

Opisna statistika učinka etil acetata in ekstraktov na kalitev trosov patogene glive *C. fioriniae*

Priloga F1

Opisna statistika učinka različnih volumnov (10, 20, 30, 40 µl) dodanega etil acetata na kalitev trosov patogene glive *C. fioriniae*

Ura	Volumen	N	Povprečje	Std	Min	Max
4	0	21	2,95	0,63	1,23	3,68
	10	12	4,96	1,52	2,92	7,96
	20	16	5,23	1,66	2,4	8,86
	30	15	4,56	1,59	2,45	7,82
	40	-	-	-	--	-
6	0	6	11,28	2,01	3,65	13,01
	10	9	12,57	3,14	6,72	15,90
	20	3	12,57	1,79	10,52	13,84
	30	7	12,67	2,11	9,75	16,16
	40	12	13,48	3,14	6,14	18,01
8	0	17	22,33	7,05	8,56	37,46
	10	18	20,78	6,65	14,93	34,32
	20	13	30,14	6,99	13,17	41,92
	30	17	32,14	7,58	22,19	48,49
	40	18	39,67	9,12	26,40	54,53
12	0	7	53,90	14,46	33,99	82,13
	10	11	54,5	15,19	17,74	72,8
	20	12	58,34	9,74	43,81	74,75
	30	7	55,83	13,20	40,13	72,45
	40	11	61,49	9,13	48,88	79,18
13	0	15	111,85	28,14	57,83	152,75
	10	10	108,21	22,83	83,89	145,84
	20	9	106,10	18,02	83,47	141,29
	30	11	113,18	44,71	42,09	158,40
	40	12	109,69	19,04	71,15	131,42
21	0	10	193,80	45,03	126,71	245,48
	10	6	193,17	22,87	153,93	219,79
	20	13	222,68	61,31	121,33	347,19
	30	9	198,75	31,59	132,21	236,09
	40	11	240,32	73,12	131,86	324,42

Priloga F2

Opisna statistika učinka različnih glivnih ekstraktov na kalitev trosov patogene glive *C. fioriniae*

Čas (h)	Ekstrakt	N	Povprečje	Std	Min	Max
7	Kontrola	12	15,04	3,14	8,77	20,25
	Ekstrakt 1	10	0	0	0	0
	Ekstrakt 2	9	0	0	0	0
	Ekstrakt 3	-	-	-	-	-
	Ekstrakt 4	-	-	-	-	-
	Ekstrakt 5	13	20,14	8,96	3,96	34,38
9	Kontrola	17	22,33	7,04	8,56	37,46
	Ekstrakt 1	11	0	0	0	0
	Ekstrakt 2	8	0	0	0	0
	Ekstrakt 3	5	9,22	3,13	4,41	13,15
	Ekstrakt 4	-	-	-	-	-
	Ekstrakt 5	8	28,28	9,78	9,55	38,27
12	Kontrola	7	53,90	14,46	33,99	82,13
	Ekstrakt 1	9	0	0	0	0
	Ekstrakt 2	9	0	0	0	0
	Ekstrakt 3	13	12,90	5,29	5,77	22,64
	Ekstrakt 4	-	-	-	-	-
	Ekstrakt 5	15	59,11	17,69	28,73	85,00
13	Kontrola	15	111,85	28,14	57,83	152,75
	Ekstrakt 1	11	0	0	0	0
	Ekstrakt 2	7	0	0	0	0
	Ekstrakt 3	-	-	-	-	-
	Ekstrakt 4	3	14,89	13,46	2,05	28,9
	Ekstrakt 5	4	51,84	33,88	24,22	94,42
15	Kontrola	-	-	-	-	-
	Ekstrakt 1	7	0	0	0	0
	Ekstrakt 2	10	0	0	0	0
	Ekstrakt 3	7	40,67	12,65	22,64	55,07
	Ekstrakt 4	-	-	-	-	-
	Ekstrakt 5	24	76,57	20,60	29,16	119,88
21	Kontrola	10	193,80	45,03	126,71	245,48
	Ekstrakt 1	8	0	0	0	0
	Ekstrakt 2	9	0	0	0	0
	Ekstrakt 3	-	-	-	-	-
	Ekstrakt 4	5	26,91	9,60	14,81	36,93
	Ekstrakt 5	9	171,07	59,17	95,07	256,48

Priloge G

Meritve in izračuni *in vivo* testiranja

Priloga G1

Meritve in izračuni *in vivo* testiranja za *M. malicola*

Število jabolk (n)	Višina (v ₁) (mm)	višina (v ₂) (mm)	Srednja vrednost višin (v) (mm)	Premier D1 (mm)	Premier D2 (mm)	Srednja vrednost premerov D (mm)	Površina celotnega jabolka (mm ²)	Velikost okužene površine v (%)	Površina okužbe jabolk (mm ²)
1	56	52	54	62	60	61	10381	40,00	4152
2	56	62	59	64	66	65	12861	16,66	2143
3	50	46	48	60	62	61	9327	75,00	6995
4	68	62	65	70	72	71	13886	75,00	10414
5	54	52	53	62	58	60	10024	50,00	5012
6	62	60	61	68	66	67	12861	30,00	3858
7	56	54	55	64	66	65	11304	35,00	3956
8	52	52	52	62	60	61	10024	0,34	34
9	48	56	52	60	60	60	9847	20,00	1969
10	58	54	56	66	62	64	11304	20,00	2261
11	58	52	55	65	65	65	11304	20,00	2261
12	55	55	55	55	55	55	9499	30,00	2850
13	55	54	54,5	60	62	61	10492	55,00	5771
14	66	52	59	60	66	63	11684	10,00	1168
15	62	56	59	68	66	67	12463	10,00	1246
16	66	48	57	70	68	69	12463	25,00	3116
17	56	56	56	65	68	66,5	11780	30,05	3540
18	58	52	55	65	65	65	11304	30,00	3391
19	58	62	60	65	68	66,5	12562	25,00	3140
20	60	52	56	64	64	64	11304	10,00	1130
21	58	60	59	66	66	66	12266	10,00	1227
22	65	50	57,5	64	64	64	11588	70,00	8112
23	48	54	51	62	62	62	10024	50,00	5012
24	60	64	62	64	68	66	12861	5,00	643
25	48	45	46,5	54	54	54	7929	75,00	5947
26	48	50	49	58	58	58	8987	5,00	449
27	55	52	53,5	62	62	62	10472	20,00	2094
28	56	52	54	66	60	63	10746	10,00	1075
29	52	52	52	62	64	63	10382	50,00	5191
30	52	48	50	48	52	50	7850	20,00	1570
31	45	55	50	60	60	60	9499	2,00	190
32	52	52	52	58	62	60	9847	5,00	492
33	54	60	57	64	72	68	12463	2,00	249
34	45	58	51,5	60	64	62	10113	10,00	1011
35	50	54	52	60	58	59	9672	2,00	193
36	48	54	51	60	58	59	9499	20,00	1900
37	46	58	52	62	64	63	10382	75,00	7786
38	52	58	55	62	60	61	10563	40,00	4225
39	48	48	48	58	54	56	8491	2,00	170
40	54	54	54	62	58	60	10202	20,00	2040
41	48	54	51	58	60	59	9499	5,00	475
42	50	48	49	58	60	59	9156	10,00	916
43	50	58	54	58	56	57	9672	10,00	967
44	45	56	50,5	56	58	57	9072	30,00	2722
45	50	48	49	56	58	57	8820	15,00	1323

se nadaljuje ...

nadaljevanje Priloge G1: Meritve in izračuni *in vivo* testiranja za *M. malicola*

Število jabolk (n)	Višina (v ₁) (mm)	višina (v ₂) (mm)	Srednja vrednost višin (v) (mm)	Premier D1 (mm)	Premier D2 (mm)	Srednja vrednost premerov D (mm)	Površina celotnega jabolka (mm ²)	Velikost okužene površine v (%)	Površina okužbe jabolk (mm ²)
46	38	52	45	54	48	51	7235	40,00	2894
47	45	48	46,5	50	50	50	7310	15,00	1097
48	42	50	46	56	58	57	8328	0	83
49	50	48	49	55	50	52,5	8087	15,00	1213
50	44	48	46	52	52	52	7539	5,00	377
51	40	44	42	46	46	46	6079	5,00	304
52	55	60	57,5	66	66	66	11973	1,00	120
53	46	56	51	52	56	54	8655	1,01	87
54	68	66	67	75	75	75	-	-	0
55	52	55	53,5	56	62	59	-	-	0
56	58	60	59	68	70	69	-	-	0
57	52	52	52	62	60	61	-	-	0
58	56	58	57	66	68	67	-	-	0
59	60	58	59	68	64	66	-	-	0
60	48	56	52	58	56	57	-	-	0
61	55	56	55,5	58	64	61	-	-	0
62	52	58	55	56	62	54	-	-	0
63	50	52	51	58	56	57	-	-	0
64	52	55	53,5	60	62	61	-	-	0
65	48	52	50	54	56	55	-	-	0
66	48	52	50	57	58	57,5	-	-	0

Priloga G2

Meritve in izračuni *in vivo* testiranja za *M. tardicrescens*

Število jabolk (n)	Višina (v ₁) (mm)	višina (v ₂) (mm)	Srednja vrednost višin (v) (mm)	Premer D1 (mm)	Premer D2 (mm)	Srednja vrednost premerov D (mm)	Površina celotnega jabolka (mm ²)	Velikost okužene površine v (%)	Površina okužbe jabolk (mm ²)
1	65	63	64	73	70	71,5		0	0
2	62	67	64,5	67	75	71	14413	0,23	32,89
3	62	67	64,5	72	70	71	14413	4,53	653,12
4	65	67	66	68	74	71	14734	13,09	1928
5	62	61	61,5	66	66	66	12761	6,30	803,84
6	67	72	69,5	72	76	74	16165	1,24	200,96
7	57	55	56	67	63	65	11493	3,93	452,16
8	60	58	59	66	65	65,5		0	0
9	62	57	59,5	68	66	67	12562	0,1	12,56
10	62	60	61	74	72	73			0
11	61	59	60	63	63	63	11876	0,48	56,52
12	62	62	62	67	62	64,5	12561	28,80	3617
13	65	62	63,5	77	74	75,5	15167	5,30	803,84
14	61	63	62	72	68	70	13678	15,51	2122
15	56	56	56	62	62	62	10930	11,49	1256
16	68	65	66,5	72	70	71	14841	10,24	1519
17	57	55	56	66	70	68	12070	16,26	1962,5
18	57	62	59,5	65	65	65	12168	10,33	1256
19	60	62	61	66	65	65,5	-	0	0
20	68	62	65	80	78	79	16278	11,11	1808
21	48	46	47	62	60	61	-	-	0
22	58	62	60	68	62	65	-	-	0
23	60	58	59	72	70	71	13267	3,41	452,16
24	72	72	72	76	76	76	-	-	0
25	58	55	56,5	68	64	66	11780	15,35	1808
26	50	45	47,5	58	58	58	8737	24,29	2122
27	50	50	50	64	62	63	-	-	0
28	62	62	62	72	72	72	14096	12,83	1808,64
29	70	70	70	78	75	76,5	16848	-	0
30	70	70	70	75	80	77,5	17079	9,73	1661
31	72	76	74	76	82	74	17195	9,66	1661
32	70	-	70	70	-	70	15386	55,18	8490
33	72	70	71	77	80	78,5	-	-	0
34	74	64	69	75	75	75	16278	10,36	1686
35	76	66	71	74	80	77	17195	7,30	1256
36	66	66	66	70	75	72,5	15058	41,17	6200
37	68	68	68	72	72	72	-	-	0
38	68	-	68	74	-	74	15828	58,12	9200
39	60	-	60	70	65	67,5	12761	47,43	3500
40	68	64	66	72	78	75		-	0
41	62	72	67	74	72	73	-	-	0
42	66	63	64,5	72	74	73	-	-	0
43	65	67	66	74	72	73	-	-	0
44	68	72	70	72	76	74	-	-	0
45	74	72	73	80	82	81	-	-	0
46	70	70	70	78	78	78	17195	12,39	2131
47	74	74	74	75	80	77,5	-	-	0
48	63	61	62	68	63	65,5	12761	7,97	1017
49	75	70	72,5	76	82	79	18018	-	0
50	65	63	64	65	68	66,5	13369	5,28	706

se nadaljuje ...

nadaljevanje Priloge G2: Meritve in izračuni *in vivo* testiranja za *M. tardicrescens*

Število jabolk (n)	Višina (v ₁) (mm)	višina (v ₂) (mm)	Srednja vrednost višin (v) (mm)	Premier D1 (mm)	Premier D2 (mm)	Srednja vrednost premerov D (mm)	Površina celotnega jabolka (mm ²)	Velikost okužene površine v (%)	Površina okužbe jabolk (mm ²)
51	58	58	58	65	70	67,5	12070	48,05	5800
52	70	70	70	76	82	79	-	-	0
53	65	62	63,5	75	73	74	14841	4,76	706
54	62	66	64	72	74	73	-	-	0
55	64	68	66	62	64	63	13063	30,05	3925
56	72	64	68	74	78	76	-	-	0
57	64	58	61	72	74	73	14095	22,70	3200
58	66	66	66	78	76	77	-	-	0
59	66	-	66	72	-	72	14950	63,55	9500
60	64	62	63	68	66	67	-	-	0
61	60	68	64	75	72	73,5	-	-	0
62	60	68	64	76	74	75	-	-	0
63	66	68	67	70	64	67	-	-	0
64	64	64	64	70	62	66	13267	5,65	750
65	66	58	62	72	70	71	-	-	0
66	57	60	58,5	66	70	68	-	-	0
67	54	62	58	65	65	65	-	-	0
68	65	-	65	74	-	74	15167	7,91	1200
69	65	-	65	70	-	70	14306	45,44	6500
70	52	64	58	62	66	74	-	-	0
71	60	-	60	62	-	62	11684	6,00	700
72	62	-	62	70	-	70	13677	36,56	5000
73	60	-	60	66	-	66	12463	5,62	700
74	64	48	56	60	68	64	-	-	0
75	52	-	52	60	-	60	9847	20,01	1970
76	60	-	60	-	-	-	11304	5,31	600
77	58	54	56	65	66	65,5	-	-	0
78	55	-	55	60	-	60	10381	44,31	4600
79	52	-	52	64	-	64	10201	8,80	1000
80	56	-	56	62	-	62	10930	45,01	4920
81	48	56	52	62	64	63	10382	44,98	4670
82	48	-	48	56	-	56	8490	10,01	850
83	54	-	54	60	-	60	10201	25,00	2550
84	48	48	48	62	62	62	-	-	0
85	48	60	54	58	62	60	-	-	0
86	52	-	52	58	-	58	9498	15,00	1425
87	54	-	54	58	-	58	9847	10,00	984
88	62	58	60	68	70	69	-	-	0
89	52	54	53	62	58	60	-	-	0
90	50	-	50	50	-	50	1962	9,99	196
91	54	-	54	58	-	58	9847	75,00	7385
92	46	-	46	54	-	54	7850	15,00	1177
93	52	46	49	62	58	60	-	-	0
94	56	64	60	62	70	66	-	-	0
95	42	-	42	54	-	54	7234	5,00	361
96	45	42	43,5	58	54	56	-	-	0
97	38	-	38	46	-	46	5538	4,98	276

Priloga G3

Meritve in izračuni *in vivo* testiranja za *P. cerophilus*

Število jabolk (n)	Višina (v ₁) (mm)	višina (v ₂) (mm)	Srednja vrednost višin (v) (mm)	Premjer D1 (mm)	Premjer D2 (mm)	Srednja vrednost premerov D (mm)	Površina celotnega jabolka (mm ²)	Velikost okužene površine v (%)	Površina okužbe jabolk (mm ²)
1	62	54	58	66	66	66	12070	25	3018
2	64	56	60	62	68	65	12266	70	8586
3	62	66	64	72	68	70	14095	30	4229
4	60	58	59	70	72	71	13267	10	1327
5	70	66	68	80	74	77	16505	5	825
6	60	66	63	72	76	74	14734	10	1473
7	56	62	59	64	66	65	12070	35	4225
8	58	54	56	66	64	65	11493	5	575
9	46	50	48	54	54	54	8167	20	1633
10	62	64	63	72	72	72	14307	5	715
11	56	58	57	66	66	66	11876	80	9501
12	60	70	65	68	70	69	14095	20	2819
13	62	50	56	70	70	70	12463	10	1246
14	48	50	49	60	60	60	9327	70	6529
15	58	56	57	62	66	64	11493	2	230
16	56	60	58	64	66	65	11876	5	594
17	48	52	50	60	60	60	9499	1	95
18	52	56	54	60	60	60	10202	60	6121
19	58	62	60	64	64	64	12070	3	362
20	51	57	54	58	63	60,5	10292	12	1235
21	55	60	57,5	72	71	71,5	13063	4	523
22	58	64	61	62	67	64,5	12364	11	1360
23	55	62	58,5	68	71	69,5	12861	46	5916
24	55	57	56	60	62	61	10746	58	6233
25	57	57	57	62	63	62,5	11210	21	2354
26	62	61	61,5	81	76	74	14413	4	577
27	54	52	53	56	62	59	9847	24	2363
28	52	50	51	62	62	62	10024	1	100
29	58	51	54,5	62	60	61	10472	7	733
30	58	62	60	66	66	66	12463	66	8225
31	48	52	50	58	60	59	9327	1	93
32	36	44	40	48	45	46,5	5874	17	999
33	54	50	52	66	62	64	10563	7	739
34	48	54	51	58	62	60	9672	2	193
35	58	58	58	67	67	67	12266	1	123
36	58	65	61,5	80	72	76	1484	1	15
37	60	50	55	60	60	60	10382	86	8929
38	58	54	56	62	68	65	11493	6	690
39	54	60	57	66	62	64	11493	7	805
40	52	42	47	58	60	59	8820	4	353
41	60	56	58	65	65	65	11876	1	119
42	56	52	54	60	57	58,5	9935	13	1292
43	56	58	57	62	62	62	11116	1	111
44	48	48	48	58	62	60	9156	1	92
45	58	55	56,5	61	65	63	11210	1	112
46	52	54	53	61	64	62,5	10472	2	209
47	48	48	48	60	60	60	9156	1	92
48	46	54	50	54	61	57,5	9072	11	998
49	48	58	53	58	62	60	10023	46	4611
50	48	55	51,5	58	56	57	9241	34	3142

se nadaljuje ...

nadaljevanje Priloge G3: Meritve in izračuni *in vivo* testiranja za *P. cerophilus*

Število jabolk (n)	Višina (v ₁) (mm)	višina (v ₂) (mm)	Srednja vrednost višin (v) (mm)	Premier D1 (mm)	Premier D2 (mm)	Srednja vrednost premerov D (mm)	Površina celotnega jabolka (mm ²)	Velikost okužene površine v (%)	Površina okužbe jabolk (mm ²)
51	50	52	51	58	58		9327	12	1119
52	44	52	48	60	58	59	8988	8	719
53	52	54	53	56	62	59	9847	2	197
54	48	52	50	60	58	59	9327	5	466
55	46	48	47	54	56	55	8167	2	163
56	48	50	49	58	54	56	8655	32	2770
57	42	50	46	58	58	58	8491	7	594
58	46	50	48	54	52	53	8008	12	961
59	62	62	62	68	70	69	-	-	0
60	62	66	64	74	74	-	-	-	0
61	55	55	55	64	68	66	-	-	0
62	58	62	60	66	64	65	-	-	0
63	58	53	-	65	60	62,5	-	-	0
64	56	53	-	71	70	70,5	-	-	0
65	59	66	-	75	72	-	-	-	0
66	41	48	-	46	52	-	-	-	0
67	45	55	-	58	54	-	-	-	0
68	48	49	-	52	51	-	-	-	0
69	43	48	-	52	53	-	-	-	0
70	54	49	-	60	56	-	-	-	0
71	49	51	-	55	52	-	-	-	0
72	52	57	-	66	67	-	-	-	0
73	54	55	-	65	62	-	-	-	0
74	56	60	-	67	72	-	-	-	0
75	50	52	51	56	59	-	-	-	0
76	49	57	-	60	61	60,5	-	-	0
77	46	48	47	53	56	-	-	-	0
78	52	57	-	62	65	-	-	-	0
79	48	52	-	62	60	-	-	-	0
80	50	54	-	57	60	-	-	-	0
81	42	57	-	58	55	-	-	-	0
82	54	54	54	57	55	56	-	-	0
83	57	59	58	65	70	-	-	-	0
84	60	62	61	66	68	67	-	-	0
85	50	54	52	66	65	65,5	-	-	0
86	62	67	-	72	70	71	-	-	0
87	44	48	46	56	60	58	-	-	0
88	48	48	48	58	60	59	-	-	0
89	48	52	-	63	63	63	-	-	0
90	50	54	52	61	57	-	-	-	0
91	48	50	-	61	57	-	-	-	0
92	66	45	-	68	52	-	-	-	0
93	42	46	-	55	60	-	-	-	0
94	48	51	-	61	58	-	-	-	0
95	50	51	-	57	57	-	-	-	0
96	51	53	-	59	60	-	-	-	0
97	50	46	-	55	58	-	-	-	0
98	56	58	-	60	62	-	-	-	0
99	46	42	-	54	55	-	-	-	0
100	42	43	-	50	52	-	-	-	0
101	41	45	-	50	52	-	-	-	0
102	50	42	-	52	53	-	-	-	0
103	46	47	-	51	52	-	-	-	0

se nadaljuje ...

nadaljevanje Priloge G3: Meritve in izračuni *in vivo* testiranja za *P. cerophilus*

[illegible]

Priloge H

Testiranja na različnih sortah jabolk

Priloga H1

Rezultati testiranja pri sorti Gala

Jabolka		Tretiranje	1.1	1.2	1.3	1.4
Posoda 1						
Tretiranje (cm)	1		2,0x1,9	1,7x1,7	2,4x2,4	1,5x1,9
Patogena gliva			2,1x2,1	1,6x1,8	2,3x2,3	1,2x1,4
Povprečni r(cm)			1,01	0,85	1,18	0,75
Povp.ploščina (cm ²)			3,20	2,27	4,37	1,77
Tretiranje (cm)	2		0	0	0	0
Antagonist						
Tretiranje		3	1,5x1,4	1,6x1,3	2,0x2,0	1,2x1,5
Antagonist + 2h patog.					1,5x1,8	1,0x1,3
Povprečni r (cm)	4		0,73	0,73	0,91	0,63
Povprečna ploščina (cm ²)			1,67	1,67	2,60	1,25
Tretiranje		4	1,9x1,8	1,4x1,5	2,1x2,4	1,2x1,5
Antagonist + patogen hkrati				2,0x2,1	1,7x1,5	2,1x2,1
Povprečni r (cm)	5		0,98	0,76	1,09	0,56
Povprečna ploščina (cm ²)			3,02	1,81	3,73	0,98
Tretiranje		5	1,7x2,0	1,4x1,9	2,4x2,4	1,2x1,8
patogena + 2h				1,5x1,1	1,4x1,7	
Povprečni r (cm)			0,79	0,8	1,2	0,75
Povprečna ploščina (cm ²)			1,96	2,01	4,52	1,77
Primerjava tretiranj P4/P1 (%)			94,38	79,74	85,35	55,37
Primerjava tretiranj P3/P5 (%)			85,20	83,09	57,52	70,62
Delež inhibicije I4 (%)			5,62	20,26	14,65	44,63
Delež inhibicije I3 (%)			14,8	16,91	42,48	29,38
Jabolka		Tretiranje	2.1	2.2	2.3	2.4
Posoda 2						
Tretiranje (cm)	1		1,7x1,2	1,5x1,4	2,1x1,3	1,8x1,3
Patogena gliva			1,4x1,1	0	1,7x1,8	1,7x1,4
Povprečni r (cm)			0,66	0,73	0,86	0,78
Povprečna ploščina (cm ²)			1,45	1,67	2,32	1,91
Tretiranje (cm)	2					
Antagonist						
Tretiranje		3	0,8x1,1	0,8x1,1	1,1x1,3	1,4x1,4
Antagonist + 2h patog.				1,0x0,8	0,8x1,1	
Povprečni r (cm)	4		0,46	0,48	0,60	0,64
Povprečna ploščina (cm ²)			0,66	0,72	1,13	1,29
Tretiranje		4	1,4x1,0	1,5x1,0	1,3x1,7	1,4x1,5
Antagonist + patogen hkrati				0,9x0,9	1,3x1,2	1,7x1,6
Povprečni r (cm)	5		0,53	0,63	0,79	0,73
Povprečna ploščina (cm ²)			0,88	1,25	1,96	1,67
Tretiranje		5	1,0x0,9	0,9x1,3	1,6x1,6	1,5x1,5
patogena + 2h						1,9x1,4

se nadaljuje ...

nadaljevanje Priloge H1: Rezultati testiranja pri sorti Gala

Povprečni r (cm)		0,48	0,55	0,81	0,75
Povprečna ploščina (cm ²)		0,72	0,95	2,06	1,77
Primerjava tretiranj P4/P1 (%)		60,69	74,85	84,48	87,43
Primerjava tretiranj P3/P5 (%)		91,67	75,79	54,85	72,88
Delež inhibicije I4 (%)		39,31	25,15	15,52	12,57
Delež inhibicije I3 (%)		8,33	24,21	45,15	27,12
Jabolka					
Posoda 3	Tretiranje	3.1	3.2	3.3	3.4
Tretiranje (cm)	1	1,4x1,5	1,5x1,3	1,6x1,6	1,5x1,4
Patogena gliva		1,2x1,1	1,8x1,7	1,7x1,6	1,3x1,5
Povprečni r (cm)		0,65	0,79	0,81	0,71
Povprečna ploščina (cm ²)		1,33	1,96	2,06	1,58
Tretiranje (cm)	2				
Antagonist					
Tretiranje	3	1,4x1,0	1,3x1,3	1,3x1,7	1,4x1,2
Antagonist + 2h patog.		1,5x1,6		1,3x1,1	1,6x1,4
Povprečni r (cm)		0,69	0,65	0,68	0,7
Povprečna ploščina (cm ²)		1,49	1,33	1,45	1,54
Tretiranje	4	1,0x1,0	1,2x1,1	1,6x1,3	1,5x1,0
Antagonist + patogen hkrati		1,7x1,1	1,5x1,2	1,2x1,3	1,6x1,2
Povprečni r (cm)		0,6	0,63	0,68	0,66
Povprečna ploščina (cm ²)		1,13	1,25	1,45	1,37
Tretiranje	5	1,4x1,3	1,5x1,6	1,6x1,7	1,5x1,6
patogena + 2h			1,6x1,4		
Povprečni r (cm)		0,68	0,76	0,83	0,78
Povprečna ploščina (cm ²)		1,45	1,81	2,16	1,91
Primerjava tretiranj P4/P1 (%)		84,36	63,78	70,39	86,71
Primerjava tretiranj P3/P5 (%)			73,48	67,13	80,63
Delež inhibicije I4 (%)		15,04	36,22	29,61	13,29
Delež inhibicije I3 (%)		0	26,52	32,87	19,37
Jabolka					
Posoda 4	Tretiranje	4.1	4.2	4.3	4.4
Tretiranje (cm)	1		1,8x2,0	2,2x1,8	2,2x2,0
Patogena gliva			1,6x1,5	1,9x1,9	2,1x2,0
Povprečni r (cm)			0,86	0,98	1,04
Povprečna ploščina (cm ²)			2,32	3,02	3,40
Tretiranje (cm)	2				
Antagonist					
Tretiranje	3		1,7x1,6	1,4x1,3	2,0x1,9
Antagonist + 2h patog.			1,4x1,5		1,5x1,6
Povprečni r (cm)			0,78	0,68	0,88
Povprečna ploščina (cm ²)			1,91	1,45	2,43
Tretiranje	4		1,7x1,9	1,8x1,5	2,1x2,0
Antagonist + patogen hkrati			1,4x1,2	1,5x1,3	2,0x1,8
Povprečni r (cm)			0,74	0,76	0,99
Povprečna ploščina (cm ²)			1,72	1,81	3,08
Tretiranje	5		1,9x1,7	1,3x1,7	2,1x1,8
patogena + 2h				1,3x1,5	
Povprečni r (cm)			0,90	0,73	0,98
Povprečna ploščina (cm ²)			2,54	1,67	3,02

se nadaljuje ...

nadaljevanje Priloge H1: Rezultati testiranja pri sorti Gala

Primerjava tretiranj P4/P1 (%)		74,14	59,94	90,00	
Primerjava tretiranj P3/P5 (%)		75,20	86,83	80,46	
Delež inhibicije I4 (%)		25,86	40,06	10,00	
Delež inhibicije I3 (%)		24,8	13,17	19,45	
Jabolka					
	Tretiranje	5.1	5.2	5.3	5.4
Posoda 5					
Tretiranje (cm)	1	1,6x1,0	1,3x1,6	1,7x1,4	1,6x1,3
Patogena gliva		1,2x1,2	1,5x1,5	1,7x1,6	1,4x1,4
Povprečni r (cm)		0,63	0,74	0,8	0,79
Povprečna ploščina (cm ²)		1,25	1,72	2,01	1,58
Tretiranje (cm)					
Antagonist	2				
Tretiranje	3	1,0x1,0	1,5x1,3	1,1x1,0	1,1x1,1
Antagonist + 2h patog.			1,7x1,8	1,3x1,1	
Povprečni r (cm)		0,5	0,79	0,56	0,55
Povprečna ploščina (cm ²)		0,79	1,96	0,98	0,95
Tretiranje	4	1,4x1,2	1,4x1,3	1,6x1,4	1,3x1,2
Antagonist + patogen hkrati		1,0x1,1	1,5x1,4	1,4x1,3	1,4x1,3
Povprečni r (cm)		0,59	0,7	0,71	0,65
Povprečna ploščina (cm ²)		1,09	1,54	1,58	1,33
Tretiranje	5	1,5x1,2	1,8x1,7	1,6x1,6	1,4x1,3
patogena + 2h		1,4x1,4			1,4x1,4
Povprečni r (cm)		0,69	0,88	0,8	0,69
Povprečna ploščina (cm ²)		1,50	2,43	2,01	1,49
Primerjava tretiranj P4/P1 (%)		87,2	89,53	78,61	84,18
Primerjava tretiranj P3/P5 (%)		52,67	80,66	48,76	63,76
Delež inhibicije I4 (%)		12,8	10,47	21,39	15,82
Delež inhibicije I3 (%)		74,33	19,34	51,24	36,24
Jabolka					
	Tretiranje	6.1	6.2	6.3	6.4
Posoda 6					
Tretiranje (cm)	1	1,3x1,7	1,7x1,4	1,5x1,3	1,4x1,1
Patogena gliva		1,7x1,2	1,5x1,6	1,1x1,4	1,6x1,3
Povprečni r (cm)		0,74	0,78	0,66	0,68
Povprečna ploščina (cm ²)		1,72	1,91	1,37	1,45
Tretiranje (cm)					
Antagonist	2				
Tretiranje	3	1,6x1,4	1,2x0,9	1,4x1,5	1,4x1,0
Antagonist + 2h patog.		1,4x1,4	0,8x0,8	1,2x1,1	1,1x1,0
Povprečni r (cm)		0,73	0,46	0,65	0,56
Povprečna ploščina (cm ²)		1,67	0,66	1,33	0,98
Tretiranje	4	1,8x1,5	1,6x1,3	1,4x1,1	1,5x1,3
Antagonist + patogen hkrati		1,1x1,2	1,2x1,3	1,2x1,0	0,9x0,9
Povprečni r (cm)		0,70	0,68	0,59	0,58
Povprečna ploščina (cm ²)		1,54	1,45	1,09	1,06
Tretiranje patogena + 2h	5	1,4x1,6	1,1x1,0	1,3x1,3	1,3x1,1
Povprečni r (cm)		0,75	0,53	0,65	0,60
Povprečna ploščina (cm ²)		1,77	0,88	1,33	1,13
Primerjava tretiranj P4/P1 (%)		89,53	75,92	79,56	73,10
Primerjava tretiranj P3/P5 (%)		94,35	75,0		86,73
Delež inhibicije I4 (%)		10,47	24,08	20,44	26,9

se nadaljuje ...

nadaljevanje Priloge H1: Rezultati testiranja pri sorti Gala

Delež inhibicije I3(%)		5,65	25	0	13,27	
Jabolka	Tretiranje	7.1	7.2	7.3	7.4	
	Posoda 7					
Tretiranje (cm)	1	1,5x1,6	1,3x1,0	2,1x1,7	1,4x1,1	
Patogena gliva		1,6x1,3	1,4x1,2	1,8x1,7	1,0x0,8	
Povprečni r (cm)		0,75	0,61	0,91	1,53	
Povprečna ploščina (cm ²)		1,77	1,17	2,60	0,88	
Tretiranje (cm)	2					
Antagonist						
Tretiranje	3	1,1x1,0	0,6x0,7	1,6x1,5		
Antagonist + 2h patog.		1,1x1,0		1,3x1,4		
Povprečni r (cm)		0,53	0,33	0,73		
Povprečna ploščina (cm ²)		0,88	0,34	1,67		
Tretiranje	4	1,7x1,7	1,1x1,2	1,9x1,6	0,9x0,9	
Antagonist + patogen hkrati		1,4x1,4	1,0x1,2	1,6x1,7	0,9x0,8	
Povprečni r (cm)		0,78	0,56	0,85	0,44	
Povprečna ploščina (cm ²)		1,91	0,98	2,27	0,61	
Tretiranje	5	1,5x1,4	0,7x0,9	1,4x1,5		
patogena + 2h						
Povprečni r (cm)		0,73	0,4	0,73		
Povprečna ploščina (cm ²)		1,67	0,50	1,67		
Primerjava tretiranj P4/P1 (%)		81,92	83,76	87,31	69,32	
Primerjava tretiranj P3/P5 (%)		52,70	68,00	100		
Delež inhibicije I4 (%)		0	16,24	12,69	30,68	
Delež inhibicije I3 (%)		47,3	32,00	0		
Jabolka		Tretiranje	8.1	8.2	8.3	8.4
Posoda 8						
Tretiranje (cm)	1	1,3x1,3	1,8x1,6	1,8x1,6	1,7x1,8	
Patogena gliva		1,1x1,0	1,5x1,1		1,7x1,6	
Povprečni r (cm)		0,59	0,75	0,85	0,85	
Povprečna ploščina (cm ²)		1,09	1,77	2,27	2,27	
Tretiranje (cm)	2					
Antagonist						
Tretiranje	3		1,4x1,6	1,8x1,9	1,0x1,0	
Antagonist + 2h patog.				1,6x1,1	1,8x1,9	
Povprečni r (cm)			0,71	0,93	0,50	
Povprečna ploščina (cm ²)			1,58	2,72	0,79	
Tretiranje	4	1,2x1,1	1,5x1,8	1,2x1,9	1,6x1,6	
Antagonist + patogen hkrati		0,9x0,8	1,5x1,2	2,0x2,1	1,4x1,4	
Povprečni r (cm)		0,5	0,75	0,9	0,75	
Povprečna ploščina (cm ²)		0,79	1,77	2,54	1,77	
Tretiranje	5		1,7x1,5	1,8x1,9	1,0x1,3	
patogena + 2h					1,8x1,9	1,5x1,1
Povprečni r (cm)			0,8	0,93	0,61	
Povprečna ploščina (cm ²)			2,01	2,72	1,17	
Primerjava tretiranj P4/P1 (%)		72,48	90,31	76,28	77,97	
Primerjava tretiranj P3/P5 (%)			78,61	83,46	67,52	
Delež inhibicije I4 (%)		27,52	0	23,72	22,03	
Delež inhibicije I3 (%)			21,39	16,54	32,48	

se nadaljuje ...

nadaljevanje Priloge H1: Rezultati testiranja pri sorti Gala

Jabolka		Tretiranje	9.1	9.2	9.3	9.4
Posoda 9						
Tretiranje (cm)	1		2,2x1,8	1,7x1,7	1,9x1,8	2,6x2,4
Patogena gliva			2,1x2,0	1,7x1,3	1,7x1,8	2,3x2,0
Povprečni r (cm)			1,01	0,8	0,9	1,16
Povprečna ploščina (cm ²)			3,20	2,01	2,54	4,23
Tretiranje (cm)	2					
Antagonist						
Tretiranje			1,5x1,6	1,3x1,2	1,1x1,2	1,8x1,2
Antagonist + 2h patog.			1,5x1,6	1,2x1,4	1,1x1,2	1,4x1,6
Povprečni r (cm)	3		0,78	0,64	0,58	0,75
Povprečna ploščina (cm ²)			1,91	1,29	1,06	1,77
Tretiranje			1,9x2,0	1,4x1,3	1,5x1,5	2,7x2,3
Antagonist + patogen hkrati			1,8x1,7	1,7x1,7	1,8x1,8	2,0x1,9
Povprečni r (cm)	4		0,93	0,76	0,83	1,08
Povprečna ploščina (cm ²)			2,72	1,81	2,16	3,66
Tretiranje			2,1x1,8	1,3x1,5	1,6x1,2	2,2x1,9
patogena + 2h						
Povprečni r (cm)	5		0,98	0,7	0,7	1,03
Povprečna ploščina (cm ²)			3,02	1,54	1,54	3,33
Primerjava tretiranj P4/P1 (%)			85	80,05	85,04	86,52
Primerjava tretiranj P3/P5 (%)			63,25	83,77	53,15	81,68
Delež inhibicije I4 (%)			15	9,95	14,96	13,48
Delež inhibicije I3 (%)			36,75	16,3	46,85	18,32
Jabolka		Tretiranje	10.1	10.2	10.3	10.4
Posoda 10						
Tretiranje (cm)	1		2,0x1,9	1,7x2,1	1,5x1,4	1,5x1,3
Patogena gliva			1,5x1,4	2,1x2,0	1,4x1,5	1,8x1,5
Povprečni r (cm)			0,85	0,99	0,73	0,76
Povprečna ploščina (cm ²)			2,27	3,08	1,67	1,81
Tretiranje (cm)	2					
Antagonist						
Tretiranje			1,4x1,6	1,5x1,6	1,0x1,0	1,5x1,2
Antagonist + 2h patog.			1,5x1,2		0,6 x0,7	1,2x1,0
Povprečni r (cm)	3		0,71	0,78	0,41	0,61
Povprečna ploščina (cm ²)			1,58	1,91	0,53	1,17
Tretiranje			1,8x1,6	1,4x1,8	1,6x1,5	1,3x1,4
Antagonist + patogen hkrati			1,3x1,5	2,0x1,8	1,4x1,0	1,3x1,4
Povprečni r (cm)	4		0,78	0,94	0,69	0,68
Povprečna ploščina (cm ²)			1,91	2,77	1,49	1,45
Tretiranje			1,3x1,6	1,7x1,4	1,3x1,4	1,5x1,4
patogena + 2h				1,7x1,5		
Povprečni r (cm)	5		0,73	0,79	0,68	0,73
Povprečna ploščina (cm ²)			1,67	1,96	1,45	1,67
Primerjava tretiranj P4/P1 (%)			84,14	89,94	89,22	80,11
Primerjava tretiranj P3/P5 (%)			94,61	97,45	36,55	70,06
Delež inhibicije I4 (%)			15,86	10,06	10,78	19,89
Delež inhibicije I3 (%)			5,39	2,55	63,45	29,94

se nadaljuje ...

nadaljevanje Priloge H1: Rezultati testiranja pri sorti Gala

Jabolka		Tretiranje	11.1	11.2	11.3	11.4
Posoda 11						
Tretiranje (cm)	1		2,0x1,7	1,8x1,6	1,7x1,4	2,0x1,5
Patogena gliva			1,6x1,5	1,5x1,6	1,4x1,3	2,0x1,8
Povprečni r (cm)			0,85	0,81	0,73	0,91
Povprečna ploščina (cm ²)			2,27	2,06	1,76	2,60
Tretiranje (cm)	2					
Antagonist						
Tretiranje	3		1,6x1,5	1,2x1,6	1,0x0,9	1,5x1,1
Antagonist + 2h patog.						1,5x1,4
Povprečni r (cm)			0,78	0,7	0,48	0,69
Povprečna ploščina (cm ²)			1,91	1,54	0,72	1,4
Tretiranje	4		1,9x1,6	1,5x1,4	1,1x0,8	1,8x1,8
Antagonist + patogen hkrati			1,6x1,4	1,4x1,4	1,1x1,2	1,7x1,7
Povprečni r (cm)			0,81	0,71	0,53	0,88
Povprečna ploščina (cm ²)			2,06	1,58	0,88	2,43
Tretiranje	5		1,9x1,7	1,8x1,3	1,4x1,3	1,6x1,7
patogena + 2h			1,8x1,6	1,7x1,6	1,7x1,4	
Povprečni r (cm)			0,88	0,80	0,73	0,83
Povprečna ploščina (cm ²)			2,43	2,01	1,67	2,16
Primerjava tretiranj P4/P1 (%)			90,75	76,70	52,69	93,46
Primerjava tretiranj P3/P5 (%)			78,60	76,61	43,11	68,98
Delež inhibicije I4 (%)			9,25	23,3	47,31	6,54
Delež inhibicije I3 (%)			21,4	23,39	56,89	31,02
Jabolka		Tretiranje	12.1	12.2		
Posoda 12						
Tretiranje (cm)	1		1,6x1,3	1,5x1,6		
Patogena gliva			1,5x1,3	1,4x1,3		
Povprečni r (cm)			0,71	0,73		
Povprečna ploščina (cm ²)			1,58	1,67		
Tretiranje (cm)	2					
Antagonist						
Tretiranje	3					
Antagonist + 2h patog.						
Povprečni r (cm)						
Povprečna ploščina (cm ²)						
Tretiranje	4		1,3x1,4	1,4x1,4		
Antagonist + patogen hkrati			1,2x1,3	1,2x1,3		
Povprečni r (cm)			0,65	0,66		
Povprečna ploščina (cm ²)			1,33	1,37		
Tretiranje	5					
patogena + 2h						
Povprečni r (cm)						
Povprečna ploščina (cm ²)						
Primerjava tretiranj P4/P1 (%)			84,18	82,04		
Primerjava tretiranj P3/P5 (%)						
Delež inhibicije I4 (%)			15,82	17,96		
Delež inhibicije I3 (%)						

Priloga H2

Rezultati testiranja pri sorti Gloster

Jabolka		Tretiranje	1.1	1.2	1.3	1.4
Posoda 1						
Tretiranje (cm)	1		3,2x3,3	2,6x3,0	2,8x3,0	2,8x2,9
Patogena gliva			3,2x3,0	3,1x3,0	2,7x3,0	2,8x2,9
Povprečni r (cm)			1,59	1,46	1,44	1,43
Povprečna ploščina (cm ²)			7,94	6,69	6,51	6,42
Tretiranje (cm)	2		0	0		
Antagonist			0	0		
Tretiranje	3		2,7x3,0	1,9x2	2,5x2,7	2,5x2,7
Antagonist + 2h patog.			2,7x3,0	2,1x2,0		
Povprečni r (cm)			1,43	1,0	1,3	1,3
Povprečna ploščina (cm ²)	4		6,38	3,14	5,31	5,31
Tretiranje			2,9x3,1	2,4x2,7	2,7x2,8	2,5x2,9
Antagonist + patogen hkrati			2,9x2,9	2,4x2,5	2,7x2,9	2,7x2,9
Povprečni r (cm)			1,48		1,39	1,38
Povprečna ploščina (cm ²)	5		6,88	4,91	6,07	5,98
Tretiranje			2,9x3	2,2x2,7	2,9x3,1	2,6x2,5
patogena + 2h					2,8x2,6	2,8x3,0
Povprečni r (cm)			1,48	1,49	1,43	1,36
Povprečna ploščina (cm ²)			6,88	6,97	6,42	5,81
Primerjava tretiranj P4/P1 (%)			86,65	73,39	93,24	93,15
Primerjava tretiranj P3/P5 (%)			86,65	45,1	82,71	91,35
Delež inhibicije I4 (%)			13,35	26,61	6,76	6,85
Delež inhibicije I3 (%)			13,35	54,9	17,29	8,65
Jabolka		Tretiranje	2.1	2.2	2.3	2.4
Posoda 2						
Tretiranje (cm)	1		2,9x3,0	2,1x2,5	1,9x2,2	2,4x2,6
Patogena gliva			2,9x2,8	2,4x2,5	1,7x2,1	2,2x2,3
Povprečni r (cm)			1,45	1,19	0,99	1,19
Povprečna ploščina (cm ²)			6,60	4,50	3,08	4,45
Tretiranje (cm)	2		0			
Antagonist			0			
Tretiranje	3		2,4x2,5	2,2x2,4	1,5x1,7	1,6x2,0
Antagonist + 2h patog.			2,4x2,5	2,2x2,0		
Povprečni r (cm)			1,23	1,10	0,80	0,9
Povprečna ploščina (cm ²)	4		4,75	3,80	2,01	2,54
Tretiranje			2,6x2,7	2,1x2,2	2,0x2,1	2,1x2,4
Antagonist + patogen hkrati			2,4x2,5	2,4x2,4	1,8x1,7	2,1x2,0
Povprečni r (cm)			1,28	1,14	0,95	1,08
Povprečna ploščina (cm ²)	5		5,14	4,08	2,83	3,66
Tretiranje			3x3,1	2,1x2,3	1,9x2,0	2,1x1,9
patogena + 2h					1,2x1,4	1,9x1,8
Povprečni r (cm)			1,53	1,1	0,81	0,96
Povprečna ploščina (cm ²)			7,35	3,8	2,06	2,89
Primerjava tretiranj P4/P1 (%)			77,88	90,67	91,88	82,25
Primerjava tretiranj P3/P5 (%)			64,63	100	97,57	87,87
Delež inhibicije I4 (%)			22,12	9,33	8,12	17,75

se nadaljuje ...

nadaljevanje Priloge H2: Rezultati testiranja pri sorti Gloster

Delež inhibicije I3 (%)		35,37	0	2,43	12,13	
Jabolka		Tretiranje	3.1	3.2	3.3	3.4
Posoda 3						
Tretiranje (cm)	1	2,5x2,6	3,0x3,3	3,0x3,2	2,8x3,0	
Patogena gliva		2,8x2,9	3,0x3,2	3,0x3,0	3,0x2,7	
Povprečni r (cm)		1,25	1,56	1,53	1,44	
Povprečna ploščina (cm ²)		5,72	7,64	7,35	6,51	
Tretiranje (cm)	2					
Antagonist						
Tretiranje	3	2,4x2,5	2,8x2,9	2,4x2,5	2,5x2,8	
Antagonist + 2h patog.		2,5x2,6	2,7x2,8	2,5x2,6	2,6x2,7	
Povprečni r (cm)		1,25	1,40	1,25	1,33	
Povprečna ploščina (cm ²)		4,91	6,15	4,91	5,55	
Tretiranje	4	2,5x2,7	2,9x3,1	3,0x2,8	2,5x2,8	
Antagonist + patogen hkrati		2,7x2,8	3,0x3,0	2,6x2,5	2,3x2,5	
Povprečni r (cm)		1,34	1,50	1,36	1,26	
Povprečna ploščina (cm ²)		5,64	7,06	5,81	4,99	
Tretiranje	5	2,7x2,9	2,9x3,0	3,0x3,0	2,7x2,7	
patogena + 2h						
Povprečni r (cm)		1,4	1,48	1,50	1,35	
Povprečna ploščina (cm ²)		6,15	6,88	7,07	5,72	
Primerjava tretiranj P4/P1 (%)		98,6	92,41	79,05	76,65	
Primerjava tretiranj P3/P5 (%)		79,84	89,39	69,45	97,03	
Delež inhibicije I4 (%)		1,4	7,59	20,95	23,35	
Delež inhibicije I3 (%)		20,16	10,61	30,55	2,97	
Jabolka		Tretiranje	4.1	4.2	4.3	4.4
Posoda 4						
Tretiranje (cm)	1	2,5x2,8	2,4x2,8	2,5x2,9	2,2x2,6	
Patogena gliva		2,5x2,5	2,5x2,5	2,7x2,6	2,2x2,4	
Povprečni r (cm)		1,29	1,28	1,34	1,18	
Povprečna ploščina (cm ²)		5,23	5,15	5,64	4,37	
Tretiranje (cm)	2					
Antagonist						
Tretiranje	3	2,3x2,4	2,2x2,3	2,1x2,3	2,0x1,9	
Antagonist + 2h patog.				2,3x2,4		
Povprečni r (cm)		1,18	1,13	1,14	0,98	
Povprečna ploščina (cm ²)		4,37	4,01	4,08	3,02	
Tretiranje	4	2,4x2,4	2,4x2,7	2,1x2,5	2,2x2,4	
Antagonist + patogen hkrati		2,5x2,5	2,6x2,5	2,4x2,3	2,1x2,1	
Povprečni r (cm)		1,23	1,28	1,16	1,1	
Povprečna ploščina (cm ²)		4,75	5,15	4,23	3,80	
Tretiranje	5	2,5x2,2	2,2x2,5	2,4x2,4	2,1x2,4	
patogena + 2h		2,5x2,3	2,3x2,4		1,9x2,0	
Povprečni r (cm)		1,19	1,18	1,20	1,05	
Povprečna ploščina (cm ²)		4,45	4,37	4,52	3,46	
Primerjava tretiranj P4/P1 (%)		90,82	100	75,00	86,96	
Primerjava tretiranj P3/P5 (%)		98,20	91,76	90,27	87,28	
Delež inhibicije I4 (%)		9,18	0	25,00	13,04	
Delež inhibicije I3 (%)		1,80	8,24	9,73	12,72	

se nadaljuje ...

nadaljevanje Priloge H2: Rezultati testiranja pri sorti Gloster

Jabolka		Tretiranje	5.1	5.2	5.3	5.4
Posoda 5						
Tretiranje (cm)	1		2,1x2,1	2,4x2,5	1,6x1,6	2,4x2,5
Patogena gliva			2,2x2,1	2,2x2,3	1,7x1,8	2,3x2,3
Povprečni r (cm)			1,06	1,18	0,84	1,19
Povprečna ploščina (cm ²)			3,53	4,37	2,22	4,45
Tretiranje (cm)	2					
Antagonist						
Tretiranje	3		1,8x2,0	2,0x2,0	1,5x1,4	2,2x1,9
Antagonist + 2h patog.			1,5x1,6	1,6x1,6	0,8x1,0	1,8x2,0
Povprečni r (cm)	4		0,86	0,9	0,59	0,99
Povprečna ploščina (cm ²)			2,32	2,54	1,09	3,08
Tretiranje			2,4x2,0	2,4x2,5	1,5x1,3	2,2x2,3
Antagonist + patogen hkrati						
	5		2,1x2,1	2,2x2,3	1,6x1,6	2,1x2,1
Povprečni r (cm)			1,08	1,18	0,75	1,09
Povprečna ploščina (cm ²)			3,66	4,37	1,77	3,73
Tretiranje patogena + 2h			1,8x1,8	2,1x2,4	1,5x1,0	2,3x2,1
Povprečni r (cm)	6		0,9	1,13	0,63	1,1
Povprečna ploščina (cm ²)			2,54	4,01	1,25	3,80
Primerjava tretiranj P4/P1 (%)			103,68	100	79,73	83,82
Primerjava tretiranj P3/P5 (%)			91,34	63,34	87,2	81,05
Delež inhibicije I4 (%)	7		0	0	20,27	16,18
Delež inhibicije I3(%)			8,66	36,66	12,8	18,95
Jabolka		Tretiranje	6.1	6.2	6.3	6.4
Posoda 6						
Tretiranje (cm)	1		2,5x2,9	2,7x2,8	2,5x2,7	2,5x2,7
Patogena gliva			2,7x2,9	2,8x2,9	2,7x3,0	2,4x2,5
Povprečni r (cm)			1,38	1,40	1,36	1,26
Povprečna ploščina (cm ²)			5,98	6,15	5,81	4,99
Tretiranje (cm)	2					
Antagonist						
Tretiranje	3		2,1x2,1	2,4x2,5	2,2x2,5	2,2x2,4
Antagonist + 2h patog.			2,4x2,5	2,4x2,3	2,5x2,5	2,1x2,1
Povprečni r (cm)	4		1,14	1,20	1,21	1,10
Povprečna ploščina (cm ²)			4,08	4,52	4,60	3,80
Tretiranje			2,4x2,5	2,5x2,7	2,6x2,6	2,4x2,6
Antagonist + patogen hkrati			2,5x2,6	2,5x2,6	2,5x2,5	2,2x2,5
Povprečni r (cm)	5		1,25	1,29	1,28	1,21
Povprečna ploščina (cm ²)			4,91	5,23	5,14	4,60
Tretiranje patogena + 2h			2,4x2,3	2,4x2,5	2,4x2,7	2,4x2,6
Povprečni r (cm)			1,18	1,23	1,28	1,25
Povprečna ploščina (cm ²)	6		4,37	4,75	5,14	4,91
Primerjava tretiranj P4/P1 (%)			82,11	85,04	88,47	92,18
Primerjava tretiranj P3/P5 (%)			93,36	95,16	89,50	77,39
Delež inhibicije I4 (%)			17,89	14,96	10,5	7,82
Delež inhibicije I3 (%)	7		6,64	4,84	10,5	22,61

se nadaljuje ...

nadaljevanje Priloge H2: Rezultati testiranja pri sorti Gloster

Jabolka		Tretiranje	7.1	7.2	7.3	7.4
Posoda 7						
Tretiranje (cm)	1		2,2x2,3	2,2x2,5	2,5x2,7	2,3x2,4
Patogena gliva			2,1x2,1	2,2x2,2	2,4x2,3	2,4x2,3
Povprečni r (cm)			1,09	1,14	1,24	1,18
Povprečna ploščina (cm ²)			3,73	4,08	4,83	4,37
Tretiranje (cm)	2					
Antagonist						
Tretiranje	3		1,8x1,7	1,7x1,1	2,0x2,4	2,0x2,1
Antagonist + 2h patog.					1,9x1,9	2,0x2,2
Povprečni r (cm)	4		0,88	0,70	1,03	1,08
Povprečna ploščina (cm ²)			2,43	1,54	3,33	3,66
Tretiranje			2,2x1,9	2,2x2,3	2,3x2,6	2,2x2,5
Antagonist + patogen hkrati			1,8x1,8	2,1x2,3	2,2x2,3	2,3x2,4
Povprečni r (cm)	5		0,96	1,11	1,18	1,18
Povprečna ploščina (cm ²)			2,89	3,87	4,37	4,37
Tretiranje			2,2x2,1	2,0x1,8	2,1x2,2	2,0x2,3
patogena + 2h			1,8x1,9	1,8x1,8		
Povprečni r (cm)			1,00	0,93	1,08	1,08
Povprečna ploščina (cm ²)			4,14	2,72	3,66	3,66
Primerjava tretiranj P4/P1 (%)			77,48	94,85	90,48	100
Primerjava tretiranj P3/P5 (%)			58,7	56,62	90,98	100
Delež inhibicije I4 (%)			22,52	5,15	9,52	0
Delež inhibicije I3 (%)			41,30	43,38	9,02	0
Jabolka		Tretiranje	8.1	8.2	8.3	8.4
Posoda 8						
Tretiranje (cm)	1		2,3x2,5	2,5x2,8	2,3x2,3	2,0x2,3
Patogena gliva			2,4x2,4	2,5x2,5	2,1x2,2	2,2x2,1
Povprečni r (cm)			1,0	1,29	1,11	1,08
Povprečna ploščina (cm ²)			4,52	5,23	3,87	3,66
Tretiranje (cm)	2					
Antagonist						
Tretiranje	3		2,1x2,4	2,3x2,3	2,1x1,9	2,0x1,9
Antagonist + 2h patog.			2,0x1,9	1,8x1,8	2,1x2,1	
Povprečni r (cm)	4		1,05	1,03	1,03	0,98
Povprečna ploščina (cm ²)			3,46	3,33	3,33	3,02
Tretiranje			2,1x2,3	2,2x2,4	2,2x2,1	2,2x2,2
Antagonist + patogen hkrati			2,0x2,1	2,0x2,1	2,2x2,3	2,1x2,1
Povprečni r (cm)	5		1,06	1,09	1,10	1,08
Povprečna ploščina (cm ²)			3,53	3,73	3,80	3,66
Tretiranje			2,2x2,5	2,1x2,1	2,2x2,0	2,1x2,1
patogena + 2h						2,0x2,1
Povprečni r (cm)			1,18	1,05	1,05	1,04
Povprečna ploščina (cm ²)			4,37	3,46	3,46	3,40
Primerjava tretiranj P4/P1 (%)			78,10	71,32	98,19	100
Primerjava tretiranj P3/P5 (%)			79,18	96,24	96,24	88,82
Delež inhibicije I4 (%)			21,9	28,68	1,81	0
Delež inhibicije I3 (%)			20,82	3,76	3,76	11,18

se nadaljuje ...

nadaljevanje Priloge H2: Rezultati testiranja pri sorti Gloster

Posoda 9	Jabolka				
	Tretiranje	9.1	9.2	9.3	9.4
Tretiranje (cm)	1	2,1x2,4	2,5x2,6	2,1x1,9	1,4x1,9
Patogena gliva		2,0x2,3	2,4x2,5	2,0x2,1	1,8x2,0
Povprečni r (cm)		1,10	1,25	1,01	0,89
Povprečna ploščina (cm ²)		3,80	4,91	3,20	2,49
Tretiranje (cm)	2				
Antagonist					
Tretiranje	3	0,8x1,4	2,2x2,5	1,8x2,1	0,7x0,6
Antagonist + 2h patog.			2,2x2,3	1,5x1,0	
Povprečni r (cm)		0,55	1,15	0,80	0,33
Povprečna ploščina (cm ²)		0,95	4,15	2,01	0,34
Tretiranje	4	2,0x2,1	2,5x2,6	1,8x2,0	1,9x1,6
Antagonist + patogen hkrati		2,0x2,1	2,6x2,4	1,9x2,0	1,9x1,7
Povprečni r (cm)		1,03	1,26	0,96	0,89
Povprečna ploščina (cm ²)		3,33	4,99	2,89	2,49
Tretiranje	5	1,5x1,0	2,3x2,5	2,1x2,0	1,0x1,0
patogena + 2h		1,0x1,6			0,5x0,5
Povprečni r (cm)		0,64	1,2	1,03	0,38
Povprečna ploščina (cm ²)		1,29	4,52	3,33	0,45
Primerjava tretiranj P4/P1 (%)		87,63	101,63	90,31	100
Primerjava tretiranj P3/P5 (%)		73,64	91,81	60,36	75,56
Delež inhibicije I4 (%)		12,37	0	9,69	0
Delež inhibicije I3 (%)		26,36	8,19	39,64	24,44

Priloga H3

Rezultati testiranja pri sorti Zlati delišes

Jabolka		Tretiranje	1.1	1.2	1.3	1.4
Posoda 1						
Tretiranje (cm)	1		2,3x2,6	2,2x2,2	2,2x2,2	2,3x2,6
Patogena gliva			2,3x2,5	2,0x1,9	2,0x2,1	2,3x2,3
Povprečni r(cm)			1,21	1,04	1,06	1,19
Povp.ploščina (cm ²)			4,60	3,40	3,53	4,45
Tretiranje (cm)	2					
Antagonist						
Tretiranje		3	1,9x2,2	1,7x1,2	2,0x2,1	2,0x2,2
Antagonist + 2h patog.			2,1x2,1	1,4x1,4	1,7x1,3	2,0x2,0
Povprečni r (cm)		1,04	0,71	0,89	1,03	
Povprečna ploščina (cm ²)		3,40	1,58	2,49	3,33	
Tretiranje	4	2,1x2,3	1,8x1,8	2,0x2,1	2,3x2,4	
Antagonist + patogen hkrati		2,2x2,2	1,9x1,8	2,1x2,0	2,2x2,3	
Povprečni r (cm)			1,10	0,91	1,03	1,15
Povprečna ploščina (cm ²)			3,80	2,60	3,33	4,15
Tretiranje	5	2,2x2,5	1,5x1,3	1,9x1,9	2,2x2,3	
patogena + 2h						
Povprečni r (cm)			1,18	0,70	0,95	1,13
Povprečna ploščina (cm ²)			4,37	1,54	2,83	4,01
Primerjava tretiranj P4/P1 (%)		82,6	76,47	94,33	93,26	
Primerjava tretiranj P3/P5 (%)		77,8	102,6	87,99	83,04	
Delež inhibicije I4 (%)		17,4	23,53	5,67	6,74	
Delež inhibicije I3 (%)		22,2	0	12,01	16,96	
Jabolka		Tretiranje	2.1	2.2	2.3	2.4
Posoda 2						
Tretiranje (cm)	1		2,2x2,3	2,0x2,1	2,1x2,4	2,4x2,5
Patogena gliva			2,1x2,0	1,7x1,8	2,0x2,2	2,4x2,4
Povprečni r (cm)			1,08	0,95	1,09	1,21
Povprečna ploščina (cm ²)			3,66	2,83	3,73	4,60
Tretiranje (cm)	2					
Antagonist						
Tretiranje		3	1,9x1,9	1,5x1,8	1,6x1,8	2,2x2,1
Antagonist + 2h patog.			1,7x2,0			
Povprečni r (cm)		0,94	0,83	0,85	1,08	
Povprečna ploščina (cm ²)		2,77	2,16	2,27	3,66	
Tretiranje	4	2,1x2,1	1,8x2,0	2,0x2,1	2,3x2,3	
Antagonist + patogen hkrati		2,1x2,1	1,8x1,9	2,1x2,0	2,5x2,2	
Povprečni r (cm)			1,05	0,94	1,03	1,16
Povprečna ploščina (cm ²)			3,46	2,77	3,33	4,23
Tretiranje	5	1,9x2,1	1,7x1,9	2,0x2,2	2,4x2,5	
patogena + 2h			1,6x1,6	2,0x2,0	2,2x2,3	
Povprečni r (cm)			1,00	0,85	1,03	1,18
Povprečna ploščina (cm ²)			3,14	2,27	3,33	4,37
Primerjava tretiranj P4/P1(%)		94,54	97,88	89,28	91,96	
Primerjava tretiranj P3/P5(%)		88,22	95,15	68,17	83,75	

se nadaljuje ...

nadaljevanje Priloge H3: Rezultati testiranja pri sorti Zlati delišes

Delež inhibicije I4 (%)		5,46	2,12	10,72	8,04
Delež inhibicije I3(%)		11,78	4,85	31,83	16,25
Jabolka					
Tretiranje		3.1	3.2	3.3	3.4
Posoda 3					
Tretiranje (cm)	1	2,2x2,5	2,1x2,2	2,1x2,4	2,1x2,4
Patogena gliva		2,3x2,4	1,8x1,9	2,4x2,2	2,4x2,5
Povprečni r (cm)		1,18	1,00	1,14	1,18
Povprečna ploščina (cm ²)		4,37	3,14	4,08	4,37
Tretiranje (cm)	2				
Antagonist					
Tretiranje	3	1,8x1,9	1,9x2,0	2,0x1,6	2,0x1,9
Antagonist + 2h patog.		2,1x2,0		1,7x1,8	
Povprečni r (cm)		0,98	0,98	0,89	0,98
Povprečna ploščina (cm ²)		3,02	3,02	2,49	3,02
Tretiranje	4	2,0x1,9	1,9x2,0	2,1x2,0	2,2x2,5
Antagonist + patogen hkrati		1,9x2,1	1,9x1,8	2,1x2,1	2,1x2,4
Povprečni r (cm)		0,99	0,95	1,04	1,15
Povprečna ploščina (cm ²)		3,08	2,83	3,40	4,15
Tretiranje	5	2,1x2,8	2,0x2,1	2,0x1,9	2,2x2,4
patogena + 2h			2,1x1,8		2,3x2,2
Povprečni r (cm)		1,23	1,0	0,98	1,14
Povprečna ploščina (cm ²)		4,75	3,14	3,02	4,08
Primerjava tretiranj P4/P1 (%)		70,48	90,13	83,33	94,97
Primerjava tretiranj P3/P5 (%)		63,58	96,18	82,45	74,02
Delež inhibicije I4 (%)		29,52	9,87	16,67	5,05
Delež inhibicije I3 (%)		36,42	3,82	17,55	25,98
Jabolka					
Tretiranje		4.1	4.2	4.3	4.4
Posoda 4					
Tretiranje (cm)	1	2,6x2,7	2,1x2,0	1,9x2,1	
Patogena gliva		2,4x2,5	2,1x2,1	1,9x1,9	
Povprečni r (cm)		1,28	1,04	0,98	
Povprečna ploščina (cm ²)		5,14	3,40	3,02	
Tretiranje (cm)	2				
Antagonist					
Tretiranje	3	2,4x2,2	1,7x1,9	1,7x1,8	2,5x2,5
Antagonist + 2h patog.			1,9x1,8	1,7x1,5	2,1x2,3
Povprečni r (cm)		1,15	0,91	0,84	1,18
Povprečna ploščina (cm ²)		4,15	2,60	2,22	4,37
Tretiranje	4	1,9x2,0	2,0x2,1	1,9x2,0	
Antagonist + patogen hkrati		2,0x2,0	2,1x2,1	1,8x2,0	
Povprečni r (cm)		0,99	1,04	0,96	
Povprečna ploščina (cm ²)		3,08	3,40	2,89	
Tretiranje	5	2,3x2,5	1,9x1,7	1,8x1,7	2,3x2,1
patogena + 2h		2,3x2,3			
Povprečni r (cm)		1,18	0,90	0,88	1,1
Povprečna ploščina (cm ²)		4,37	2,54	2,43	3,80
Primerjava tretiranj P4/P1 (%)		59,92		95,67	
Primerjava tretiranj P3/P5 (%)		95,0		91,36	
Delež inhibicije I4 (%)		40,08	0	4,33	
Delež inhibicije I3 (%)		5,0	0	8,64	

se nadaljuje ...

nadaljevanje Priloge H3: Rezultati testiranja pri sorti Zlati delišes

Jabolka		Tretiranje	5.1	5.2	5.3	5.4
Posoda 5						
Tretiranje (cm)	1		2,1x2,2	2,4x2,6	2,1x2,4	2,2x2,4
Patogena gliva			2,4x2,4	2,3x2,4	2,3x2,4	2,1x2,2
Povprečni r (cm)			1,14	1,21	1,15	1,11
Povprečna ploščina (cm ²)			4,08	4,60	4,15	3,87
Tretiranje (cm)	2					
Antagonist						
Tretiranje			1,9x2,0	2,1x2,4	2,2x2,1	2,0x1,3
Antagonist + 2h patog.			2,0x1,8	2,1x2,2		1,8x1,7
Povprečni r (cm)	3		0,96	1,10	1,08	0,85
Povprečna ploščina (cm ²)			2,89	3,80	3,66	2,27
Tretiranje			2,2x2,3	2,2x2,6	2,0x2,0	2,3x2,4
Antagonist + patogen hkrati						
Povprečni r (cm)	4		2,3x2,3	2,4x2,4	2,0x2,1	2,1x2,1
Povprečna ploščina (cm ²)			1,14	1,20	1,01	1,11
Tretiranje			2,1x1,9	2,3x2,3	2,3x2,5	2,0x1,9
patogena + 2h					2,3x2,4	
Povprečni r (cm)	5		1,0	1,15	1,19	0,98
Povprečna ploščina (cm ²)			3,14	4,15	4,45	3,02
Primerjava tretiranj P4/P1 (%)				98,26	77,11	
Primerjava tretiranj P3/P5 (%)			92,04	91,57	82,25	75,17
Delež inhibicije I4 (%)			0	1,74	22,89	0
Delež inhibicije I3 (%)			7,96	8,43	17,75	24,83

Jabolka		Tretiranje	6.1	6.2	6.3	6.4
Posoda 6						
Tretiranje (cm)	1		2,0x2,0	2,6x2,8	1,9x2,0	2,4x2,4
Patogena gliva			2,0x1,7	2,5x2,8	1,7x1,8	2,4x2,4
Povprečni r (cm)			0,96	1,34	0,93	1,20
Povprečna ploščina (cm ²)			2,89	5,64	2,71	4,52
Tretiranje (cm)	2					
Antagonist						
Tretiranje			1,5x1,7	2,3x2,2	1,8x2,0	2,5x2,6
Antagonist + 2h patog.			1,3x1,4	2,3x2,4	1,5x1,6	2,3x2,2
Povprečni r (cm)	3		0,74	1,15	0,86	1,20
Povprečna ploščina (cm ²)			1,72	4,15	2,32	4,52
Tretiranje			1,7x2,0	2,7x2,7	1,8x2,0	1,9x2,2
Antagonist + patogen hkrati			1,8x1,7	2,5x2,5	1,8x1,6	2,6x2,5
Povprečni r (cm)	4		0,90	1,30	0,9	1,15
Povprečna ploščina (cm ²)			2,54	5,31	2,54	4,15
Tretiranje patogena + 2h						
Povprečni r (cm)						
Povprečna ploščina (cm ²)	5					
Primerjava tretiranj P4/P1 (%)			87,89	94,15	93,73	91,81
Primerjava tretiranj P3/P5 (%)						
Delež inhibicije I4 (%)			12,11	5,85	6,27	8,19
Delež inhibicije I3 (%)						

se nadaljuje ...

nadaljevanje Priloge H3: Rezultati testiranja pri sorti Zlati delišes

Jabolka		Tretiranje	7.1	7.2	7.3	7.4
Posoda 7						
Tretiranje (cm)	1		2,0x2,2	2,0x2,1	1,6x1,6	2,0x2,0
Patogena gliva			2,0x2,0	2,0x2,0	1,8x1,7	1,9x2,1
Povprečni r (cm)			1,03	1,01	0,84	1,00
Povprečna ploščina (cm ²)			3,33	3,20	2,22	3,14
Tretiranje (cm)	2					
Antagonist						
Tretiranje	3		1,9x1,8	1,6x1,2	1,9x2,1	1,7x1,8
Antagonist + 2h patog.				1,2x1,5	1,8x1,9	
Povprečni r (cm)			0,93	0,69	0,96	0,83
Povprečna ploščina (cm ²)			2,72	1,49	2,89	2,43
Tretiranje	4		2,0x2,0	2,1x2,2	1,7x1,5	2,0x1,9
Antagonist + patogen hkrati			1,8x1,8	1,8x1,9	1,6x1,7	1,9x2,1
Povprečni r (cm)			0,95	1,00	0,81	0,93
Povprečna ploščina (cm ²)			2,83	3,14	2,06	3,08
Tretiranje	5		2,0x2,3	1,8x1,7	2,0x2,4	1,8x1,7
patogena + 2h			1,9x1,9			1,8x1,8
Povprečni r (cm)			1,01	0,88	1,10	0,89
Povprečna ploščina (cm ²)			3,20	2,43	3,80	2,49
Primerjava tretiranj P4/P1 (%)			84,98	98,1	92,79	98,09
Primerjava tretiranj P3/P5 (%)			85,00	61,32	76,05	97,60
Delež inhibicije I4 (%)			15,02	1,9	7,21	1,91
Delež inhibicije I3 (%)			15,00	38,68	23,95	2,40
Jabolka		Tretiranje	8.1	8.2	8.3	8.4
Posoda 8						
Tretiranje (cm)	1		2,0x2,4	2,2x2,3	1,8x2,2	2,2x2,4
Patogena gliva			2,2x2,3	2,0x2,0	2,1x2,1	2,2x2,3
Povprečni r (cm)			1,11	1,06	1,03	1,14
Povprečna ploščina (cm ²)			3,87	3,53	3,33	4,08
Tretiranje (cm)	2					
Antagonist						
Tretiranje	3		2,0x2,1	1,8x1,8	2,0x1,9	2,0x1,9
Antagonist + 2h patog.				1,6x1,7	1,9x1,8	
Povprečni r (cm)			1,03	0,86	0,95	0,98
Povprečna ploščina (cm ²)			3,33	2,32	2,83	3,02
Tretiranje	4		2,0x2,3	2,2x2,2	2,0x1,9	2,1x2,3
Antagonist + patogen hkrati			2,1x2,1	2,0x2,0	2,0x2,1	2,1x2,2
Povprečni r (cm)			1,06	1,05	1,00	1,09
Povprečna ploščina (cm ²)			3,53	3,46	3,14	3,73
Tretiranje	5		2,0x2,2	2,0x2,2	2,1x1,7	1,9x2,0
patogena + 2h			2,1x2,4			2,1x2,0
Povprečni r (cm)			1,09	1,05	0,95	1,00
Povprečna ploščina (cm ²)			3,73	3,46	2,83	3,14
Primerjava tretiranj P4/P1 (%)			91,21	98,02	94,29	91,42
Primerjava tretiranj P3/P5 (%)			89,28	67,05		96,18
Delež inhibicije I4 (%)			8,79	1,98	5,71	8,58
Delež inhibicije I3 (%)			10,72	32,95	0	3,82

se nadaljuje ...

nadaljevanje Priloge H3: Rezultati testiranja pri sorti Zlati delišes

Posoda 9	Jabolka				
	Tretiranje	9.1	9.2	9.3	9.4
Tretiranje (cm)	1	2,2x2,4	2,5x2,7	2,4x2,4	2,4x2,7
Patogena gliva		2,4x2,4	2,5x2,6	2,1x2,2	2,4x2,3
Povprečni r (cm)		1,18	1,29	1,14	1,23
Povprečna ploščina (cm ²)		4,37	5,23	4,08	4,75
Tretiranje (cm)	2				
Antagonist					
Tretiranje	3	2,2x2,3	2,4x2,5	2,0x2,0	2,0x2,4
Antagonist + 2h patog.		2,3x2,3	2,3x2,4	2,0x1,9	
Povprečni r (cm)		1,14	1,20	0,99	1,10
Povprečna ploščina (cm ²)		4,08	4,52	3,08	3,80
Tretiranje	4	2,3x2,3	2,4x2,7	2,1x2,1	2,4x2,4
Antagonist + patogen hkrati		2,3x2,3	2,4x2,5	2,0x2,0	2,4x2,3
Povprečni r (cm)		1,15	1,25	1,03	1,19
Povprečna ploščina (cm ²)		4,15	4,91	3,33	4,45
Tretiranje	5	2,4x2,5	2,5x2,3	2,0x2,0	2,3x2,4
patogena + 2h					2,3x2,3
Povprečni r (cm)		1,23	1,2	1,00	1,16
Povprečna ploščina (cm ²)		4,75	4,52	3,14	4,23
Primerjava tretiranj P4/P1 (%)		94,97	93,88	81,62	93,68
Primerjava tretiranj P3/P5 (%)		85,89		98,09	89,83
Delež inhibicije I4 (%)		5,03	6,12	18,38	6,32
Delež inhibicije I3 (%)		14,11	0	1,91	10,17