

UNIVERZITET U BEOGRADU  
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Kristina P. Petrović

**MORFOLOŠKA, MOLEKULARNA I  
PATOGENA KARAKTERIZACIJA VRSTA  
*DIAPORTHE/PHOMOPSIS* NA SOJI U SRBIJI**

doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF AGRICULTURE

Kristina P. Petrović

**MORPHOLOGICAL, MOLECULAR AND  
PATHOGENIC CHARACTERIZATION OF SPECIES  
*DIAPORTHE/PHOMOPSIS* ON SOYBEAN  
IN SERBIA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

Komisija za pregled i odbranu:

Mentor: Dr Mirko Ivanović, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu - Poljoprivredni fakultet

Članovi komisije: Dr Miloš Vidić, naučni savetnik  
Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad

Dr Branka Krstić, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu - Poljoprivredni fakultet

Dr Vuk Đorđević, naučni saradnik  
Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad

Dr Aleksandra Bulajić, vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu - Poljoprivredni fakultet

Datum odbrane:



*"Život se može razumeti samo gledajući unazad,  
ali se može živeti samo gledajući unapred"*

(Soren Kierkegaard)

Mojoj majci...

Mojoj deci...



## MORFOLOŠKA, MOLEKULARNA I PATOGENA KARAKTERIZACIJA VRSTA *DIAPORTHE/PHOMOPSIS* NA SOJI U SRBIJI

**Rezime.** Endofitne vrste roda *Diaporthe/Phomopsis* imaju izuzetno širok spektar domaćina i u biljkama mogu biti prisutne kao patogeni ili saprofiti. Na stablu i semenu soje (*Glycine max* (L.) Merr.), vrste ovog roda prouzrokuju kompleks oboljenja i spadaju u grupu značajnih parazita ove biljne vrste. Kao paraziti soje opisane su vrste *Diaporthe phaseolorum* i *Phomopsis longicolla*. U okviru prvo pomenute vrste razlikuju se tri varijeteta, i to: *D. phaseolorum* var. *sojae*, *D. phaseolorum* var. *caulivora* i *D. phaseolorum* var. *meridionalis*. Iako su u mnogobrojnim istraživanjima detaljno opisane morfološke i odgajivačke karakteristike ovih patogena, njihova taksonomija još uvek nije u potpunosti definisana. Najveća taksonomska nedoumica odnosi se na *D. phaseolorum* var. *sojae*, jer je u okviru ovog varijeteta uočena izražena varijabilnost morfoloških karakteristika. S obzirom da je morfološka varijabilnost *D. phaseolorum* var. *sojae* uočena i kod izolata poreklom iz Srbije, ukazala se potreba za detaljnim ispitivanjem, kako bi se tačno utvrdile prisutne *Diaporthe/Phomopsis* vrste na soji u Srbiji. Uporednim proučavanjem morfoloških, molekularnih i patogenih karakteristika, identifikovano je ukupno sedam vrsta roda *Diaporthe/Phomopsis*. Pored poznatih parazita, *P. longicolla*, *D. phaseolorum* var. *sojae* i *D. phaseolorum* var. *caulivora*, na semenu soje su detektovane i vrste *D. neotheicola*, *D. eres*, *D. viticola* i neidentifikovana grupa *Phomopsis* sp. 9. Identifikacija i filogenetsko grupisanje *Diaporthe/Phomopsis* vrsta sprovedeno je na osnovu sekvenci ITS regiona i dela LSU i TEF<sub>1-α</sub> gena. U cilju iznalaženja bržeg načina detekcije i identifikacije, ITS sekvence proučavanih vrsta poslužile su za virtuelnu digestiju restrikcionim enzimima *AluI*, *RsaI*, *HhaI*, *MseI* i *StyI*. S obzirom da su za svaku proučavanu vrstu dobijeni različiti molekularni profili, konstatovano je da PCR-RFLP tehnika potencijalno može biti korisna metoda za brzu i pouzdanu identifikaciju *Diaporthe/Phomopsis* vrsta koje se javljaju na soji. Proučavanjem morfoloških karakteristika identifikovanih vrsta, utvrđeno je da se dimenzije reproduktivnih organa preklapaju, ali i da veoma variraju između izolata unutar jedne vrste, kao i unutar samog izolata. Na osnovu toga, izveden je zaključak da

dimenzije reproduktivnih organa nisu pouzdani pokazatelji pri identifikaciji *Diaporthe/Phomopsis* vrsta izolovanih iz soje. Međutim, na osnovu prisustva ili odsustva peritecija, piknida,  $\alpha$  i  $\beta$  konidija, donekle je moguće razlikovati vrste ovog kompleksa. Primenom različitih testova patogenosti ispitana je virulentnost identifikovanih vrsta na biljkama i semenu soje, a kao najpatogenije izdvojene su *P. longicolla*, *Phomopsis* sp. 9, *D. phaseolorum* var. *caulivora* i *D. phaseolorum* var. *sojae*, dok su *D. viticola* i *D. eres* ispoljile patogenost samo na semenu. Takođe, utvrđeno je da sve proučavane vrste mogu da završe životni ciklus na biljkama soje, što ukazuje da je soja izuzetno pogodna biljka domaćin za vrste roda *Diaporthe/Phomopsis*. U ovom istraživanju, *D. phaseolorum* var. *sojae* izdvojen je od druga dva varijeteta (*D. phaseolorum* var. *caulivora* i *D. phaseolorum* var. *meridionalis*) i preklasifikovan u basionim *Diaporthe sojae*. Takođe, utvrđeno je da *D. eres*, *P. occulta* i *D. conorum* predstavljaju tri različite ITS populacije, koje su taksonomski označene kao izrazito varijabilna grupa *D. eres*. Iz grupe izolata, koji su prethodno determinisani kao *P. longicolla*, izdvojeno je nekoliko izolata koji su označeni kao neidentifikovana grupa *Phomopsis* sp. 9. S obzirom da postoji izražena sličnost, u pogledu morfoloških i patogenih karakteristika, između *P. longicolla* i *Phomopsis* sp. 9 izolata, za neidentifikovanu grupu *Phomopsis* sp. 9 predložen je taksonomski naziv *Diaporthe pseudologicolla* nom. nov.

**Ključne reči:** soja, *Diaporthe/Phomopsis*, ITS, LSU, TEF<sub>1</sub>- $\alpha$ , filogenija, PCR-RFLP, morfologija, patogenost, taksonomija

**Naučna oblast:** Biotehničke nauke

**Uža naučna oblast:** Fitopatologija

**UDK:** 633.34:632.4(497.11)(043.3)

## MORPHOLOGICAL, MOLECULAR AND PATHOGENIC CHARACTERIZATION OF SPECIES *DIAPORTHE/PHOMOPSIS* ON SOYBEAN IN SERBIA

**Abstract.** Species of the genus *Diaporthe/Phomopsis* are endophytes on a very wide range of hosts and can be present as pathogens or saprophytes. Species of this genus cause a complex of diseases on the stem and seeds of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) and therefore belong to a group of important parasites of this plant. *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* were described as soybean pathogens. The first species includes three varieties: *D. phaseolorum* var. *sojae*, *D. phaseolorum* var. *caulivora* and *D. phaseolorum* var. *meridionalis*. Although several studies have extensively described the morphological and culture characteristics of these pathogens, their taxonomy has not fully been defined. The greatest taxonomic confusion is related to *D. phaseolorum* var. *sojae*, because this variety expressed variability of morphological characteristics. Since morphological variability of *D. phaseolorum* var. *sojae* was also observed in isolates from Serbia, there were needs for detailed examinations in order to exactly determine which *Diaporthe/Phomopsis* species are present on soybean in Serbia. By comparison of morphological, molecular and pathogenic data seven *Diaporthe/Phomopsis* species were identified. Besides the known parasites, *D. neotheicola*, *D. eres*, *D. viticola* and unidentified group *Phomopsis* sp. 9 were also detected on soybean seeds. Identification and phylogenetic grouping was performed based on sequences of ITS region and parts of LSU and TEF<sub>1</sub>- $\alpha$  genes. In order to find faster ways of detection and identification, ITS sequences of the studied species were used for the virtual digestion with restriction enzymes *AluI*, *RsaI*, *HhaI*, *MseI*, and *StyI*. Since different molecular profiles were generated for each studied species, it was concluded that PCR-RFLP technique can potentially be a useful method for rapid and reliable identification of *Diaporthe/Phomopsis* species that occur on soybean. By studying morphological characteristics of the identified species, it was found that the dimensions of reproductive organs overlapping, but also that they vary between isolates within a species, as well as within the isolates. Based on this, it was concluded that dimensions of reproductive organs are not reliable parameters for identification of *Diaporthe/Phomopsis* species isolated from soybeans.

However, based on the presence or absence of perithecia, pycnidia,  $\alpha$  and  $\beta$  conidia, it was partially possible to distinguish species of this complex. Virulence of the studied species was examined using different pathogenicity tests on plants and seeds of soybean, and *P. longicolla*, *Phomopsis* sp. 9, *D. phaseolorum* var. *caulivora* and *D. phaseolorum* var. *sojae* were selected as the most pathogen species, while *D. viticola* and *D. eres* expressed pathogenicity only on seeds. Also, it was found that all studied species can complete their life cycle on soybean plants, indicating that the soybean is a very suitable host plant for species of the genus *Diaporthe/Phomopsis*. In this study, *D. phaseolorum* var. *sojae* was separated from the other two varieties (*D. phaseolorum* var. *caulivora* and *D. phaseolorum* var. *meridionalis*) and reclassified in basionym *Diaporthe sojae*. Also, it was found that *D. eres*, *P. occulta* and *D. conorum* represent three different ITS populations, which are taxonomically classified as highly variable group *D. eres*. From the group of isolates that were previously determined as *P. longicolla*, several isolates marked as unidentified group *Phomopsis* sp. 9 were separated. Due to observed similarity in morphological and pathogenic characteristics between *P. longicolla* and *Phomopsis* sp. 9 isolates, a taxonomic name *Diaporthe pseudologicolla* nom. nov. was proposed for the unidentified group *Phomopsis* sp. 9.

**Key words:** soybean, *Diaporthe/Phomopsis*, ITS, LSU, TEF<sub>1</sub>- $\alpha$ , phylogeny, PCR-RFLP, morphology, pathogenicity, taxonomy

**Scientific field:** Biotechnical Science

**Specialized scientific field:** Phytopathology

**UDC:** 633.34:632.4(497.11)(043.3)



## SKRAĆENICE I SIMBOLI

AIC	Akaike Information Criterion
ATCC	American Type Culture Collection, Manassas, USA
AUDPC	Area Under a Disease Progress Curve
BIC	Bayesian Information Criterion
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	bazni par
CBS	The Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Netherlands
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
dNTP	dezoksiribonukleotid - trifosfat
EDTA	etilen - diamino - tetra - acetatna kiselina
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
hLRT	hierarchical Likelihood Ratio Tests
ICN	International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants
IGS	Inter Genic Spacer
IMI	International Mycological Institute, Egham, UK
ITS	Internal Transcribed Spacer
LSU	Large Subunit (28S) Velika subjedinica ribozomalnog gena (28S)
MAFF	The Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan (NIAS)
MAT	Mating-type lokus
MSP-PCR	Microsatellite-Primed PCR
NCBI	The National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA
NIAS	The National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Japan
PCR	Polymerase Chain Reaction Lančana reakcija polimeraze
PDA	Potato Dextrose Agar Krompir dekstrozna podloga
PDB	Potato Dextrose Broth Krompir dekstrozna tečna podloga
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA Slučajno umnožavanje polimorfne DNK
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism Polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata
SDS	natrijum dodecil sulfat
SSU	Small Subunit (18S) Mala subjedinica ribozomalnog gena (18S)
<i>Taq</i>	DNK polimeraza izolovana iz <i>Thermus aquaticus</i>
TEF1- $\alpha$	Translacioni elongacioni faktor 1 - $\alpha$
Tris	2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	4
<b>3. PREGLED LITERATURE</b> .....	5
3.1. Sistematika roda <i>Diaporthe/Phomopsis</i> .....	5
3.2. Istorijski pregled taksonomije <i>Diaporthe/Phomopsis</i> vrsta .....	5
3.3. Novi pristupi u taksonomiji roda <i>Diaporthe/Phomopsis</i> .....	10
3.4. Filogenetska obrada molekularnih podataka .....	15
3.5. Patogenost <i>Diaporthe/Phomopsis</i> vrsta .....	17
<b>4. RADNA HIPOTEZA</b> .....	20
<b>5. MATERIJAL I METODE RADA</b> .....	21
5.1. Izolacija gljiva .....	21
5.2. Ekstrakcija DNK .....	27
5.3. Lančana reakcija polimeraze (PCR) .....	28
5.4. Sekvencioniranje .....	29
5.5. Analiza sekvenci i identifikacija BLAST metodom .....	30
5.6. Filogenetska obrada podataka .....	30
5.7. Identifikacija PCR-RFLP metodom .....	32
5.8. Morfološke i odgajivačke karakteristike .....	32
5.9. Patogenost .....	33
5.9.1. Inokulacija biljaka soje .....	33
5.9.2. Inokulacija semena soje .....	34
5.9.3. Statistička obrada podataka .....	35
<b>6. REZULTATI</b> .....	36
6.1. Izolacija gljiva .....	36
6.2. Amplifikacija ITS regiona i dela LSU i TEF <sub>1</sub> - $\alpha$ gena .....	39
6.3. Analiza sekvenci i identifikacija BLAST metodom .....	39
6.4. Filogenetske analize .....	46
6.4.1. ITS filogenija .....	46
6.4.2. LSU filogenija .....	50

6.4.3. TEF <sub>1</sub> -α filogenija.....	53
6.5. Identifikacija PCR-RFLP metodom .....	55
6.6. Morfološki profil <i>Diaporthe/Phomopsis</i> vrsta .....	56
6.7. Patogenost <i>Diaporthe/Phomopsis</i> vrsta .....	71
6.7.1. Provera patogenosti na biljkama soje.....	71
6.7.2. Provera patogenosti na semenu soje .....	77
6.7.3. Poređenje testova patogenosti.....	80
6.8. Taksonomija <i>Diaporthe/Phomopsis</i> vrsta.....	82
<b>7. DISKUSIJA.....</b>	<b>88</b>
7.1. BLAST identifikacija i filogenetske analize .....	88
7.2. Primena PCR-RFLP metode u detekciji i identifikaciji.....	92
7.3. Morfološki profil <i>Diaporthe/Phomopsis</i> vrsta .....	93
7.4. Patogenost <i>Diaporthe/Phomopsis</i> vrsta .....	98
7.5. Taksonomija <i>Diaporthe/Phomopsis</i> vrsta.....	100
<b>8. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>105</b>
<b>9. LITERATURA.....</b>	<b>107</b>
<b>10. PRILOZI.....</b>	<b>125</b>
BIOGRAFIJA.....	136

# 1. UVOD

Soja (*Glycine max* (L.) Merr.) spada u red najznačajnijih proteinsko-uljanih kultura. Njen veliki privredni značaj ogleda se u hemijskom sastavu zrna, u kome se nalazi oko 40% proteina i oko 20% ulja, odnosno više od 60% hranljivih materija koje se mogu upotrebiti u različite svrhe (**Hrustić et al., 2008**). Soja se početkom XX veka gajila samo u nekoliko zemalja, da bi krajem prošlog veka bila svrstana u red vodećih ratarskih useva u svetu. Od sredine XX veka površine pod sojom naglo rastu, a poslednjih godina prelaze 90 miliona hektara. U našoj zemlji ova biljna vrsta je poznata od XIX veka, a značajniji udeo u gajenju i preradi dobila je tek početkom osamdesetih godina prošlog veka (**Hrustić & Miladinović, 2011**). Prema statističkim podacima za 2010. godinu Srbija je među vodećim proizvođačima soje u Evropi. U pomenutoj godini bilo je zasejano više od 170 000 hektara, a ostvareni prosečni prinos iznosio je 3,2 t/ha (<http://faostat.fao.org/>). Širenjem soje na veće površine, bolesti su postajale sve intenzivnije. Prema podacima iz 2010. godine u SAD bolesti su smanjile prinos soje za 13 miliona tona (<http://aes.missouri.edu/delta/research/soyloss.stm>).

Brojni mikroorganizmi parazitiraju soju, uzrokujući različite patološke promene na svim organima biljke. Svojom aktivnošću negativno utiču na kvalitet, visinu i stabilnost prinosa, a pri epifitotičnom napadu mogu dovesti u pitanje rentabilnost gajenja ove industrijske biljke. U svetu je opisano više od 135 mikroorganizama izolovanih iz soje, ali samo oko 30 vrsta pripada grupi značajnih patogena (**Roy et al., 2000**). U grupu ekonomski najznačajnijih parazita soje svrstani su pripadnici roda *Diaporthe/Phomopsis*, koji prouzrokuju kompleks oboljenja na ovoj biljnoj vrsti.

Gljive roda *Diaporthe/Phomopsis* su endofitne vrste, i mogu biti prisutne u biljkama kao patogeni ili saprofiti. Patogene vrste prouzrokuju bolesti i mogu značajno smanjiti prinos ekonomski važnih biljnih kultura, kao što su soja, suncokret i vinova loza. Pripadnici ovog roda koloniziraju različite biljne vrste, a korovi su alternativni domaćini, što predstavlja potencijalni izvor inokuluma (**Hepperly et al., 1980; Black et al., 1996; Roy et al., 1997; Li et al., 2001; Vrandečić et al., 2004; Jurković et al., 2007**). Takođe, ovaj rod pripada grupi

latentno-infektivnih gljiva. Latentna zaraza smatra se jednim od najviših stepena parazitizma, s obzirom da biljka domaćin i patogen egzistiraju zajedno, a da pri tome patogen izaziva veoma male patološke promene na domaćinu (**Sinclair, 1991**).

Zbog nepostojanja jasno definisane nomenklature, taksonomija roda *Diaporthe/Phomopsis* je aktuelna već duži niz godina. Mnoge vrste su od momenta otkrića, pa do danas promenile više puta naziv ili taksonomsku kategoriju. Zbog toga, u radovima autori često upotrebljavaju različite nazive ili taksonomske kategorije za istu vrstu, što je dovelo do konfuzije i nejasnoća. Jedan od glavnih uzroka je to što većina autora, kada po prvi put utvrdi prisustvo već poznate *Diaporthe/Phomopsis* vrste na novoj biljci domaćinu, smatra da je to nova vrsta i automatski dodeljuje nov naziv. Međutim, danas se zna da je biljka domaćin najmanje bitan faktor u taksonomiji pomenutog roda (**Rehner & Uecker, 1994; Mostert et al., 2001; Diogo et al., 2010**).

Kao paraziti soje, u svetu su na osnovu simptomatoloških i morfoloških karakteristika opisane dve vrste roda *Diaporthe/Phomopsis*. Kompleks oboljenja prouzrokuju vrste *Diaporthe phaseolorum* (anamorf *Phomopsis phaseoli*) i *Phomopsis longicolla* (teleomorf nepoznat). U okviru prvo pomenute vrste egzistiraju tri varijeteta, i to: *D. phaseolorum* var. *caulivora*, *D. phaseolorum* var. *meridionalis* i *D. phaseolorum* var. *sojae*, što je potvrđeno i molekularnih metodama identifikacije, kao što su RAPD i PCR-RFLP tehnika (**Fernández & Hanlin, 1996; Zhang et al., 1998**). Vrsta *D. phaseolorum* var. *sojae* prouzrokuje palež stabla i mahuna soje, dok su *D. phaseolorum* var. *caulivora* i *D. phaseolorum* var. *meridionalis* uzročnici raka stabla soje. U Srbiji su konstatovane sve navedene vrste, izuzev *D. phaseolorum* var. *meridionalis* (**Vidić et al., 2011**). Svi navedeni predstavnici *Diaporthe/Phomopsis* kompleksa prouzrokuju i trulež semena soje, a najdominantnija i najštetnija vrsta je *P. longicolla*.

Dosadašnja istraživanja ukazala su na izraženu morfološku varijabilnost vrste *D. phaseolorum* var. *sojae*, što je potvrđeno i PCR-RFLP tehnikom (**Zhang et al., 1998; Riccioni & Vrandečić, 2007**). Sugerisano je da *D. phaseolorum* var. *sojae* predstavlja ili nekoliko varijeteta vrste *D. phaseolorum* ili nekoliko posebnih vrsta.

Poslednjih nekoliko godina intenzivno se radi na proučavanju *Diaporthe/Phomopsis* vrsta uvođenjem novih taksonomskih sistema, kao što je filogenetski klasifikacioni sistem, odnosno taksonomija zasnovana na molekularnim karakteristikama. Za određivanje filogenetskih, evolutivnih i taksonomskih odnosa populacija i vrsta koriste se sekvence određenih delova DNK. Istraživanja zasnovana na sekvencama različitih lokusa DNK ukazala su da su na soji pored poznatih *Diaporthe/Phomopsis* vrsta, prisutne i druge vrste ovog roda (**Riccioni & Haegi, 2008**).

Paraziti roda *Diaporthe/Phomopsis* često se javljaju na soji u Srbiji, ali dosadašnja istraživanja uglavnom su se odnosila na rasprostranjenost patogena, simptomatologiju, štetnost, kao i mogućnost suzbijanja, dok je identifikacija bila bazirana isključivo na morfološkim karakteristikama (**Mitić et al., 1997; Vidić et al., 2011**). Međutim, ispitivanja na molekularnom nivou utvrdila su da biljka domaćin, morfološke i odgajivačke karakteristike nisu pouzdani pokazatelji u identifikaciji vrsta ovog roda. S obzirom da većina *Diaporthe/Phomopsis* vrsta ima širok spektar domaćina, a morfološke karakteristike često variraju ili se "preklapaju", istovremeno proučavanje patogenosti, fenotipa i genotipa svake vrste je veoma važno u razumevanju filogenetske veze i praćenju diverziteta.

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

- ✦ Zadatak istraživanja jeste tačno identifikovati prisutne *Diaporthe/Phomopsis* vrste na biljkama i semenu soje u Srbiji.
- ✦ Na osnovu sekvenci tri različita regiona DNK (ITS, LSU i TEF<sub>1</sub>- $\alpha$ ), uz odgovarajuću filogenetsku obradu podataka, razjasniće se taksonomski odnosi *Diaporthe/Phomopsis* vrsta.
- ✦ Poređenjem rezultata molekularnih istraživanja sa morfološkim i patogenim karakteristikama trebala bi se dobiti potpunija slika svih proučavanih *Diaporthe/Phomopsis* vrsta, što je veoma važno u razumevanju filogenetske veze i praćenju diverziteta.
- ✦ Pored navedenog, ovo istraživanje ima za cilj iznalaženje brzog i pouzdanog modela identifikacije *Diaporthe/Phomopsis* vrsta, koje se javljaju na soji u Srbiji.

### 3. PREGLED LITERATURE

#### 3.1. Sistematika roda *Diaporthe/Phomopsis*

Prema morfološkom klasifikacionom sistemu (**Ainsworth & Bisby, 1971**) teleomorf *Diaporthe* pripada podrazdelu *Ascomycotina*, klasi *Pyrenomycetes*, redu *Diaporthales* i porodici *Diaporthaceae*, dok njegov anamorf *Phomopsis* pripada podrazdelu *Deuteromycotina*, klasi *Coelomycetes*, redu *Sphaeropsidales* i porodici *Sphaeropsidaceae*.

Međutim, uvođenjem metoda molekularne biologije uvedena je i taksonomija zasnovana na molekularnim karakteristikama. Prema filogenetskom klasifikacionom sistemu (**Hibbett et al., 2007; Kirk et al., 2008**) rodovi *Diaporthe* i *Phomopsis* pripadaju istim taksonomskim kategorijama do reda, odnosno domenu *Eukaryota*, carstvu *Fungi*, podcarstvu *Dikarya*, razdelu *Ascomycota*, podrazdelu *Pezizomycotina*, klasi *Sordariomycetes*, podklasi *Sordariomycetidae* i redu *Diaporthales*. Teleomorf *Diaporthe* je smešten u porodicu *Diaporthaceae*, dok njegov anamorf *Phomopsis* pripada porodici *Valsaceae*.

U okviru roda *Diaporthe* do sada je opisano preko 800, dok njegov anamorf *Phomopsis* (Sacc.) Bubák sadrži više od 900 vrsta. Međutim, većina *Phomopsis* vrsta nije povezana sa teleomorfnim stadijumom *Diaporthe*, bilo na supstratu biljke domaćina ili u kulturi (**Uecker, 1988; 1989**).

#### 3.2. Istorijski pregled taksonomije *Diaporthe/Phomopsis* vrsta

Taksonomija *Diaporthe/Phomopsis* vrsta je aktuelna već duži niz godina, jer još uvek ne postoji jasno definisana nomenklatura ovih gljiva. Pripadnici roda su od momenta njihovog otkrića, pa sve do danas, promenili mnogo naziva. U radovima, autori često upotrebljavaju različite nazive ili drugačije taksonomske kategorije za istu vrstu, što je prilično konfuzno i nejasno. U publikaciji "*The genus Diaporthe Nitschke and its segregates*", po prvi put je napravljena značajna taksonomska revizija roda *Diaporthe* (**Wehmeyer, 1933**). Na osnovu morfoloških karakteristika, od ukupno 650 do tada opisanih vrsta, prihvaćeno je samo 70 naziva, dok su ostali označeni kao sinonimi određene vrste. Broj predstavnika ovog



roda je redukovan, jer postoje mnoga preklapanja u opisu "različitih" vrsta i jako je teško razlikovati jednu vrstu od druge. Pored klasifikacije vrsta na osnovu morfoloških karakteristika, urađena je i klasifikacija zasnovana na biljci domaćinu i uočeno je da neke vrste roda *Diaporthe* mogu kolonizirati više od jednog domaćina. Danas se smatra da je biljka domaćin najmanje pouzdan pokazatelj u taksonomiji pomenutog roda (**Rehner & Uecker, 1994; Mostert et al., 2001; Diogo et al., 2010**).

Radi preglednosti, fenotipski markeri, na osnovu kojih su determinisani paraziti soje roda *Diaporthe/Phomopsis*, tabelarno su predstavljeni po hronološkom redosledu (Prilog 1, Prilog 2). U tabelama nisu navedeni tip micelije i veličina stroma, jer su autori generalno davali isti opis. Iz tog razloga, u prilogu 3 dati su opšti morfološki parametri, koji se i danas primenjuju u determinaciji parazita soje roda *Diaporthe/Phomopsis*.

Prvi simptom paleži uočen je na stablu pasulja (*Phaseolus vulgaris*), a prouzrokovala je opisana kao gljiva *Phoma phaseoli* (**Desmazières, 1836**). Nekoliko godina kasnije utvrđeno je da gljiva formira i teleomorfni stadijum, koji je opisan pod nazivom *Sphaeria phaseolorum* (**Cook & Ellis, 1878**). Taksonomski nazivi *P. phaseoli* i *S. phaseolorum* su kasnije preklasifikovani u *Phomopsis phaseoli* (**Saccardo, 1915**), odnosno *Diaporthe phaseolorum* (**Saccardo, 1882**) (Slika 1).

Nekoliko godina kasnije, kao prouzrokovala bolesti slatkog krompira (*Ipomoea batatas*) determinisana je gljiva *Phoma batatae* (**Halsted, 1890**), odnosno *Phomopsis batatae* (**Harter & Field, 1912**), a isti autori su opisali i teleomorf *Diaporthe batatatis* (**Harter & Field, 1912**) (Slika 1).

Simptom paleži takođe je uočen i na lima pasulju (*Phaseolus lunatus*), a prouzrokovala je opisana kao *Phoma subcircinata* (**Ellis & Everhart, 1892**). Takođe, utvrđeno je da anamorf *P. phaseoli*, pored paleži stabla običnog pasulja, može da prouzrokuje i palež mahuna lima pasulja (**Harter, 1917**). Detaljnim ispitivanjem utvrđeno je da su gljive *P. subcircinata* i *P. phaseoli* identične (**Harter, 1917**).

Palež stabla i mahuna soje po prvi put se pominje u literaturi 1920. godine (**Wolf & Lehman, 1920**). Kao prouzrokovala ovog oboljenja opisana je gljiva *Phomopsis sojiae*, a godinu dana kasnije i njegov teleomorf *Diaporthe sojiae*

(**Lehman, 1922; 1923**) (Slika 1). Ovo oboljenje je u Srbiji konstatovano i opisano 1985. godine (**Janić & Vidić, 1985**).

Dotadašnja saznanja o patogenima *D. batatatis* i *D. sojæ* nisu ukazivala na postojanje značajnih morfoloških razlika ove dve gljive u odnosu na *D. phaseolorum*. Na osnovu toga, pomenute vrste su preklasifikovane u taksonomsku jedinicu *varietas*, odnosno *D. phaseolorum* var. *batatatis* i *D. phaseolorum* var. *sojæ* (**Wehmeyer, 1933**), dok je gljiva izolovana iz lima pasulja izdvojena u poseban varijetet koristeći autonom *D. phaseolorum* var. *phaseolorum* (**Punithalingam & Holliday, 1972; Holliday, 1980; Kulik, 1984**) (Slika 1).

U periodu od 1943. do 1948. godine publikovano je nekoliko radova, u kojima se ukazuje na pojavu prevremenog uvenuća biljaka soje. Oboljenje nazvano rak stabla prouzrokovalo je ozbiljne štete u usevima soje (**Welch, 1947**). Najpre se smatralo da je uzročnik *D. phaseolorum* var. *sojæ* (**Bretz, 1943; Koch & Hildebrand, 1943**), a kasnije *D. phaseolorum* var. *batatatis* (**Welch & Gilman, 1948**). Detaljnim istraživanjem, ustanovljene su brojne morfološke razlike, između prouzrokovala raka stabla i poznatih varijeteta *D. phaseolorum*. Na osnovu tih razlika izdvojen je poseban varijetet - *D. phaseolorum* var. *caulivora* (**Athow & Caldwell 1954**) (Slika 1). Početkom osamdesetih godina prošlog veka, ovo oboljenje je konstatovano izvan severnoameričkog potkontinenta (**Jasnić & Vidić, 1981; 1983**).

Ispitivanjem patogenosti izolata *D. phaseolorum* var. *caulivora*, uočena je varijabilnost unutar populacije, što je ukazivalo na prisustvo više rasa (**Hildebrand, 1956; Peterson & Strelecki, 1965**). Ova ispitivanja su intenzivirana nakon iznenadne pojave raka stabla soje u južnim i jugozapadnim područjima SAD. Pokazalo se da postoje bitne razlike u reakciji pojedinih sorti soje prema izolatima poreklom sa severa u odnosu na izolate sa juga. Na osnovu reakcije šest sorti ustanovljen je isti broj fizioloških rasa (**Keeling, 1984**). U ovim ispitivanjima sorta Tracy-M ispoljavala je otpornost prema "južnim", a osetljivost prema "severnim" izolatima gljive, dok su ostale sorte ispoljavale neznatne razlike u osetljivosti.

Ova istraživanja navela su pojedine autore da "južni" i "severni" tip raka stabla, kao i *D. phaseolorum* var. *sojæ* preklasifikuju u taksonomsku jedinicu *forma specialis* (Slika 1), i to: severni tip raka stabla soje - *D. phaseolorum* f. sp. *caulivora*,

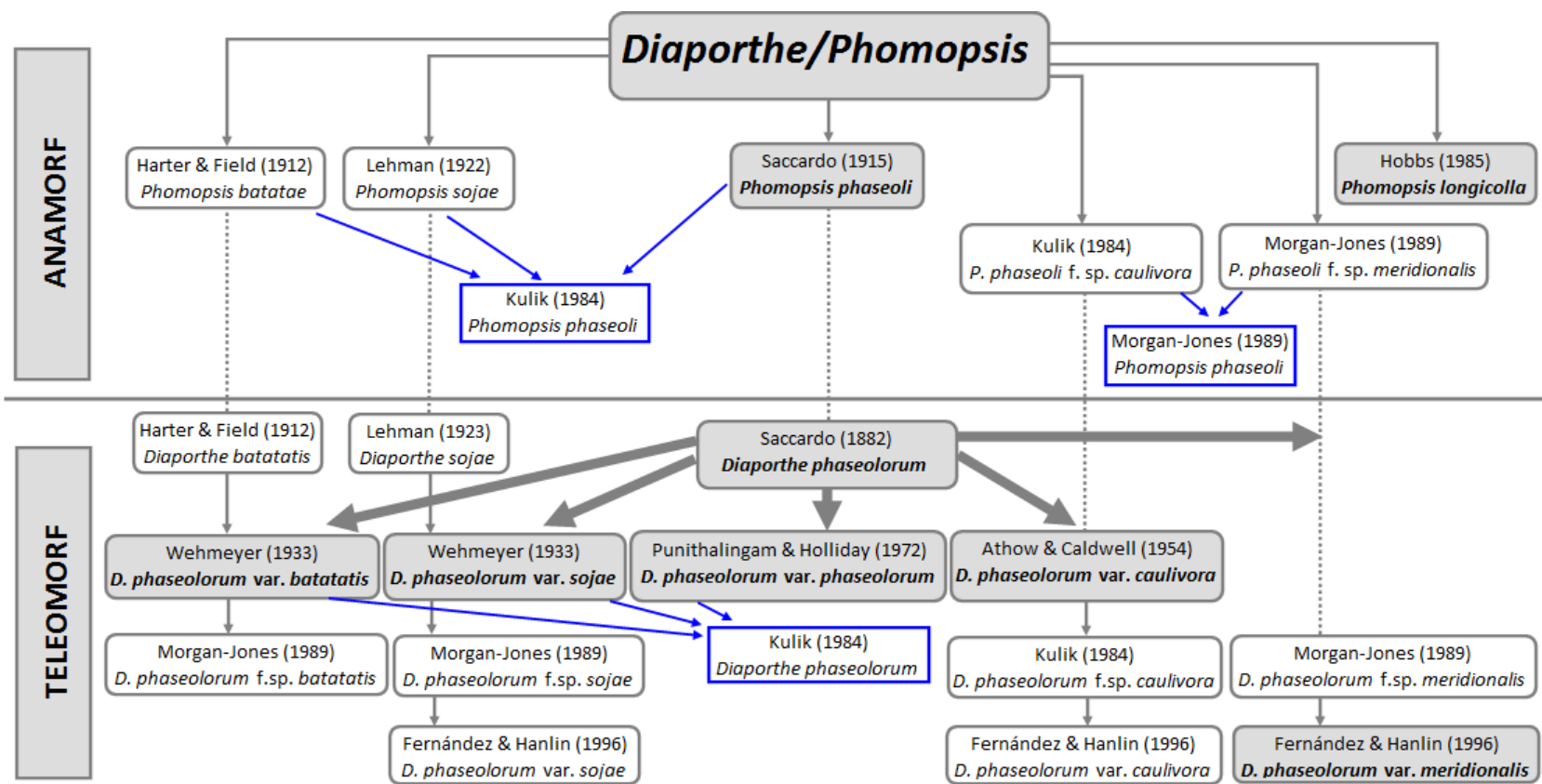
zatim južni tip raka stabla soje - *D. phaseolorum* f. sp. *meridionalis* i palež stabla i mahuna soje - *D. phaseolorum* f. sp. *sojae* (Kulik, 1984; Higley & Tachibana, 1987; Morgan-Jones, 1989). Slična taksonomska klasifikacija primenjena je i u okviru anamorfa, koji je podeljen na *Phomopsis phaseoli* f. sp. *caulivora* (Kulik, 1984) i *P. phaseoli* f. sp. *meridionalis* (Morgan-Jones, 1989).

Takođe, detaljnim ispitivanjem došlo se do zaključka da su gljive *P. phaseoli*, *P. batatae* i *P. sojae* identične, odnosno da se radi o istoj vrsti (Kulik, 1984). Na osnovu toga, predloženo je da se kao validan naziv anamorfnog stadijuma za sva tri navedena taksonomska naziva uzme *Phomopsis phaseoli*, dok je za teleomorf predloženo ime *Diaporthe phaseolorum* (Slika 1).

Pored do tada poznatih pripadnika roda *Diaporthe/Phomopsis*, sa stabla (Hildebrand, 1954) i semena soje (Peterson & Strelecki, 1965) izolovan je morfološki drugačiji patogen. Ova gljiva se po patogenosti i morfologiji razlikovala od poznatih pripadnika roda *Diaporthe/Phomopsis*, koji su takođe bili izolovani. Gljiva, nazvana tada *Phomopsis* sp. formirala je samo anamorfnu stadijum i prouzrokovala je trulež semena (Kmetz *et al.*, 1978).

Kasniji radovi ukazivali su na razlike između izolata *Phomopsis* sp. i anamorfnog stadijuma gljive *D. phaseolorum* var. *sojae*. Gljiva *Phomopsis* sp. je izolovana iz prirodno zaraženih klijanaca znatno ranije od anamorfnog stadijuma gljive *D. phaseolorum* var. *sojae* (Kmetz *et al.*, 1978). Takođe, u zelenim i zrelim biljkama, kao i semenu (Schmitthenner & Kmetz, 1980) i žetvenim ostacima soje (Kmetz *et al.*, 1979) *Phomopsis* sp. je najčešće izolovani patogen roda *Diaporthe/Phomopsis*. Na osnovu odgajivačkih i morfoloških karakteristika, izolati roda *Phomopsis* su podeljeni u dve grupe. Karakteristike prve grupe su se podudarale sa opisanim anamorfnim stadijumom gljive *D. phaseolorum* var. *sojae*, dok je druga grupa izdvojena kao nova vrsta *Phomopsis longicolla* (Hobbs *et al.*, 1985) (Slika 1). Ova vrsta je u Evropi po prvi put uočena i opisana u Srbiji (Vidić & Jasnić, 1994).

Napomena: Isprekidana linija označava konekciju anamorfa i teleomorfa, a važeći taksonomski nazivi markirani su sivom bojom.



Slika 1. Hronološki pregled taksonomije *Diaporthe/Phomopsis* vrsta (original)

### 3.3. Novi pristupi u taksonomiji roda *Diaporthe/Phomopsis*

Lančana reakcija polimeraze (PCR) napravila je revoluciju u molekularnoj dijagnostici i sistematici. Ova tehnika predstavlja *in vitro* umnožavanje (amplifikaciju) određenih DNK sekvenci ili lokusa, pomoću specifičnih ili arbitarnih oligonukleotidnih sekvenci (prajmera) i termostabilne DNK polimeraze (**Bruns et al., 1991; Živković, 2007**). Sa razvojem PCR tehnike, razvijen je veliki broj molekularnih markera, koji se mogu koristiti za detekciju, karakterizaciju i ocenjivanje genetičkog diverziteta. Molekularni markeri su kratke sekvence DNK molekula i njihov raspored u genomu predstavlja sliku genetičke građe organizma. Za određivanje filogenetskih, evolutivnih i taksonomskih odnosa populacija i vrsta pored molekularnih markera, koriste se i sekvence određenih delova DNK. Ove sekvence primenjuju se u taksonomskoj identifikaciji i istraživanju diverziteta različitih organizama (**Bruns et al., 1991; Setti et al., 2011**). Razvijanjem tehnika molekularne biologije, koje se zasnivaju na proučavanju genoma patogena, omogućen je jedan novi način detekcije, identifikacije i karakterizacije roda *Diaporthe/Phomopsis*. Sva dalja istraživanja bavila su se kako fenotipom, tako i genotipom svakog patogena, što je davalo potpuniju sliku svakog izolata.

Među prvim molekularnim markerima, koji su primenjeni u analizama genetičke varijabilnosti, filogenetske srodnosti, mapiranja genoma i ocene diverziteta, su RAPD markeri (**Bruns et al., 1991; Ivanović et al., 2004; Setti et al., 2011**). Ova metoda predstavlja PCR tehniku, koja detektuje polimorfizme nukleotidnih sekvenci na DNK molekulu pomoću arbitarnih kratkih PCR prajmera. RAPD markeri su 1996. godine po prvi put primenjeni za karakterizaciju vrsta *D. phaseolorum* i *P. longicolla* (**Fernández & Hanlin, 1996**). Na osnovu dobijenih profila, izolati su podeljeni na dve vrste: *P. longicolla* i *D. phaseolorum*; s time da je u okviru vrste *D. phaseolorum* identifikovano tri varijeteta: *D. phaseolorum* var. *caulivora*, *D. phaseolorum* var. *meridionalis* i *D. phaseolorum* var. *sojae*. Na osnovu toga, navedene gljive su preklasifikovane iz taksonomske jedinice *forma specialis* u *varietas* (Slika 1). Ustanovljeno je da *P. longicolla*, *D. phaseolorum* var. *caulivora* i *D. phaseolorum* var. *meridionalis* daju specifične profile za razliku od *D. phaseolorum* var. *sojae*, koji je jako varijabilan i daje mnoštvo različitih profila. Na osnovu ovog

istraživanja publikovano je još nekoliko radova sa sličnim rezultatima (**Pioli et al., 2003; Jaccoud Filho & Lee, 2004 a**).

Najčešći region DNK, koji se koristi u dijagnostičkim postupcima i filogenetskim istraživanjima gljiva, je nuklearna ribozomalna DNK (nrDNK). U okviru ovog regiona nalaze se konzervativni geni koji kodiraju 18S, 5.8S i 28S rRNK molekule (Slika 2). Između ova tri gena nalaze se interni transkribovani regioni (ITS<sub>1</sub> i ITS<sub>2</sub>), dok su dve rDNK jedinice razdvojene intergenskim prostorom (IGS). Navedeni regioni (ITS i IGS) su veoma varijabilni i koriste se za detekciju vrste, ali i nižih taksonomskih jedinica (**Henson & French, 1993; Setti et al., 2011**).



**Slika 2.** Eukariotska rDNK (original)

Za razlikovanje vrsta *D. phaseolorum* i *P. longicolla* razvijeni su *Phomopsis*-specifični prajmeri *Phom I* i *Phom II* iz polimorfnih regiona DNK (**Zhang et al., 1997**). Prajmeri su korišćeni za amplifikaciju specifičnog DNK fragmenta kod gljiva *P. longicolla*, *D. phaseolorum* var. *meridionalis*, *D. phaseolorum* var. *caulivora*, *D. phaseolorum* var. *sojae* i *Phomopsis* sp. izolovanih iz 20 različitih domaćina. Ovi specifični prajmeri imaju dve glavne primene: i) detekcija gljiva roda *Diaporthe/Phomopsis* prilikom latentnih infekcija biljaka i semena soje i ii) testiranje semena u laboratorijama u kojima molekularna detekcija može biti pouzdanija i brža metoda od konvencionalnog morfološkog pregleda semena na hranljivoj podlozi.

Za razlikovanje *Diaporthe/Phomopsis* vrsta od drugih gljiva koje parazitiraju soju uspešno je primenjena PCR-RFLP tehnika (**Zhang et al., 1997**). Ova metoda podrazumeva amplifikaciju određenog dela DNK i digestiju restrikcionim enzimima (endonukleaze). Restrikcioni enzimi seku DNK na specifičnim mestima i daju fragmente različite veličine, odnosno daju različite profile, kada se razdvajaju elektroforezom. Kombinacijom profila dva ili više restrikcionih enzima dobijaju se jedinstveni molekularni profili za svaku vrstu, koji predstavljaju molekularne determinatore. Primenom ove metode sprovedena je molekularna identifikacija i

filogenetsko grupisanje gljiva *D. phaseolorum* i *P. longicolla* izolovanih iz biljnog tkiva i semena soje (Zhang *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1999; Riccioni *et al.*, 1998; 2003; 2005; Costamilan *et al.*, 2008). Izolovana DNK je amplifikovana univerzalnim prajmerima ITS<sub>5</sub> i ITS<sub>4</sub>, a zatim je sprovedena digestija sa pet restrikcioni enzima (*AluI*, *RsaI*, *HhaI*, *MseI* i *ScrFI*). Restrikcioni enzimi pokazali su specifičan elektroforetski profil za *D. phaseolorum* var. *meridionalis*, *D. phaseolorum* var. *caulivora* i vrstu *P. longicolla*, dok su za gljivu *D. phaseolorum* var. *sojae* uočene različite kombinacije, ali uvek drugačije od kombinacija za ranije navedene varijetete. Osim molekularne metode sprovedena je i morfološka identifikacija, ali je ona bila moguća samo kod 80% analiziranih izolata, jer izolati često postaju sterilni nakon dužeg čuvanja na hranljivim podlogama. Sprovedena ispitivanja sugerisu na to da je *P. longicolla* posebna vrsta, *D. phaseolorum* var. *meridionalis* i *D. phaseolorum* var. *caulivora* varijeteti unutar vrste *D. phaseolorum*, dok *D. phaseolorum* var. *sojae* predstavlja ili nekoliko varijeteta vrste *D. phaseolorum* ili nekoliko posebnih vrsta (Zhang *et al.*, 1998; Riccioni & Vrandečić, 2007).

Na osnovu poznatih sekvenci ITS regiona rDNK, takođe su razvijena tri TaqMan seta (PL-3, PL-5 i DPC-3) za detekciju patogena roda *Diaporthe/Phomopsis* iz semena soje. Ova metoda je veoma osetljiva i pouzdana i predstavlja najbržu tehniku za detekciju patogena baziranu na PCR-u (Zhang *et al.*, 1999).

U filogenetskim istraživanjima, pored ITS regiona, često se koriste i sekvence male (SSU) i velike (LSU) subjedinice ribozomalnih gena, kao i sekvence gena odgovornih za sintezu  $\beta$ -tubulina i TEF<sub>1</sub>- $\alpha$  proteina. Geni male (18S) i velike (28S) ribozomalna subjedinica, kao i gen TEF<sub>1</sub>- $\alpha$ , visoko su konzervisani, što je poželjna osobina za filogenetska zaključivanja (Roger *et al.*, 1999). Takođe, ovi geni se često koriste u ispitivanjima hipoteze "molekularnog sata" (Berbee & Taylor, 2001). To znači da ako je stopa supstitucije nukleotida približno konstantna i ako postoji fosil za kalibraciju te stope, tada procenat supstitucije između dve vrste može da se koristi za procenu vremena divergencije. Primenom ove hipoteze uspostavljene su vremenske skale evolucije kod različitih organizama (Berbee & Taylor, 2001).

Takođe, filogenija kod gljiva često se rekonstruiše i pomoću MAT lokusa (Turgeon, 1998). Ovaj lokus reguliše polnu reprodukciju kod gljiva i na osnovu njega može se znati koje su vrste samofertilne (homotalusne), a koje samosterilne (heterotalusne). Drugim rečima, homotalusne vrste imaju polnu reprodukciju, jer u svom genomu sadrže dva tipa MAT lokusa. Suprotno tome, heterotalusne vrste u svom genomu imaju samo jedan tip MAT lokusa, tako da je za polnu reprodukciju neophodno da se ukrste sa vrstom koja ima kompatibilan MAT lokus (Turgeon, 1998). To znači da vrste za istim MAT lokusom neće formirati diploidne ćelije, pa samim tim ne mogu dati fertilno potomstvo. Kod *Diaporthe* i *Phomopsis* vrsta, MAT lokus se razlikuje u samo jednom genu (Santos *et al.*, 2010). U cilju dijagnoze MAT tipa kod ovih vrsta, kao i procene njihove upotrebljivosti pri indukciji teleomorfa *in vitro*, razvijeni su prajmeri za amplifikaciju MAT1-1-1 i MAT1-2-1 gena. Sprovedena istraživanja pokazala su da se MAT filogenija u potpunosti poklapa sa filogenijom gena TEF<sub>1</sub>-α (Santos *et al.*, 2010).

Za karakterizaciju *Diaporthe/Phomopsis* vrsta izolovanih iz biljaka roda *Prunus*, kao i iz biljke *Foeniculum vulgare*, uspešno je primenjena tehnika MSP-PCR profila. Ova metoda predstavlja multi-lokusni genomski otisak i korisna je pri determinaciji predstavnika roda *Diaporthe/Phomopsis* (Uddin *et al.*, 1997; Santos & Phillips, 2009; Diogo *et al.*, 2010).

Gljiva *D. phaseolorum* je opisana kao prouzrokovač propadanja biljke *Aspalathus linearis* na osnovu morfoloških karakteristika (Smit & Knox-Davies, 1989 a, b). Međutim, istovremenim ispitivanjem morfoloških i patogenih karakteristika, kao i sekvencioniranjem ITS regiona i dela TEF<sub>1</sub>-α gena, ustanovljeno je da propadanje pomenute biljke prouzrokuje izrazito virulentan *D. phaseolorum* var. *meridionalis* (Janse van Rensburg *et al.*, 2006). Izveden je zaključak da je *D. phaseolorum* var. *meridionalis* morfološki veoma sličan sa vrstom *D. phaseolorum*, ali da s molekularne tačke gledišta nije varijetet iste, te je predloženo novo ime - *Diaporthe aspalathi*.

Na osnovu morfoloških karakteristika sve vrste roda *Phomopsis*, koje se javljaju na vinovoj lozi podeljene su na *Taxon 1*, *Taxon 2*, *Taxon 3* i *Taxon 4* (Merrin *et al.*, 1995). Međutim, rezultati dobijeni ispitivanjem filogenije ITS regiona i patogenosti, pokazali su da se analizirani *Phomopsis* spp. izolati mogu



podeliti u osam grupa. Iz tog razloga, uvedena je numerološka klasifikacija od *Phomopsis* sp. 1 do *Phomopsis* sp. 8 (Van Niekerk *et al.*, 2005).

Godinu dana kasnije, na osnovu rezultata ispitivanja ITS regiona i TEF<sub>1</sub>- $\alpha$  gena kod *Phomopsis* vrsta, uvedena je i neidentifikovana grupa *Phomopsis* sp. 9 (Janse van Rensburg *et al.*, 2006). Istraživanje je rezultiralo identifikacijom grupe *Phomopsis* sp. 1 kao *Phomopsis theicola* (teleomorf *Diaporthe theicola*), koja je prvenstveno opisana na biljci *Camellia sinensis* (Curzi, 1926). Međutim, ispitivanjem morfoloških i odgajivačkih karakteristika, kao i primenom MSP-PCR profila i sekvenci ITS regiona, ustanovljeno je da referentni izolat *D. theicola* nije teleomorf gljive *P. theicola*. U prilog tome, predložen je modifikovani naziv za teleomorfni stadijum - *Diaporthe neotheicola* (Santos & Phillips, 2009).

Molekularna karakterizacija predstavnika roda *Diaporthe/Phomopsis* izolovanih iz različitih zeljastih (među kojima je i soja) i drvenastih biljaka ukazala je na prisustvo različitih vrsta ovog roda (Riccioni & Haegi, 2008). Uočeno je da su soja i kivi izuzetno pogodni domaćini za *Diaporthe/Phomopsis* vrste. Na osnovu sekvenci ITS regiona i dela LSU i TEF<sub>1</sub>- $\alpha$  gena, konstatovano je da su pored poznatih predstavnika roda, na soji prisutne i vrsta *P. theicola*, kao i tri neidentifikovane grupe: *Phomopsis* sp. 4, *Phomopsis* sp. 6 i *Phomopsis* sp. 9 (Riccioni & Haegi, 2008). Prisustvo ovih vrsta je konstatovano i na soji u Srbiji (Vidić *et al.*, 2011), dok je na semenu soje poreklom iz Hrvatske detektovana neidentifikovana grupa *Phomopsis* sp. 9 (Santos *et al.*, 2011).

Klasifikacija koja je usvojena od strane većine autora, predstavnike roda *Diaporthe/Phomopsis*, prouzrokovala kompleksa oboljenja na soji, deli na dve vrste: *Phomopsis longicolla* Hobbs (teleomorf nepoznat) i *Diaporthe phaseolorum* (Cook & Ellis) Sacc. (anamorf *Phomopsis phaseoli* (Desmaz.) Sacc.), s time da vrstu *D. phaseolorum* čine tri varijeteta: *D. phaseolorum* var. *sojae* (Lehman) Wehmeyer, *D. phaseolorum* var. *caulivora* Athrow & Caldwell i *D. phaseolorum* var. *meridionalis* Fernández.

Iz iznetog pregleda može se konstatovati da i pored toga što autori ukazuju na prisustvo drugih *Diaporthe/Phomopsis* vrsta na soji (Riccioni & Haegi, 2008; Vidić *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2011), navedena klasifikacija predložena 1996. godine (Fernández & Hanlin, 1996) još uvek je u upotrebi.

### 3.4. Filogenetska obrada molekularnih podataka

Filogenetika proučava evolutivnu istoriju živih organizama, a evolutivni put najčešće se ilustruje dendrogramima. Dendrogrami se mogu rekonstruisati u vidu kladograma i filograma, a grananje dendrograma (tzv. topologija stabla) predstavlja filogeniju, odnosno evolucijski odnos između vrsta. U filogramima, dužina grana predstavlja iznos evolucijske divergentnosti, odnosno pokazuje i evolucijske odnose i daje informacije o relativnoj divergentnosti kroz vreme. Međutim, kladogrami prikazuju samo srodstvene odnose, odnosno dužina grane nije proporcionalna broju evolucijskih promena, pa samim tim ovakvo stablo nema filogenetsko značenje (Xiong, 2006).

Grupa taksona poreklom od jednog zajedničkog pretka definiše se kao klada ili monofiletička grupa. Međutim, ako određen broj taksona deli više od jednog pretka, onda se oni ne uklapaju u definiciju klade, već se tretiraju kao parafiletičke grupe (Xiong, 2006).

Dendrogrami mogu biti ukorenjeni (engl. rooted) ili neukorenjeni (engl. unrooted). Neukorenjeno filogenetsko stablo nema pretpostavku o zajedničkom pretku, tako da na osnovu pozicija taksona, pokazuje samo njihov relativan odnos. Zbog toga, nema indicija o tome koji nodus prezentuje pretka, pa samim tim nema ni pravca evolucionog puta. Da bi se definisao pravac evolucije, stablo mora biti ukorenjeno. U ovakvom dendrogramu, sve sekvence imaju zajedničkog pretka od kojeg kreće jedinstveni evolucioni put ka ostalim nodusima. Strogo govoreći, koren stabla je nepoznat, jer se često ne raspolaže informacijama o zajedničkom pretku. Međutim, u praksi često je poželjno da se definiše koren stabla, a jedan od najčešćih načina je uvođenje spoljašnje grupe (engl. outgroup). Spoljašnju grupu čine sekvence koje su homologne sa sekvencama koje se ispituju (engl. ingroup), ali su se odvojile od njih u ranom evolucionom vremenu. Korišćenje jako divergentnih sekvenci kao spoljašnje grupe, može prouzrokovati greške u rekonstrukciji dendrograma. U slučaju da nema dobre spoljašnje grupe, stablo može biti ukorenjeno pomoću srednje vrednosti dve najdivergentnije grupe u odnosu na ukupnu dužinu grana (engl. midpoint rooting approach). Ovaj način ukorenjavanja predpostavlja da je divergentnost od korena prema taksonima za

obe grane jednaka i podržava hipotezu molekularnog sata (**Xiong, 2006; Pevsner, 2009**).

Filogenetika se često proučava korišćenjem fosilnih zapisa koji sadrže morfološke informacije o precima sadašnjih vrsta i vremensku liniju divergentnosti. Međutim, za mikroorganizme, fosili u suštini ne postoje, pa je praktično nemoguće proučavati filogeniju ovim pristupom. Na sreću, molekularni podaci koji se nalaze u obliku sekvenci DNK ili proteina takođe pružaju veoma korisne informacije o evoluciji postojećih vrsta, jer genetski materijal tokom vremena akumulira mutacije koje prouzrokuju fenotipske promene. S obzirom da su geni medijumi za snimanje akumuliranih mutacija, oni mogu da posluže kao molekularni fosili (**Xiong, 2006**).

Jedan od ciljeva izgradnje filogenetskih stabla na osnovu molekularnih sekvenci je rekonstrukcija evolucijske linije ispitivanih vrsta. Međutim, filogenija gena samo opisuje evoluciju tog jednog gena. Ova sekvenca može evoluirati manje ili više brže od drugih gena u genomu, ili može imati različitu evolutivnu istoriju od ostatka genoma zahvaljujući horizontalnom prenosu gena. Prema tome, evolucija određene sekvence ne mora nužno da bude u korelaciji sa evolucijom vrste, jer je evolucija vrste kombinovani rezultat evolucije od strane više gena u genomu. Dakle, za filogeniju vrste, neophodno je izgraditi dendrograme različitih gena koji će pružiti sveobuhvatnu procenu evolucije ispitivane vrste (**Xiong, 2006; Pevsner, 2009**).

Filogenetska analiza se sastoji od nekoliko koraka. Kao prvo, odabrani set sekvenci neophodno je poravnati (engl. alignment) i svesti na jednak broj molekularnih karaktera. Poravnavanje sekvenci predstavlja metod slaganja, odnosno uparivanja nukleotida pri čemu se dobijaju određeni karakteri. Tokom poravnanja, praznine (engl. gaps) moraju biti uvedene u sekvence, koje imaju delecije ili insercije. Ove praznine su poznate kao praznine poravnanja (engl. alignment gaps ili indels) (**Weiß & Göker, 2011**).

Sledeći korak u filogenetskoj analizi je odabir najboljeg supstitucionog modela. Za određivanje modela, koji najbolje uklapa supstitucije, primenjuje se jedan od tri kriterijuma: hLRT, AIC i BIC, koji su integrisani u programu Modeltest (**Posada & Crandall, 1998**). Model sa najmanjim hLRT, AIC ili BIC skorom

predstavlja najbolji supstitucionni model, a kriterijum koji će se primeniti zavisi od kompleksnosti sekvenci (**Weiß & Göker, 2011**).

Nakon toga, pristupa se odabiranju filogenetske metode. Postoje dve glavne kategorije metoda koje se primenjuju u filogenetskim istraživanjima. Prva je zasnovana na distancama, koje su rezultat različitosti između sekvenci. Algoritmi, koji se koriste za rekonstrukciju dendrograma, bazirani na distancama, mogu se podeliti na metode zasnovane na grupisanju (UPGMA i Neighbor Joining) i metode zasnovane na optimalnosti (Minimum Evolution i Fitch-Margoliash). Druga kategorija metoda, koje se koriste u filogenetskim analizama, bazira se na diskretnim karakterima (Maximum Parsimony i Maximum Likelihood).

Poslednji korak u ispitivanju filogenije je procena tačnosti dobijenog filograma. Najupotrebljiviji pristup je butstrap analiza (engl. bootstrap), međutim ova metoda ne procenjuje tačnost filograma, već samo opisuje stabilnost individualnih klada (grupa). Da bi filogram bio pouzdaniji, generalno se preporučuje da broj butstrap ponavljanja ne bude manji od 1000 (**Felsenstein, 1985**).

### **3.5. Patogenost *Diaporthe/Phomopsis* vrsta**

Gljive roda *Diaporthe/Phomopsis* izazivaju kompleks oboljenja na soji i prouzrokuju veće gubitke u prinosu od bilo kojeg drugog pojedinačnog patogena (**Hartman et al., 1999**). Korišćenje otpornih sorti je najefikasniji metod za kontrolisanje oboljenja uzrokovanih *Diaporthe/Phomopsis* vrstama, posebno kada ekološki uslovi pogoduju razvoju bolesti. Poznavanje varijabilnosti patogena je od suštinskog značaja za razumevanje diverziteta populacije i iznalaženje izvora otpornosti u biljkama soje (**Li, 2011**).

Varijabilnost u pogledu patogenosti unutar populacije *D. phaseolorum* var. *caulovora* detaljno je istraživana u svetu i kod nas. Testirajući brojne izolate, odabrane po geografskom principu, na osnovu reakcije sorti diferencijatora izdvojeno je šest fizioloških rasa (**Keeling, 1984**). Izolati poreklom sa juga SAD označeni su kao južne rase (1, 2 i 3), a izolati sa severa kao severne rase (4, 5 i 6). Severna i južna rasa taksonomski su kategorizovane prvo kao *formae speciales*

(Morgan-Jones, 1989), a potom kao *varietas* (Fernández & Hanlin, 1996) vrste *D. phaseolorum*, odnosno *D. phaseolorum* var. *caulivora* (severni tip) i *D. phaseolorum* var. *meridionalis* (južni tip). Pomoću istih test sorti utvrđeno je da su izolati poreklom iz različitih rejona Srbije identični sa *D. phaseolorum* var. *caulivora*, što je ukazalo da je na soji u našoj zemlji prisutan severni tip raka stabla (Vidić, 1991; Vidić et al., 1994). Međutim, autori ukazuju da postoje razlike u stepenu patogenosti između izolata *D. phaseolorum* var. *caulivora*, ali da se na osnovu toga ne može tvrditi da li je prisutno više fizioloških rasa na soji u Srbiji.

Testovi patogenosti i skrining genotipova soje na otpornost prema *D. phaseolorum* var. *caulivora* uglavnom se obavljaju nanošenjem micelije gljive u povrede na stablu. Kao najuspešnije pokazale su se metoda čačkalica (engl. toothpick method) (Crall, 1952; Hildebrand, 1953; Frosheiser, 1957; Kmetz et al., 1979; Roy & Miller, 1983; Backman et al., 1985; Vidić, 1987; Freitas, 2002; Pioli et al., 1999; 2001; 2003; Costamilan, 2008) i metoda agaroznog isečka (engl. plug method) (Mengistu et al., 2007). Opisane su i druge metode, i to: "cut stem" metoda (Thickett et al., 2007), prskanje biljaka suspenzijom spora (Ploetz & Shokes, 1985; Vidić, 1987) i suspenzijom micelije (Zhang et al., 1997), kao i stavljanje obolelih delova stabla soje u polje (Vidić, 1987).

Značajna varijabilnost u patogenosti uočena je i u okviru vrsta *P. longicolla* i anamorfnog stadijuma vrste *D. phaseolorum* var. *sojae* (Vidić et al., 1995; Li, 2011). Navodi se da je varijabilnost posebno izražena kod izolata *D. phaseolorum* var. *sojae* (Vidić et al., 1995), dok su izolati gljive *P. longicolla*, poreklom sa različitih domaćina, pokazali razlike u agresivnosti na biljkama soje (Li, 2011). Takođe, utvrđeno je da je *P. longicolla* virulentnija od anamorfnog stadijuma vrste *D. phaseolorum* var. *sojae*, ali da nisu uočene razlike u simptomima na semenu, klijancima i biljkama soje (Vidić et al., 1995). Patogenost ovih gljiva uspešno je proučavana metodom inokulacije semena ili biljaka soje suspenzijom spora (Vidić et al., 1995; Medić-Pap, 2006; Mengistu et al., 2007), zatim metodom agaroznog isečka (Mengistu et al., 2007) i "cut stem" metodom (Li, 2011).

Za utvrđivanje latentne zaraze gljivama roda *Diaporthe/Phomopsis* mogu se koristiti različite metode. Primena herbicida dovodi do izumiranja biljke i podstiče sporulaciju patogena na asimptomatičnom biljnom tkivu. Parakvat je prvi put

primenjen za utvrđivanje latentne zaraze mahuna i stabla soje (**Cerkauskas & Sinclair, 1980**). Takođe, za otkrivanje latentnih infekcija semena soje uspešno je primenjena serološka metoda ELISA (imunodetekcija) u detekciji pripadnika roda *Diaporthe/Phomopsis* (**Gleason et al., 1987; Brill & Sinclair, 1990; Velicheti et al., 1993**).

Kako se većina prouzrokovaca bolesti prenosi semenom, korišćenje zdravog semenskog materijala ili hemijsko tretiranje semena je bitno za prevenciju ili smanjenje bolesti (**Yorinori, 1994**). Nekontrolisanim uvozom semena mogu se uneti potpuno novi i često vrlo agresivni patogeni i/ili patotipovi već odomaćenih uzročnika bolesti. Korišćenje otpornih genotipova je najekonomičniji i pouzdan model za kontrolu bolesti. Međutim, za većinu parazita nema otpornih genotipova ili je nivo njihove otpornosti nezadovoljavajuć. Stoga, smanjenje intenziteta bolesti zahteva multidisciplinarnan pristup u kojem će genska otpornost biti samo jedan deo, a ostalo pripada agrotehnici, hemijskom tretiranju semena i folijarnoj zaštiti.

## 4. RADNA HIPOTEZA

Dosadašnja identifikacija *Diaporthe/Phomopsis* vrsta na soji u Srbiji bazirana je isključivo na morfološkim i odgajivačkim karakteristikama, na osnovu kojih su opisane dve vrste: *D. phaseolorum* (*D. phaseolorum* var. *caulivora* i *D. phaseolorum* var. *sojae*) i *P. longicolla*. Međutim, literaturni podaci sugerišu da je ovaj rod neophodno proučavati i sa molekularnog aspekta, jer postoje indicije da su na soji pored poznatih *Diaporthe/Phomopsis* vrsta prisutne i neke druge vrste ovog kompleksa.

Istraživanje se upravo zasniva na pretpostavci da su, pored poznatih predstavnika roda *Diaporthe/Phomopsis*, na soji u Srbiji prisutne i druge vrste. Pretpostavlja se da su druge vrste prisutne već duži niz godina, međutim determinisane su kao vrsta *D. phaseolorum* var. *sojae*, jer su morfološki veoma slične sa istom i teško ih je razlikovati. Literaturni podaci ukazuju na izrazitu morfološku i molekularnu varijabilnost *D. phaseolorum* var. *sojae*, što daje osnova da se pretpostavlja da nije u pitanju varijabilnost unutar vrste, već prisustvo sasvim drugih vrsta. Takođe, postoji mogućnost da su druge vrste ekonomski značajni paraziti soje, pa se nameće potreba njihovog detaljnijeg proučavanja.

## 5. MATERIJAL I METODE RADA

### 5.1. Izolacija gljiva

Kulture *Diaporthe/Phomopsis* sp. izolovane su iz obolelih biljnih delova soje (stabla, lisnih drški, mahuna i semena), koji su prikupljeni iz 14 lokaliteta sa područja Srbije (Rimski Šančevi, Karavukovo, Kukujevci, Ruma, Čalma, Gajdobra, Futog, Jaša Tomić, Srbobran, Šabac, Sombor, Vrbas, Zrenjanin i Subotica) u periodu od 2008. do 2010. godine.

Izolacija je rađena standardnim fitopatološkim metodama. Isečeni sitni fragmenti, sa obolelih biljaka, sterilizovani su 5% natrijum-hipohloritom (NaOCl) u trajanju od 5 minuta. Nakon toga, isprani su dva puta sterilnom vodom i stavljeni u Petri kutije na PDA podlogu. Potom su inkubirani na temperaturi od  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Nakon tri dana kolonije su presejavane nanošenjem fragmenta micelije u centar Petri kutije, radi dobijanja čistih kultura. Praćen je razvoj gljive i evidentirana je pojava reproduktivnih organa. Oslobođanje spora se manifestuje u vidu sluzastih kapi na vrhovima plodonosnih tela, koje su uzimane bakteriološkom ezom i pravljen je razmaz na svežoj PDA podlozi. Nakon toga, kopljastom iglom je isečen deo podloge oko jedne klijale konidije, koji je prenet na novu PDA podlogu. Ovim postupkom su dobijeni monosporni izolati. Izolacija iz semena je rađena na potpuno identičan način. Po pet površinski sterilizovanih zrna stavljeno je u Petri kutije na PDA podlogu i nakon razvoja kulture, fragment micelije je presejan na svežu PDA podlogu.

Gljive su determinisane na osnovu morfoloških karakteristika (Prilog 3) kao *D. phaseolorum* var. *caulivora*, *D. phaseolorum* var. *sojae* ili *P. longicolla*. Nakon toga, determinisani izolati su presejani na kosi PDA agar i čuvani na temperaturi od  $4^{\circ}\text{C}$ . Formirana je kolekcija od ukupno 76 izolata roda *Diaporthe/Phomopsis* (Tabela 1). Od ukupnog broja, tri izolata su poreklom sa suncokreta (*Helianthus annuus*) i na osnovu morfoloških karakteristika determinisani su kao *Diaporthe helianthi*.

U istraživanje je uključeno i 87 izolata iz kolekcije M. Vidića (Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad), koji su prikupljeni u periodu od 1994. do 2005.



godine iz 13 lokaliteta sa područja Srbije i iz jednog lokaliteta sa područja Hrvatske, Mađarske, Ukrajne i Kazahstana. Ovi izolati su determinisani kao *D. phaseolorum* var. *caulivora* (27 izolata), *D. phaseolorum* var. *sojajae* (30 izolata) i *P. longicolla* (30 izolata) (Tabela 1).

Takođe, obrađeno je i 11 izolata poreklom iz SAD. Ovi izolati pripadaju kolekciji A. F. Fernández-a (University of Georgia, Athens) i determinisani su kao *D. phaseolorum* var. *caulivora* (Dpc 313), *D. phaseolorum* var. *meridionalis* (Dpm 201, Dpm 421, Dpm 664 i Dpm 1F) i *P. longicolla* (Dps 7, PI 2, PI 3, PI 5, PI 303 i PI RKV) (Tabela 1). Izolati Dpc 313, Dpm 1F i Dps 7 odabrani su za referentne izolate vrste *D. phaseolorum* var. *caulivora*, *D. phaseolorum* var. *meridionalis* i *P. longicolla* (Fernández & Hanlin, 1996).

Sve kulture su održavane na kosom PDA agaru, temperaturi od 4°C i periodičnim presejavanjem (jednom godišnje). Međutim, usled čestih presejavanja kulture gube sposobnost fruktifikacije i smanjuje se stepen patogenosti. Zbog toga, svake druge godine kulture su revitalizovane unošenjem micelije u stabla klijanaca soje, a zatim su rađene reizolacije.

Za potrebe ovog istraživanja svi izolati sumirani u tabeli 1, prethodno su revitalizovani, a zatim su rađena proučavanja morfoloških, molekularnih i patogenih karakteristika.

Dosadašnja istraživanja pokazala su da morfološke i odgajivačke karakteristike nisu dovoljne za pravilnu determinaciju gljiva roda *Diaporthe/Phomopsis*. Iz tog razloga, u ovom istraživanju prvo je sprovedena molekularna identifikacija svih 174 izolata. Na osnovu dobijenih rezultata urađen je morfološki profil vrsta i za svaku identifikovanu vrstu odabrano je nekoliko reprezentativnih izolata na osnovu kojih je sprovedena molekularna i patogena karakterizacija.

**Tabela 1. Spisak proučavanih izolata**

Vrsta <sup>1</sup>	Izolat <sup>2</sup>	Poreklo	Godina izolacije	Organ biljke	Kolekcionar
<i>D. phaseolorum</i> <i>var. caulivora</i>	<b>Dpc 313</b>	SAD	1990	stablo	A. F. Fernández
	DPC1	Rimski Šančevi	1994	stablo	M. Vidić
	DPC4	Rimski Šančevi	1994	stablo	M. Vidić
	DPC6	Rimski Šančevi	1994	stablo	M. Vidić
	DPC7	Rimski Šančevi	1995	stablo	M. Vidić
	DPC8	Rimski Šančevi	1995	stablo	M. Vidić
	DPC9	Rimski Šančevi	1996	stablo	M. Vidić
	DPC11	Loznica	1996	stablo	M. Vidić
	DPC12	Kovin	1996	stablo	M. Vidić
	DPC13	Hrvatska	1996	stablo	M. Vidić
	DPC14	Ruma	1996	stablo	M. Vidić
	DPC15	Hajdučica	1996	stablo	M. Vidić
	DPC16	Pančevo	1997	stablo	M. Vidić
	DPC17	Ruma	1997	stablo	M. Vidić
	DPC18	Stara Pazova	1997	stablo	M. Vidić
	DPC19	Stara Pazova	1997	stablo	M. Vidić
	DPC20	Hrvatska	1997	stablo	M. Vidić
	DPC21	Mađarska	1997	stablo	M. Vidić
	DPC22	Mađarska	1997	stablo	M. Vidić
	DPC23	Rimski Šančevi	1998	stablo	M. Vidić
	DPC29	Rimski Šančevi	1998	seme	M. Vidić
	DPC31	Rimski Šančevi	1998	seme	M. Vidić
	DPC32	Rimski Šančevi	1998	seme	M. Vidić
	DPC33	Loznica	2002	seme	M. Vidić
	DPC34	Loznica	2002	seme	M. Vidić
	DPC35	Šabac	2004	seme	M. Vidić
	DPC36	Vrbas	2004	seme	M. Vidić
	DPC60	Kazahstan	2005	stablo	M. Vidić
	DPC/KR1	Rimski Šančevi	2008	seme	K. Petrović
	DPC/KR2	Karavukovo	2008	seme	K. Petrović
	DPC/KR3	Karavukovo	2008	seme	K. Petrović
	DPC/KR4	Kukujevci	2008	seme	K. Petrović
	DPC/KR5	Kukujevci	2008	seme	K. Petrović
DPC/KR6	Kukujevci	2008	seme	K. Petrović	
DPC/KR7	Karavukovo	2008	seme	K. Petrović	
DPC/KR8	Ruma	2008	seme	K. Petrović	
DPC/KR9	Ruma	2008	seme	K. Petrović	
DPC/KR10	Kukujevci	2008	seme	K. Petrović	
DPC/KR11	Čalma	2009	stablo	K. Petrović	
DPC/KR12	Gajdobra	2009	stablo	K. Petrović	
DPC/KR13	Futog	2009	stablo	K. Petrović	
DPC/KR14	Jaša Tomić	2009	stablo	K. Petrović	
DPC/KR15	Rimski Šančevi	2009	stablo	K. Petrović	
DPC/KR16	Rimski Šančevi	2009	stablo	K. Petrović	
DPC/KR17	Srbobran	2009	stablo	K. Petrović	
DPC/KR18	Rimski Šančevi	2009	stablo	K. Petrović	

(nastavak na sledećoj strani)

**Tabela 1. (nastavak)**

Vrsta <sup>1</sup>	Izolat <sup>2</sup>	Poreklo	Godina izolacije	Organ biljke	Kolekcionar
	DPC/KR19	Futog	2009	stablo	K. Petrović
	DPC/KR21	Rimski Šančevi	2009	stablo	K. Petrović
	DPC/KR22	Rimski Šančevi	2009	stablo	K. Petrović
	DPC159	Rimski Šančevi	2010	stablo	K. Petrović
	DPC161b	Rimski Šančevi	2010	stablo	K. Petrović
<i>D. phaseolorum</i> <i>var. meridionalis</i>	<b>Dpm 1F</b>	SAD	1990	stablo	A. F. Fernández
	Dpm 201	SAD	1990	stablo	A. F. Fernández
	Dpm 421	SAD	1990	stablo	A. F. Fernández
	Dpm 664	SAD	1990	stablo	A. F. Fernández
<i>D. phaseolorum</i> <i>var. sojae</i>	PS4	Rimski Šančevi	1994	seme	M. Vidić
	PS14	Rimski Šančevi	1994	stablo	M. Vidić
	PS15	Rimski Šančevi	1995	stablo	M. Vidić
	PS22	Loznica	1996	seme	M. Vidić
	PS26	Sombor	1997	seme	M. Vidić
	PS34	Rimski Šančevi	1998	seme	M. Vidić
	PS35	Rimski Šančevi	1998	seme	M. Vidić
	PS36	Ruma	2002	seme	M. Vidić
	PS37	Pančevo	2002	seme	M. Vidić
	PS39	Šabac	2002	seme	M. Vidić
	PS40	Šabac	2002	seme	M. Vidić
	PS41	Ruma	2002	seme	M. Vidić
	PS42	Loznica	2002	seme	M. Vidić
	PS43	Loznica	2002	seme	M. Vidić
	PS44	Loznica	2002	seme	M. Vidić
	PS45	Loznica	2002	seme	M. Vidić
	PS47	Veliki Radinci	2004	seme	M. Vidić
	PS48	Pančevo	2004	seme	M. Vidić
	PS49	Žabalj	2004	seme	M. Vidić
	PS50	Šabac	2004	seme	M. Vidić
	PS51	Šabac	2004	seme	M. Vidić
	PS52	Vrbaš	2004	seme	M. Vidić
	PS54	Zrenjanin	2004	seme	M. Vidić
	PS55	Zrenjanin	2004	seme	M. Vidić
	PS56	Zrenjanin	2004	seme	M. Vidić
	PS57	Zrenjanin	2004	seme	M. Vidić
	PS58	Ukrajina	2005	stablo	M. Vidić
	PS59	Ukrajina	2005	stablo	M. Vidić
	PS61	Pančevo	2005	seme	M. Vidić
	PS62	Pančevo	2005	seme	M. Vidić
	PS/KR1	Vrbaš	2008	seme	K. Petrović
	PS/KR2	Ruma	2008	seme	K. Petrović
	PS/KR3	Šabac	2008	seme	K. Petrović
	PS/KR4	Karavukovo	2008	seme	K. Petrović
PS63	Rimski Šančevi	2010	seme	K. Petrović	
PS64	Rimski Šančevi	2010	seme	K. Petrović	

(nastavak na sledećoj strani)

**Tabela 1. (nastavak)**

Vrsta <sup>1</sup>	Izolat <sup>2</sup>	Poreklo	Godina izolacije	Organ biljke	Kolekcionar
	PS65	Rimski Šančevi	2010	seme	K. Petrović
	PS66	Rimski Šančevi	2010	seme	K. Petrović
	PS69	Sombor	2010	seme	K. Petrović
	PS70	Sombor	2010	seme	K. Petrović
	PS71	Subotica	2010	seme	K. Petrović
	PS72	Subotica	2010	seme	K. Petrović
	PS72	Subotica	2010	seme	K. Petrović
	PS73	Subotica	2010	seme	K. Petrović
	PS74	Subotica	2010	seme	K. Petrović
	PS76	Subotica	2010	seme	K. Petrović
	PS158	Rimski Šančevi	2010	seme	K. Petrović
<i>P. longicolla</i>	<b>Dps 7</b>	SAD	1990	seme	A. F. Fernández
	PI 2	SAD	1990	seme	A. F. Fernández
	PI 3	SAD	1990	seme	A. F. Fernández
	PI 5	SAD	1990	seme	A. F. Fernández
	PI 303	SAD	1990	seme	A. F. Fernández
	PI RKV	SAD	1990	seme	A. F. Fernández
	PL1	Rimski Šančevi	1994	stablo	M. Vidić
	PL3	Rimski Šančevi	1994	seme	M. Vidić
	PL5	Rimski Šančevi	1994	stablo	M. Vidić
	PL6	Rimski Šančevi	1994	seme	M. Vidić
	PL8	Rimski Šančevi	1994	stablo	M. Vidić
	PL9	Rimski Šančevi	1994	stablo	M. Vidić
	PL10	Rimski Šančevi	1994	stablo	M. Vidić
	PL12	Rimski Šančevi	1994	seme	M. Vidić
	PL13	Rimski Šančevi	1994	seme	M. Vidić
	PL17	Rimski Šančevi	1995	stablo	M. Vidić
	PL18	Rimski Šančevi	1995	stablo	M. Vidić
	PL19	Rimski Šančevi	1996	stablo	M. Vidić
	PL20	Loznica	1996	stablo	M. Vidić
	PL21	Loznica	1996	stablo	M. Vidić
	PL27	Rimski Šančevi	1997	stablo	M. Vidić
	PL35	Rimski Šančevi	1998	seme	M. Vidić
	PL36	Rimski Šančevi	1998	seme	M. Vidić
	PL37	Rimski Šančevi	1998	seme	M. Vidić
	PL38	Rimski Šančevi	1998	seme	M. Vidić
	PL50	Rimski Šančevi	2001	seme	M. Vidić
	PL51	Rimski Šančevi	2001	seme	M. Vidić
	PL39	Loznica	2002	seme	M. Vidić
	PL40	Loznica	2002	seme	M. Vidić
	PL41	Loznica	2002	seme	M. Vidić
	PL42	Loznica	2002	seme	M. Vidić
	PL44	Žabalj	2004	seme	M. Vidić
	PL45	Vrbas	2004	seme	M. Vidić
PL46	Vrbas	2004	seme	M. Vidić	
PL47	Zrenjanin	2004	seme	M. Vidić	

(nastavak na sledećoj strani)

**Tabela 1. (nastavak)**

Vrsta <sup>1</sup>	Izolat <sup>2</sup>	Poreklo	Godina izolacije	Organ biljke	Kolekcionar
	PL48	Zrenjanin	2004	seme	M. Vidić
	PL/KR1	Sombor	2008	seme	K. Petrović
	PL/KR2	Karavukovo	2008	seme	K. Petrović
	PL/KR4	Karavukovo	2008	seme	K. Petrović
	PL/KR5	Kukujevci	2008	seme	K. Petrović
	PL/KR6	Ruma	2008	seme	K. Petrović
	PL/KR7	Šabac	2008	seme	K. Petrović
	PL/KR8	Kukujevci	2008	seme	K. Petrović
	PL/KR9	Kukujevci	2008	seme	K. Petrović
	PL/KR10	Karavukovo	2008	seme	K. Petrović
	PL/KR11	Kukujevci	2008	seme	K. Petrović
	PL/KR12	Kukujevci	2008	seme	K. Petrović
	PL/KR13	Rimski Šančevi	2009	stablo	K. Petrović
	PL/KR14	Rimski Šančevi	2009	stablo	K. Petrović
	PL/KR15	Rimski Šančevi	2009	stablo	K. Petrović
	PL/KR16	Rimski Šančevi	2009	stablo	K. Petrović
	PL/KR17	Rimski Šančevi	2009	stablo	K. Petrović
	PL/KR18	Rimski Šančevi	2009	stablo	K. Petrović
	PL/KR19	Rimski Šančevi	2009	stablo	K. Petrović
	PL/KR20	Rimski Šančevi	2009	stablo	K. Petrović
	PL/KR21	Zrenjanin	2009	stablo	K. Petrović
	PL/KR1a	Rimski Šančevi	2009	stablo	K. Petrović
	PL/KR1b	Rimski Šančevi	2009	stablo	K. Petrović
	PL/KR2a	Rimski Šančevi	2009	stablo	K. Petrović
	PL/KR3a	Rimski Šančevi	2009	stablo	K. Petrović
	PL/KR3b	Rimski Šančevi	2009	stablo	K. Petrović
	PL/KR4a	Rimski Šančevi	2009	stablo	K. Petrović
	PL/KR4b	Rimski Šančevi	2009	stablo	K. Petrović
	PL67	Rimski Šančevi	2010	seme	K. Petrović
	PL68	Sombor	2010	seme	K. Petrović
	PL75	Subotica	2010	seme	K. Petrović
	PDS157A	Rimski Šančevi	2010	stablo	K. Petrović
	PDS157B	Rimski Šančevi	2010	stablo	K. Petrović
	PDS157C	Rimski Šančevi	2010	stablo	K. Petrović
	PDS78	Rimski Šančevi	2010	stablo	K. Petrović
<b><i>D. helianthi</i></b>	PH1	Rimski Šančevi	2008	stablo	K. Petrović
	PH2	Rimski Šančevi	2008	stablo	K. Petrović
	PH3	Rimski Šančevi	2009	stablo	K. Petrović

<sup>1</sup> Sve vrste su izolovane iz soje, osim izolata PH1, PH2 i PH3 koji su izolovani iz suncokreta.

<sup>2</sup> Boldovani izolati su odabrani za referentne izolate vrste *D. phaseolorum* var. *caulivora*, *D. phaseolorum* var. *meridionalis* i *P. longicolla*.

## 5.2. Ekstrakcija DNK

Ekstrakcija DNK rađena je po **Cenis-u (1992)** sa manjim izmenama u protokolu. Sve gljive su zasejane u Petri kutije, veličine 90 mm, na PDA podlogu. Kada je kolonija gljive prekrila kompletnu površinu Petri kutija, žiletom je sastrugana i preneti u mikrotube.

U slučaju da kulture slabo razvijaju miceliju na PDA podlozi, tada su zasejavane u Erlenmajer boce sa PDB podlogom. Erlenmajer boce su ostavljene u rotacionom šejkeru (100 rpm) sedam dana na sobnoj temperaturi. Nakon toga, micelija je prvo izdvojena pomoću filtera Miracloth (Calbiochem), a zatim je stavljena između par slojeva papira kako bi se odstranila preostala tečnost. Dobijena suva micelija je preneti u mikrotubu.

U svaku mikrotubu dodano je 300  $\mu$ l ekstrakcionog pufera (200 mM Tris HCl, pH 8,5; 250 mM NaCl i 25 mM EDTA) i sterilizovana kuglica za razaranje micelije. Mikrotube su stavljene u homogenizator TissueLyser na frekvenciju od 30 Hz u trajanju od 2 minuta, kako bi se dobio homogenat micelije.

U homogenat je dodano 25  $\mu$ l 10% SDS i mikrotube su stavljene u vodeno kupatilo na temperaturu od 65°C u trajanju od 10 minuta.

Nakon toga, dodano je 150  $\mu$ l 3M natrijum-acetata (pH 5,2) i mikrotube su ostavljene 10 minuta na temperaturi od -20°C. Potom, mikrotube su centrifugirane (12000 rpm) na temperaturi od 4°C u trajanju od 10 minuta.

Po završetku centrifugiranja, supernatant je prenesen u nove mikrotube, izmerena je zapremina i dodata je ista količina izopropanola. Mikrotube sa izopropanolom su ostavljene na sobnoj temperaturi 5 minuta, pa su centrifugirane (12000 rpm) na temperaturi od 25°C u trajanju od 30 minuta.

Nakon centrifugiranja, izopropanol je odstranjen, tako da je na dnu mikrotuba ostao samo talog (DNK). Zatim je dodano 800  $\mu$ l 70% etanola i mikrotube su ponovo centrifugirane (12000 rpm) na temperaturi od 25°C u trajanju od 10 minuta. Potom je etanol odstranjen i mikrotube su ostavljene 1-2 časa u laminarnoj komori, kako bi se u potpunosti osušile. Kada je sav etanol ispario u svaku mikrotubu dodano je 50  $\mu$ l TE pufera (10 mM Tris HCl, pH 7,5 i 1 mM EDTA).

Nakon toga, pomoću elektroforeze (Electrophoresis system, Biorad) na 0,7% agaroznom gelu sa 4 µl boje GelRed™ (Biotium) proveren je kvalitet ekstatovane DNK, koristeći 1 µl DNA Loading buffer Blue 6×, 2 µl ekstrahovane DNK i 3 µl TE pufera. Po završetku elektroforeze, gel je očitao pomoću sistema GelDoc 2000 (Biorad).

### 5.3. Lančana reakcija polimeraze (PCR)

Kod svih izolata ITS region je amplifikovan univerzalnim prajmerima ITS<sub>5</sub> i ITS<sub>4</sub> (White *et al.*, 1990). Na osnovu sekvenci ITS regiona odabrani su reprezentativni izolati, kod kojih je dodatno sekvencioniran deo velike ribozomalne subjedinice (LSU) i deo TEF<sub>1-α</sub> gena. Ovi regioni amplifikovani su setom prajmera LR<sub>0</sub>R/LR<sub>3</sub> (Rehner & Samuels, 1994) i EF<sub>1</sub>-728F/EF<sub>1</sub>-986R (Carbone & Kohn, 1999), (Tabela 2).

Tabela 2. Sekvence oligonukleotidnih prajmera			
Lokus	Prajmer	F/R <sup>1</sup>	Sekvence prajmera
ITS <sub>1</sub> -5.8S-ITS <sub>2</sub>	ITS <sub>5</sub>	F	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG
	ITS <sub>4</sub>	R	TCCTCCGCTTATTGATATGC
LSU	LR <sub>0</sub> R	F	GTACCCGCTGAACTTAAGC
	LR <sub>3</sub>	R	CCGTGTTTCAAGACGGG
TEF <sub>1-α</sub>	EF <sub>1</sub> -728F	F	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG
	EF <sub>1</sub> -986R	R	TACTTGAAGGAACCCTTACC

<sup>1</sup> F = *forward* prajmer, odnosno prednji prajmer; R = *reverse* prajmer, odnosno obrnuti prajmer

PCR reakciona smeša zapremine 25 µl sastoji se od sledećih komponenata: 1 µl ekstatovanog DNK, 1× pufera (Bioline), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Bioline), 0,2 mM dNTP (Bioline), 0,25 µM rastvora oba prajmera, 0,5 U *Taq* polimeraze (Bioline) i sterilnu MilliQ vodu (dejonizovana voda Millipore sistemom).

Lančana reakcija polimeraze sprovedena je pomoću Biometra Tpersonal PCR aparata (Biometra, Göttingen, Germany). Uz svaku PCR reakciju uključena je i "blank" kontrola za detekciju kontaminacije, koja sadrži sve reagense izuzev DNK.

Za amplifikaciju ITS regiona procedura započinje inicijalnom denaturacijom na temperaturi od 94°C u toku 2 minuta, a zatim je 30 ciklusa praćeno

denaturacijom na 94°C tokom 30 sekundi, hibridizacijom prajmera na 58°C tokom 30 sekundi i elongacijom na 72°C u trajanju od 1 minuta. Posle poslednjeg ciklusa, nastupa finalna elongacija u trajanju od 7 minuta na 72°C, kako bi došlo do kompletiranja parcijalno elongiranih produkata. Za amplifikaciju dela LSU regiona i dela TEF<sub>1</sub>- $\alpha$  gena tabelarno je predstavljen neophodan broj ciklusa određenog trajanja i radne temperature (Tabela 3, Tabela 4).

Tabela 3. Program amplifikacije LSU gena sa LR <sub>0</sub> R/LR <sub>3</sub> prajmerima			
Faza	Temperatura (°C)	Vreme (min)	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija	94	5	
Denaturacija	94	1	35
Hibridizacija prajmera	50	1	
Elongacija	72	2	
Finalna elongacija	72	7	

Tabela 4. Program amplifikacije TEF <sub>1</sub> - $\alpha$ gena sa EF <sub>1</sub> -728F/EF <sub>1</sub> -986R prajmerima			
Faza	Temperatura (°C)	Vreme (min)	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija	94	5	
Denaturacija	94	0,15	35
Hibridizacija prajmera	55	0,20	
Elongacija	72	1	
Finalna elongacija	72	5	

Učinak amplifikacije proveren je pomoću elektroforeze na 1,5% agaraznom gelu sa 4  $\mu$ l boje GelRed™ (Biotium), koristeći 1  $\mu$ l DNA Loading buffer Blue 6 $\times$  i 5  $\mu$ l produkta amplifikacije. Kao marker korišćen je 1 kb Plus DNA Ladder u količini od 5  $\mu$ l. Po završetku elektroforeze, gel je očitán pomoću sistema GelDoc 2000 (Biorad).

#### 5.4. Sekvencioniranje

PCR produkti su prečišćeni pomoću NucleoSpin® Extract II seta (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Nemačka) prema standardnom protokolu. Nakon toga, količina amplifikovanih ciljnih DNK fragmenata je kvantifikovana na dva načina. Prvi način je kvantifikacija pomoću elektroforeze na 1,5% agaroznom gelu sa 4  $\mu$ l boje GelRed™ (Biotium), koristeći 1  $\mu$ l DNA Loading buffer Blue 6 $\times$ , 2  $\mu$ l TE pufera i 3  $\mu$ l prečišćenog produkta amplifikacije. Kao kvantifikacioni marker



korišćen je FastRuler™ High Range DNA Ladder u količini od 5 µl. Po završetku elektroforeze, gel je očitán sistemom GelDoc 2000 (Biorad) i na osnovu dobijene slike urađena je vizuelna kvantifikacija uzoraka u odnosu na marker. Drugi način kvantifikacije je obavljen fluorometrijskom metodom, koja za određivanje koncentracije proteina i nukleinskih kiselina (DNK i RNK) u uzorku, koristi fluorescentne boje. Za kvantifikaciju DNK korišćen je Quant-iT™ DNA Assay Kit (Qubit, Invitrogen).

Jedan deo uzoraka sekvencioniran je u laboratoriji Genechron, (Rim, Italija) pomoću sekvencera ABI 3730, a jedan deo u laboratoriji Macrogen Inc. (Seul, Koreja) pomoću sekvencera ABI 3730xl, koristeći BigDye™ Terminator Sequence Kits (Applied Biosystems). ITS region, kao i deo LSU i TEF<sub>1</sub>-α gena, sekvencionirani su u oba pravca pomoću istih prajmera koji su korišćeni za amplifikaciju.

## 5.5. Analiza sekvenci i identifikacija BLAST metodom

Sekvence ITS regiona su primenom BLAST algoritma upoređene sa postojećim sekvencama u NCBI bazi podataka ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) i na osnovu toga je urađena identifikacija izolata. Na osnovu ITS identifikacije odabrani su reprezentativni izolati kod kojih je dodatno sekvencioniran deo LSU i TEF<sub>1</sub>-α gena.

Nakon identifikacije, sekvence su poravnate pomoću ClustalW algoritma (Larkin *et al.*, 2007). Terminalni regioni sekvenci, kojima često nedostaju podaci, su uklonjeni, tako da su sve sekvence svedene na jednak broj molekularnih karaktera. U programu MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011) urađeno je poređenje sekvenci između vrsta, ali i između izolata iste vrste, kako bi se ustanovio nivo varijabilnosti ispitivanih sekvenci (opcija VARIABLE SITES).

## 5.6. Filogenetska obrada podataka

Procena filogenetskih odnosa *Diaporthe/Phomopsis* vrsta obavljena je na osnovu ITS, LSU i TEF<sub>1</sub>-α sekvenci. Kao spoljašnja grupa za rekonstrukciju filograma korišćene su sledeće sekvence: *Valsa ceratosperma* (DQ241769) i *Leucostoma persoonii* (DQ996042) za ITS filogram; *Valsa ambiens* (EU255208) i

*Leucostoma niveum* (AF408367) za LSU filogram i *Valsa ambiens* (DQ862041) i *Leucostoma niveum* (DQ862035) za TEF<sub>1</sub>- $\alpha$  filogram. Filogenetske analize sprovedene su u programu PAUP\* 4.0b10 (**Swofford, 2002**) pomoću metoda Neighbor Joining (NJ) i Maximum Parsimony (MP), dok je kod LSU sekvenci, pored ove dve analize, primenjena i metoda minimalne evolucije (ME). NJ filogram rekonstruisan je pomoću K2P (engl. Kimura two-parameter) supstitucionog modela, dok su ME i MP filogrami rekonstruisani pomoću heurističnog algoritma sa slučajnim dodavanjem sekvenci. Sekvence su topološkom transformacijom TBR dodavane 1000 puta sa aktiviranom opcijom MULTREES. Kod sve tri metode primenjena je butstrap analiza od 1000 ponavljanja (**Felsenstein, 1985**). Kod MP metode, butstrap analiza je sprovedena bez MULTREES opcije. Za MP filograme date su vrednosti dužine filograma (TL) i sve četiri statističke mere homoplazije: indeks konzistencije (CI), indeks retencije (RI), standardizovani indeks konzistencije (RCI) i indeks homoplazije (HI).

Homoplazija je slučaj, kada taksoni imaju isti karakter koji ne potiče od zajedničkog pretka, već su posledica konvergentne, paralelne ili reverzne evolucije. Dakle, kada je CI = 1 tada je karakter evoluirao savršeno parsimonično, odnosno bez homoplazije. Vrednost ovog indeksa se približava nuli (0), kada se broj homoplazija povećava. S obzirom da CI indeks nema minimalnu vrednost nula, uveden je RCI indeks koji je jednak nuli kada je prisutna maksimalna homoplazija. Indeks konzistentnosti se povećava sa brojem taksona, što znači da ovaj indeks nije lako porediti između grupa podataka. Da bi se prevazišao ovaj problem, uveden je RI indeks, koji meri stepen potencijalne sinapomorfности. Sinapomorfni karakteri su izvedeni karakteri u odnosu na predačko stanje, ali slični kod različitih taksona iz grupe i spadaju u informativne karaktere, jer govore o filogenetskom grupisanju taksona u odnosu na druge sa drugačijim stanjem karaktera. Vrednost RI = 1 ukazuje da je karakter u potpunom skladu sa filogenijom, a RI = 0 predstavlja maksimalni iznos homoplazije. Stepem homoplazije takođe se može predstaviti i pomoću HI indeksa, koji se dobija jednostavnim oduzimanjem:  $1 - CI$ .

## 5.7. Identifikacija PCR-RFLP metodom

ITS sekvence reprezentativnih izolata (Tabela 5) su, koristeći virtuelni RFLP program ApE v.2.0.42. (<http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>), simulativno degestovane restrikcijom enzimima *AluI*, *RsaI*, *HhaI*, *MseI* i *StyI*. Ovo je rađeno kako bi se utvrdilo da li ITS sekvence identifikovanih vrsta imaju različite RFLP profile, kao i potencijalna mogućnost primene PCR-RFLP metode za brzu i pozdanu identifikaciju *Diaporthe/Phomopsis* vrsta.

**Tabela 5. Spisak izolata čije ITS sekvence su podvrgnute simulativnoj digestiji**

Izolat	
Dpm 1F	PS76
DPC/KR15	PS26
DPC/KR21	PS65
PS63	PS57
PS69	PL157A
PS73	PL68
PS/KR3	PL/KR6
PS22	PL44

## 5.8. Morfološke i odgajivačke karakteristike

Na osnovu rezultata dobijenih molekularnom karakterizacijom odabrani su reprezentativni izolati i detaljno su proučene njihove morfološke karakteristike. Porast i sporulacija gljiva praćena je na šest podloga: PDA podlozi, PDA sa sterilizovanim stablima soje, podlozi od ovasa (OAT), Čapek podlozi i podlogama od sojinog mleka i semena soje. U Petri kutije prečnika 90 mm razliveno je 20 ml odgovarajuće podloge, a zatim je u centar zasejana micelija gljive. Petri kutije su potom inkubirane u klima komori na temperaturu od  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Nakon pet dana izolati su stavljani u polietilenske kese na sobnoj temperaturi. Praćenje razvoja kolonije i određivanje brzine porasta rađeno je od drugog dana po presejavanju, pa sve dok gljiva nije ispunila površinu Petri kutije. Oblik, izgled i boja kolonije, kao i stroma, ocenjivani su vizuelno, a pomoću binokularne lupe (Motic, SMZ168) praćeno je formiranje reproduktivnih organa, koji su opisani i izmereni pomoću mikroskopa (Leica, DMLS) i fotografisani digitalnom kamerom FinePix Z10fd.

## 5.9. Patogenost

Provera patogenosti 20 izolata, odabranih na osnovu sekvenci ITS, LSU i TEF1- $\alpha$  regiona (Tabela 6), obavljena je inokulacijama biljaka i semena soje (sorta Balkan). Prvo je utvrđeno zdravstveno stanje semena, tako što je uzet uzorak od 100 zrna i u svaku Petri kutiju na PDA podlogu stavljeno je po pet površinski sterilizovanih zrna soje. Ovaj postupak je rađen da bi se utvrdio procenat latentno inficiranog semena gljivama roda *Diaporthe/Phomopsis*. S obzirom da se iz semena nije razvila kolonija, u ogledima je korišćeno potpuno zdravo seme.

Tabela 6. Izolati korišćeni u ispitivanjima patogenosti	
izolat	
PL157A	PS76
PL68	PS22*
PL75	PS48*
DPC/KR15	PS26
DPC/KR21	PS51
Dpm 1F	PS65
PS63	PS74
PS69*	PS56*
PS73	PS57
PS/KR3*	PH1

\* Izolati koji nisu fruktificirali i nisu korišćeni pri inokulaciji suspenzijom spora

### 5.9.1. Inokulacija biljaka soje

**Metoda agaroznog isečka.** Metoda agaroznog isečka primenjena je u fenofazi V<sub>2</sub>, odnosno u vreme razvoja prvog troperog lista. Odabrani izolati zasejani su na PDA podlogu. Nakon pet dana uzeti su jednaki agarozni isecci (prečnika 5 mm) sa ruba kolonije. Stablo klijanaca je, oko 1 cm iznad kotiledona, vertikalno zasečeno kopljastom iglom. U povredu je stavljen agarozni isečak, a oko mesta inokulacije obavijena je vlažna pamučna vata i aluminijumska folija. U kontrolnoj varijanti u povredu na klijanacima stavljen je agarozni isečak bez micelije. Inokulisane biljke su držane u stakleniku na temperaturi od 24°C, gde je svakodnevno održavana visoka relativna vlažnost. Tokom 20 dana, praćena je dinamika propadanja biljaka, koja je predstavljena pomoću AUDPC vrednosti.

**Metoda inokulacije suspenzijom spora.** Radi što brže indukcije sporulacije *in vitro* odabrani izolati su zasejani na podlogu od sterilizovanih stabla soje. Do fruktifikacije nije došlo kod izolata PS69, PS/KR3, PS22, PS48 i PS56. Zrela plodonosna tela (piknidi ili peritecije) su sterilnom pincetom izvađena iz stabla i u avanu sa sterilnom vodom su macerirana, kako bi se oslobodile spore (piknospore ili askospore). Dobijena suspenzija je proceđena kroz sterilnu gazu, da bi se odstranili delovi stabla i plodonosnih tela. Za inokulaciju korišćena je suspenzija spora koncentracije  $1 \times 10^6$  spora/ml, koja je određena hemocitometrom, dok je klijavost spora utvrđena mikroskopiranjem.

Metoda se sastoji u nanošenju suspenzije spora u povrede napravljene u pazuhu lisnih peteljki (Vidić, 1987). Ova metoda je primenjena u R<sub>5</sub>-R<sub>6</sub> fenofazi, odnosno u vreme nalivanja zrna. Na dva mesta na biljci (prva i četvrta nodija) napravljen je plitak zarez u koji je zatim uneto po 1 ml suspenzije spora. Inokulisana mesta su obavijena vlažnom pamučnom vatom i aluminijumskom folijom. Takođe, u kontroli, biljke su podvrgnute istom postupku, ali umesto suspenzije spora u povrede je stavljen 1 ml sterilne vode. Od dana inokulacije, pa sve do 30 dana, praćena je pojava simptoma.

### 5.9.2. Inokulacija semena soje

**Metoda inokulacije suspenzijom micelije.** Izolati su dgajeni na PDA podlozi tokom sedam dana. Nakon toga, u Petri kutije sipano je 50 ml sterilne vode i skalpelom je sastrugana micelija. Seme je u suspenziji držano 2 sata, a zatim je stavljeno u Petri kutije na sterilan filter papir. U kontrolnoj varijanti, seme je potopljeno u sterilnu vodu. Ogled je postavljen u 4 ponavljanja od po 25 zrna (ukupno 100 zrna). Inokulisano seme na filter papiru je inkubirano na temperaturi od  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  u trajanju od sedam dana. Nakon tog perioda utvrđena je klijavost semena, kao i broj trulih klijalih i nekljalih zrna.

**Metoda inokulacije suspenzijom spora.** Inokulum je pripremljen na identičan način opisan u poglavlju 5.9.1., a inokulacija je sprovedena potapanjem semena soje u suspenziju spora. Seme je u suspenziji držano 2 sata, a zatim je 100 zrna raspoređeno u četiri Petri kutije (25 zrna po Petri kutiji) na sterilan filter

papir. U kontrolnoj varijanti, seme je potopljeno u sterilnu vodu. Inokulisano seme je inkubirano na temperaturi od  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  u trajanju od sedam dana, a zatim je utvrđena klijavost, kao i broj trulih klijalih i neklijalih zrna.

### 5.9.3. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka korišćen je program STATISTICA 9 (StatSoft, 2009). Rezultati oglada, sprovedeni u cilju određivanja stepena patogenosti *Diaporthe/Phomopsis* vrsta na semenu soje, obrađeni su pomoću Dunnett testa. Srednje vrednosti svih tretmana su upoređene sa kontrolom i na taj način su izdvojeni statistički značajni tretmani na nivou značajnosti od 0,05.

Koeficijenta korelacije ( $r$ ) i metoda glavnih komponentata (engl. Principal Component Analysis) primenjene su za sagledavanje međusobne veze između rezultata dobijenih u različitim testovima patogenosti. Korelacija je poslužila za sagledavanje veze između broja trulih zrna u ogledu sa suspenzijom micelije i suspenzijom spora, dok je PCA multivarijaciona metoda korišćena kao ordinaciona tehnika za grupisanje izolata prema stepenu patogenosti.

## 6. REZULTATI

### 6.1. Izolacija gljiva

Gljive su izolovane iz biljaka sa tipičnim simptomima raka stabla, odnosno prevremeno osušene biljke sa karakterističnim tamnim pegama na nodusu (Slika 3 a). Takođe, izolacija je rađena i iz biljaka sa simptomima paleži, odnosno sa sitnim crnim tačkama (piknidima) linijski raspoređenih duž stabla. Na ovakvim stablima u okviru simptoma paleži, često se mogu uočiti jasne granice razdvajanja, formirane najverovatnije, usled istovremenog prisustva različitih *Phomopsis* vrsta (Slika 3 b). Izolacija je rađena i sa prizemnog dela stabla, gde piknidi nisu linijski raspoređeni, već su grupisani u okviru nepravilnih ulegnutih pega, ograničenih tankom crnom marginom (Slika 3 c).



**Slika 3.** Simptomi na stablu i semenu soje. (a) tipični simptom raka stabla; (b) linijski raspoređeni piknidi duž stabla; (c) piknidi formirani u okviru ulegnutih pega; (d) trulež semena.

Gljive su izolovane i iz semena soje sa tipičnim simptomima truleži, ali i iz semena koje je bilo bez vidljivih simptoma, jer kako je ranije napomenuto, *Diaporthe/Phomopsis* vrste spadaju u grupu latentno-infektivnih patogena. Seme izloženo jakoj zarazi je smežurano, izduženo, ispucalo po površini, bele boje ili boje krede (Slika 3 d).

Izolacija gljiva iz obolelih delova soje je urađena standardnim fitopatološkim metodama i dobijene su čiste kulture (Slika 4). Formirana je kolekcija od ukupno 73 monospornih izolata (33 sa stabla i 40 iz semena) determinisanih na osnovu morfoloških karakteristika (Prilog 3) kao *D.*

*phaseolorum* var. *caulivora* (23 izolata), *D. phaseolorum* var. *sojae* (16 izolata) i *P. longicolla* (34 izolata) (Tabela 1). Pored toga, sa obolelog stabla suncokreta izolovane su tri kulture determinisane na osnovu morfoloških karakteristika kao *D. helianthi*. U istraživanje je uključeno i 87 izolata iz kolekcije M. Vidića i 11 izolata iz kolekcije A. F. Fernández-a (Tabela 1).

Pre proučavanja morfoloških, molekularnih i patogenih karakteristika, svih 174 izolata su zasejana na prirodnu podlogu od stabla soje. Veći broj izolata je fruktificirao, pa su na taj način revitalizovani. Međutim, izolati DPC4, Dpm 201, Dpm 421, Dpm 664, PS14, PS15, PS22, PS48, PS54, PS/KR4, PL10, PL42, PL44, PI 303, PI RKV i PL/KR6 nisu formirali reproduktivne organe.

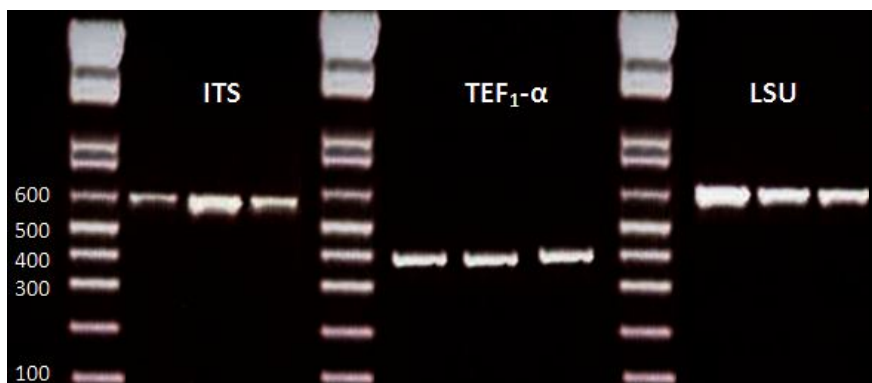




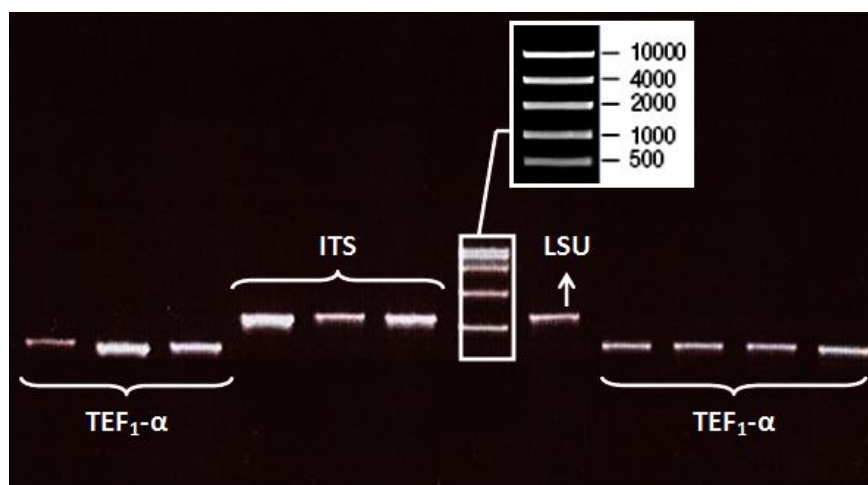
**Slika 4.** Izolacija *Diaporthe/Phomopsis* vrsta iz obolelih stabla (levo) i semena soje (desno)

## 6.2. Amplifikacija ITS regiona i dela LSU i TEF<sub>1</sub>- $\alpha$ gena

Elektroforezom na 1,5% agaroznom gelu proveren je učinak amplifikacije. PCR produkti ITS regiona i dela LSU gena veličine su oko 600 bp, dok su produkti dela TEF<sub>1</sub>- $\alpha$  gena veličine oko 400 bp kod svih 174 izolata (Slika 5, Slika 6).



**Slika 5.** Produkti amplifikacije ITS regiona i dela TEF<sub>1</sub>- $\alpha$  i LSU gena izolata DPC31, PS26 i PDS157A na 1,5% agaroznom gelu



**Slika 6.** Prečišćeni PCR produkti na 1,5% agaroznom gelu

## 6.3. Analiza sekvenci i identifikacija BLAST metodom

Kod svih izolata, lokus ITS<sub>1</sub>-5.8S-ITS<sub>2</sub> rDNK je sekvencioniran u celosti, a manjim delom mala (18S) i velika (28S) subjedinica ribozomalnih gena. Sekvence ITS regiona, dužine do 589 bp, pomoću BLAST algoritma su upoređene sa

postojećim sekvencama u okviru NCBI baze podataka. Za svaku sekvencu pronađene su identične (100%) ili skoro identične (98-99%) sekvence na osnovu kojih je sprovedena identifikacija.

Na osnovu ITS sekvenci referentnih izolata (Tabela 7), BLAST metodom su identifikovane sledeće vrste: *D. phaseolorum* var. *caulivora*, *D. phaseolorum* var. *meridionalis*, *D. phaseolorum* var. *sojae*, *P. longicolla*, *D. neotheicola*, *D. viticola*, *Phomopsis* sp. 9, *Phomopsis occulta*, *Diaporthe eres*, *Diaporthe conorum* i *D. helianthi* (Tabela 8). Vrste *D. neotheicola*, *D. viticola*, *P. occulta*, *D. eres* i *D. conorum* izdvojene su iz grupe izolata koji su prethodno na osnovu morfoloških karakteristika determinisani kao *D. phaseolorum* var. *sojae*, dok su izolati neidentifikovane grupe *Phomopsis* sp. 9 izdvojeni iz vrste *P. longicolla* (Tabela 8).

Analiziranjem ITS sekvenci proučavanih izolata, kod sva tri varijeteta vrste *D. phaseolorum*, uočena je različita dužina sekvenci (*D. phaseolorum* var. *caulivora* 575 bp, *D. phaseolorum* var. *meridionalis* 576 bp i *D. phaseolorum* var. *sojae* 577 bp), kao i veliki broj razlika u vidu delecija, insercija ili supstitucija. Sekvence *D. phaseolorum* var. *sojae* razlikuje se u 51 nukleotidu od *D. phaseolorum* var. *meridionalis*, odnosno u 41 nukleotidu od *D. phaseolorum* var. *caulivora*, dok ova razlika između sekvenci *D. phaseolorum* var. *meridionalis* i *D. phaseolorum* var. *caulivora* iznosi 20 nukleotida. Takođe, *Phomopsis* sp. 9 razlikuje se u 21 nukleotidu od vrste *P. longicolla*, dok se *D. neotheicola*, *D. viticola*, *P. occulta*, *D. eres* i *D. conorum* razlikuju od *D. phaseolorum* var. *sojae* u 42 (*D. neotheicola*), 63 (*D. viticola*), odnosno 50 (*P. occulta*, *D. eres* i *D. conorum*) nukleotida. Vrsta *P. occulta* izdvaja se od vrste *D. eres* i *D. conorum* sa razlikom od 33, odnosno 36 nukleotida, dok se *D. eres* i *D. conorum* razlikuju u samo sedam nukleotida. Takođe, razlike u vidu delecija, insercija ili supstitucija uočene su i između izolata unutar iste vrste. Usled supstitucije na 462 bp, izolati *D. phaseolorum* var. *caulivora* se jasno dele u dve podgrupe. Nešto veća varijabilnost prisutna je među sekvencama *D. phaseolorum* var. *sojae*. U okviru ovog varijeteta izdvajaju se četiri podgrupe, koje se među sobom razlikuju u samo jednom nukleotidu na 181, 209 i 472 bp, dok se unutar neidentifikovane grupe *Phomopsis* sp. 9 izolati dele u tri podgrupe usled supstitucije nukleotida na 114 i 494 bp. Sve navedene promene nukleotida akumulirane su u ITS<sub>1</sub> i ITS<sub>2</sub> regionu (Slika 7). Suprotno tome, u okviru ostalih

identifikovanih vrsta nije uočena varijabilnost, odnosno izolati unutar ovih vrsta imaju uniformne sekvence.

Na osnovu rezultata BLAST analize ITS regiona, odabrani su reprezentativni izolati kod kojih je dodatno sekvencioniran deo LSU i TEF<sub>1</sub>- $\alpha$  gena (Tabela 8). Dosadašnja identifikacija *Diaporthe/Phomopsis* vrsta najčešće se bazirala na ITS i TEF<sub>1</sub>- $\alpha$  sekvencama. Iz toga razloga, NCBI baza raspolaže velikim brojem sekvenci ova dva regiona, dok za većinu *Diaporthe/Phomopsis* vrsta ne postoje LSU sekvence.

Parcijalne sekvence velike subjediniice ribozomalnog gena (LSU) dužine su do 590 bp i znatno manje su varijabilne u odnosu na sekvence ITS regiona (Slika 8). Pomoću sekvenci referentnih izolata potvrđena je ITS identifikacija za vrste *D. phaseolorum* var. *caulivora*, *D. phaseolorum* var. *meridionalis*, *D. phaseolorum* var. *sojae*, *P. longicolla* i *D. eres* (Tabela 8). Analizom sekvenci utvrđeno je da izolati identifikovani na osnovu ITS sekvenci kao *P. occulta*, *D. eres* i *D. conorum* imaju identične LSU sekvence, odnosno ove tri ITS vrste se ne razlikuju u pogledu LSU gena. Takođe, između izolata unutar svake ITS vrste nije uočena varijabilnost, odnosno izolati svake vrste imaju uniformne LSU sekvence. Izuzetak predstavljaju izolati PL42 i PL44 koji se, usled supstitucije na 297 bp, od ostalih izolata neidentifikovane grupe *Phomopsis* sp. 9 razlikuju u samo jednom nukleotidu.

Za razliku od sekvenci LSU gena, za većinu vrsta koje su identifikovane na osnovu ITS regiona, dostupne su i sekvence TEF<sub>1</sub>- $\alpha$  gena. Parcijalna sekvenca dužine je do 395 bp, obuhvata ceo intron i deo bočnih egzona, a *Diaporthe/Phomopsis* vrste se razlikuju samo na osnovu varijabilnosti unutar introna (Slika 9). BLAST-ovanjem TEF<sub>1</sub>- $\alpha$  sekvenci potvrđena je ITS identifikacija za sve vrste, osim za ITS populacije *P. occulta* i *D. conorum* (Tabela 8). Slično LSU identifikaciji, ITS populacije *P. occulta*, *D. eres* i *D. conorum* imaju skoro identične TEF<sub>1</sub>- $\alpha$  sekvence. Ove tri populacije među sobom se razlikuju u osam nukleotida i uočeno je da neki izolati vrste *P. occulta* imaju TEF<sub>1</sub>- $\alpha$  sekvence kao izolati vrste *D. conorum* ili *D. eres*, i obrnuto. U okviru ostalih vrsta izolati imaju uniformne sekvence TEF<sub>1</sub>- $\alpha$  gena, izuzev izolata neidentifikovane grupe *Phomopsis* sp. 9. Izolati ove vrste su podeljeni u tri podgrupe usled supstitucije na 94 i 328 bp.

Tabela 7. Spisak referentnih izolata

Vrsta	Izolat <sup>1</sup>	Domaćin	Sekvence gena <sup>2</sup>			Referenca za izolat <sup>3</sup>
			ITS	LSU	TEF <sub>1</sub> -α	
<i>D. phaseolorum</i> var. <i>caulivora</i>	ATCC28464 Dpc 313	<i>Glycine max</i> <i>G. max</i>	EF594039 JQ697851	(-) JQ697877	(-) JQ697864	Kmetz <i>et al.</i> (1974) Fernández & Hanlin (1996)
<i>D. phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i>	ATCC200236 = Dmp 1F ATCC200236 = Dpm 1F	<i>G. max</i> <i>G. max</i>	EF594039 JF430486	(-) JF704178	(-) JF461480	Fernández & Hanlin (1996) Fernández & Hanlin (1996)
<i>D. phaseolorum</i> var. <i>sojajae</i>	<b>ATCC64802 = FAU458</b> 10-99	<i>Stokesia laevis</i> <i>G. max</i>	U11323 + U11373 AJ312359	AY346279 (-)	<b>TreeBASE</b> (-)	Uecker (1989) Rekab <i>et al.</i> (2004)
<i>P. longicolla</i>	ATCC60325 = FAU600 MAFF305853 Dps 7	<i>G. max</i> <i>G. max</i> <i>G. max</i>	U11357 + U11411 <b>NIAS GeneBank</b> JQ697844	(-) AB107259 JQ697870	AF398896 (-) JQ697857	Rehner & Uecker (1994) <b>Nagao &amp; Sato (2009)</b> Fernández & Hanlin (1996)
<i>D. neotheicola</i>	CBS123209	<i>Foeniculum vulgare</i>	GQ250192	(-)	GQ250322	Santos & Phillips (2009)
<i>D. viticola</i>	CBS113201	<i>Vitis vinifera</i>	AY485750	(-)	GQ250327	Van Niekerk <i>et al.</i> (2005)
<i>Phomopsis</i> sp. 9	CBS117165	<i>Aspalathus linearis</i>	DQ286285	(-)	GQ286259	Janse van Rensburg <i>et al.</i> (2006)
<i>P. occulta</i>	ER1637	<i>G. max</i>	HM439635	(-)	(-)	<b>Riccioni &amp; Vrandečić (2011)</b>
<i>D. eres</i>	CBS109767 Pho27	<i>Acer campestre</i> <i>Vitis cinerea</i>	DQ491514 JN214586	AF408350 (-)	(-) JN192180	Castlebury <i>et al.</i> (2002) <b>Baumgartner <i>et al.</i> (2011)</b>
<i>D. conorum</i>	CBS186.37	<i>Picea abies</i>	DQ116551	(-)	(-)	Borja <i>et al.</i> (2006)
<i>D. helianthi</i>	CBS592.81	<i>Helianthus annuus</i>	AY705842	(-)	GQ250308	Muntañola-Cvetković <i>et al.</i> (1981)

<sup>1</sup> Izolat FAU458 je originalno identifikovan kao *D. phaseolorum* (Uecker, 1989). Autor nije precizirao o kom se varijetetu radi, ali je naveo da izolat FAU458 predstavlja varijantu vrste *D. phaseolorum*. S obzirom da je ova vrsta prema važećoj i opšte prihvaćenoj klasifikaciji podijeljena na pet varijeteta (*D. phaseolorum* var. *caulivora*, *D. phaseolorum* var. *meridionalis*, *D. phaseolorum* var. *sojajae*, *D. phaseolorum* var. *phaseolorum* i *D. phaseolorum* var. *batatatis*), identifikacija izolata kao *D. phaseolorum* bez preciziranja varijeteta, smatra se nepotpunom.

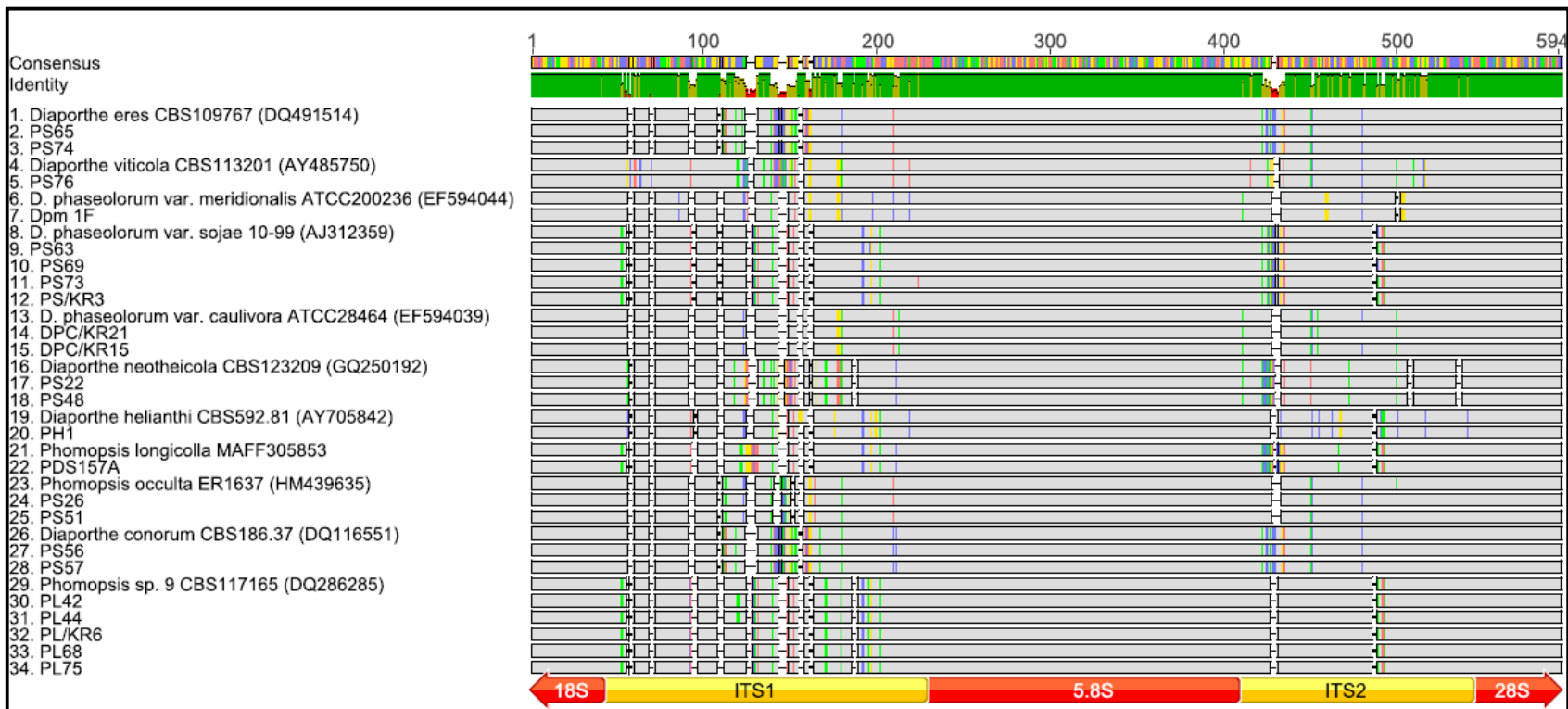
<sup>2</sup> Sekvenca TEF<sub>1</sub>-α gena za izolat FAU458 i sekvenca ITS regiona za izolat MAFF305853 nisu dostupne u NCBI bazi podataka. Prva sekvenca je preuzeta iz studije S1506 (Janse van Rensburg *et al.*, 2006) u TreeBASE bazi ([www.treebase.org](http://www.treebase.org)), dok je druga sekvenca preuzeta iz NIAS GeneBank ([www.gene.afrc.go.jp](http://www.gene.afrc.go.jp)).

<sup>3</sup> Boldovane reference još uvek nisu objavljene

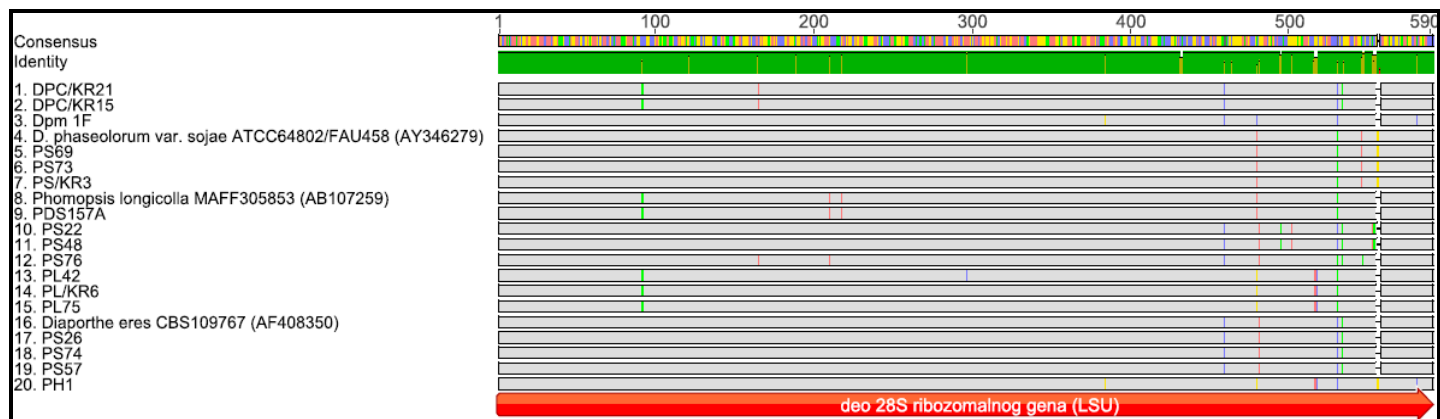
Tabela 8. Identifikacija izolata BLAST metodom

Izolati <sup>1</sup>									Identifikacija					
									ITS	LSU	TEF <sub>1</sub> -α			
DPC1	DPC11	DPC17	DPC23	DPC35	DPC/KR4	DPC/KR10	DPC/KR16	DPC159	<b><i>D. phaseolorum</i></b> <b>var. <i>caulivora</i></b>	<b><i>D. phaseolorum</i></b> <b>var. <i>caulivora</i></b>	<b><i>D. phaseolorum</i></b> <b>var. <i>caulivora</i></b>			
DPC4	DPC12	DPC18	DPC29	DPC36	DPC/KR5	DPC/KR11	DPC/KR17	DPC161b						
DPC6	DPC13	DPC19	<b>DPC31</b>	DPC60	DPC/KR6	DPC/KR12	DPC/KR18							
DPC7	DPC14	DPC20	DPC32	<b>DPC/KR1</b>	DPC/KR7	DPC/KR13	DPC/KR19							
DPC8	DPC15	DPC21	DPC33	DPC/KR2	DPC/KR8	DPC/KR14	<b>DPC/KR21</b>							
DPC9	DPC16	DPC22	DPC34	DPC/KR3	DPC/KR9	<b>DPC/KR15</b>	DPC/KR22							
<b>Dpm 201</b>			<b>Dpm 421</b>			<b>Dpm 664</b>						<b><i>D. phaseolorum</i></b> <b>var. <i>meridionalis</i></b>	<b><i>D. phaseolorum</i></b> <b>var. <i>meridionalis</i></b>	<b><i>D. phaseolorum</i></b> <b>var. <i>meridionalis</i></b>
<b>PS14</b>	<b>PS37</b>	<b>PS52</b>	<b>PS64</b>	<b>PS70</b>	<b>PS73</b>	<b>PS/KR2</b>						<b><i>D. phaseolorum</i></b> <b>var. <i>sojae</i></b>	<b><i>D. phaseolorum</i></b> <b>var. <i>sojae</i></b>	<b><i>D. phaseolorum</i></b> <b>var. <i>sojae</i></b>
<b>PS15</b>	<b>PS39</b>	<b>PS62</b>	<b>PS66</b>	<b>PS71</b>	<b>PS158</b>	<b>PS/KR3</b>								
<b>PS34</b>	<b>PS42</b>	<b>PS63</b>	<b>PS69</b>	<b>PS72</b>	<b>PS/KR1</b>									
PL1	PL13	PL36	PL47	PI RKV	PL/KR10	PL/KR18	<b>PL/KR3b</b>		<b><i>P. longicolla</i></b>	<b><i>P. longicolla</i></b>	<b><i>P. longicolla</i></b>			
PL3	PL17	PL37	PL48	PL/KR1	PL/KR11	<b>PL/KR19</b>	PL/KR4a							
PL5	PL18	PL38	PL50	PL/KR2	PL/KR12	PL/KR20	PL/KR4b							
PL6	PL19	PL39	PL51	PL/KR4	PL/KR13	PL/KR21	PL67							
PL8	PL20	PL40	PI 2	PL/KR5	PL/KR14	PL/KR1a	<b>PDS157A</b>							
PL9	PL21	PL41	PI 3	PL/KR7	PL/KR15	PL/KR1b	PDS157B							
PL10	PL27	PL45	PI 5	PL/KR8	PL/KR16	PL/KR2a	PDS157C							
PL12	PL35	PL46	PI 303	PL/KR9	PL/KR17	PL/KR3a	PDS78							
<b>PS22</b>	<b>PS48</b>											<b><i>D. neotheicola</i></b>	(-)	<b><i>D. neotheicola</i></b>
<b>PS76</b>									<b><i>D. viticola</i></b>	(-)	<b><i>D. viticola</i></b>			
<b>PL42</b>	<b>PL44</b>	<b>PL68</b>	<b>PL75</b>	<b>PL/KR6</b>					<b><i>Phomopsis</i> sp. 9</b>	(-)	<b><i>Phomopsis</i> sp. 9</b>			
<b>PS26</b>	<b>PS35</b>	<b>PS43</b>	<b>PS44</b>	<b>PS51</b>	<b>PS55</b>	<b>PS58</b>	<b>PS61</b>	<b>PS/KR4</b>	<b><i>P. occulta</i></b>	<b><i>D. eres</i></b>	<b><i>D. eres</i></b>			
<b>PS4</b>	<b>PS36</b>	<b>PS41</b>	<b>PS49</b>	<b>PS65</b>	<b>PS74</b>			<b><i>D. eres</i></b>						
<b>PS40</b>	<b>PS45</b>	<b>PS47</b>	<b>PS50</b>	<b>PS54</b>	<b>PS56</b>	<b>PS57</b>	<b>PS59</b>		<b><i>D. conorum</i></b>					
<b>PH1</b>	<b>PH2</b>	<b>PH3</b>										<b><i>D. helianti</i></b>	(-)	<b><i>D. helianti</i></b>

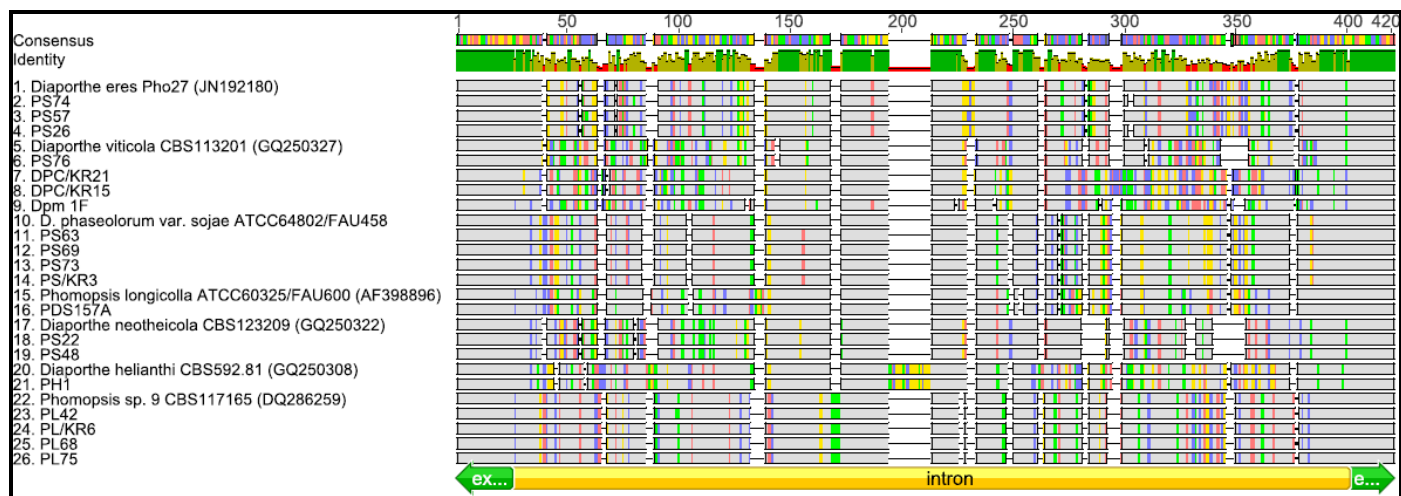
<sup>1</sup> Boldovani izolati predstavljaju reprezentativne izolate kod kojih je pored ITS regiona sekvencioniran i deo LSU i TEF<sub>1</sub>-α gena



**Slika 7.** Poravnate sekvence i izgled varijabilnosti ITS<sub>1</sub> i ITS<sub>2</sub> regiona



Slika 8. Poravnate sekvence dela LSU gena



Slika 9. Poravnate sekvence i izgled varijabilnosti introna TEF<sub>1</sub>-α gena



## 6.4. Filogenetske analize

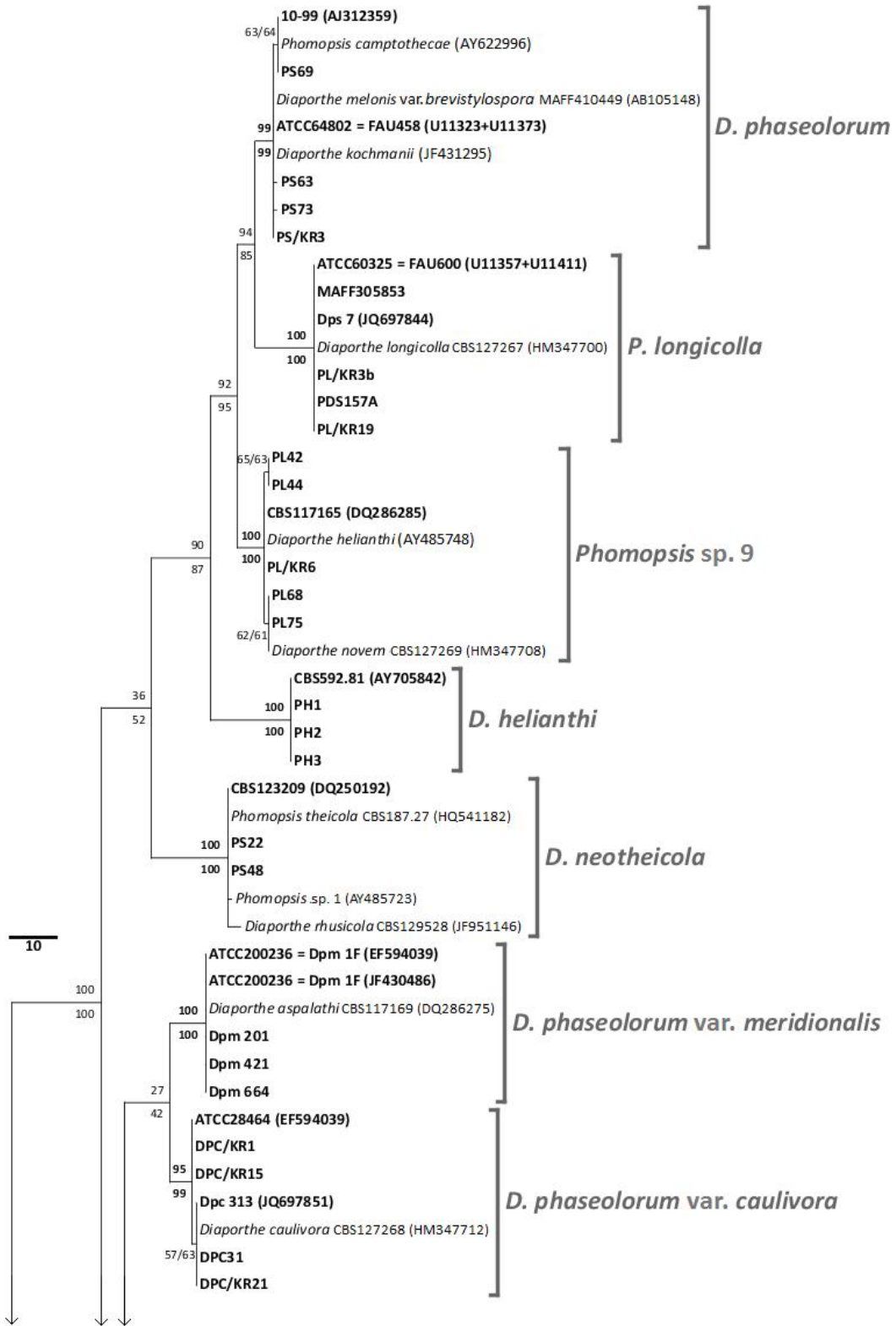
Nakon detaljnog analiziranja ITS, LSU i TEF<sub>1</sub>- $\alpha$  sekvenci odabrane su reprezentativne sekvence izolata na osnovu kojih su urađene filogenetske analize. Filogenetska analiza sva tri regiona sprovedena je pomoću metoda Neighbor Joining (NJ) i Maximum Parsimony (MP) sa butstrap analizom od 1000 ponavljanja. U filogramima, butstrap vrednosti su prikazane na granama, tako da se iznad nalaze vrednosti za MP, a ispod za NJ.

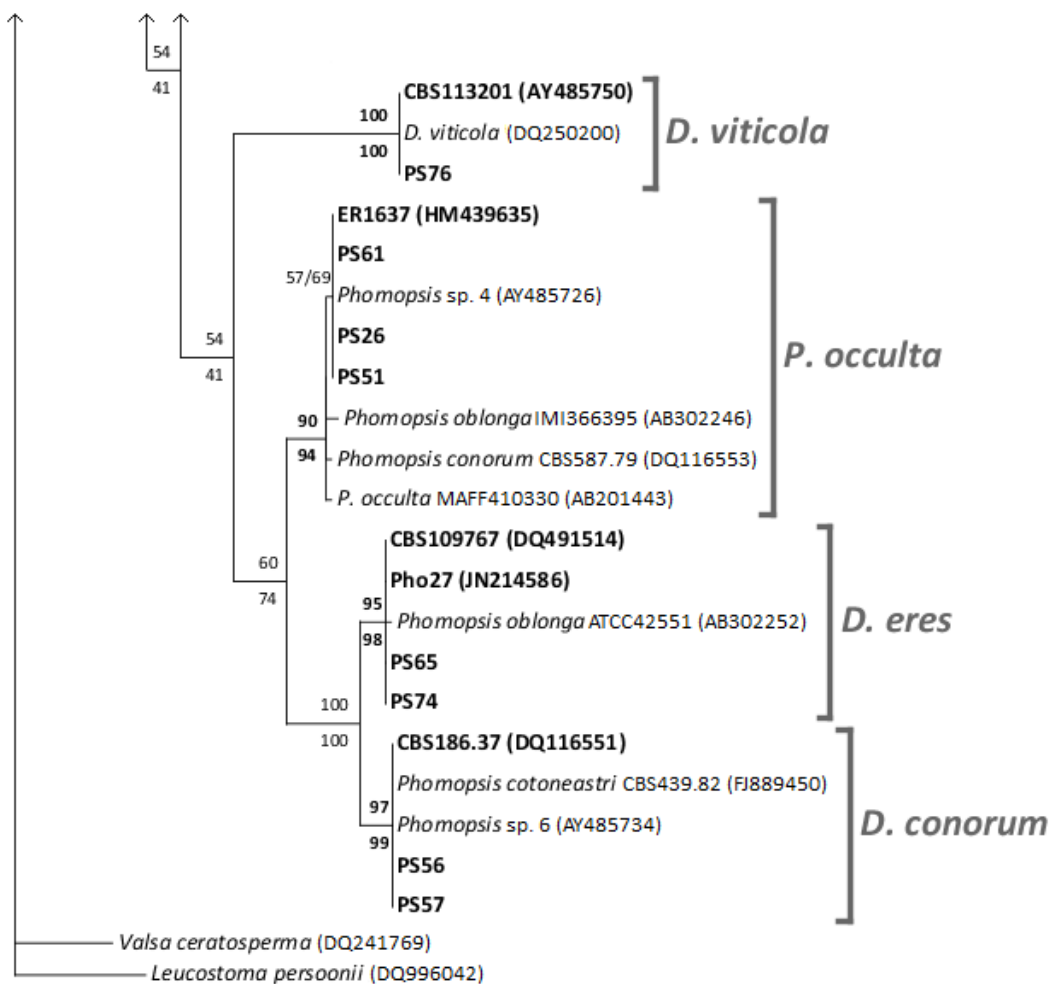
### 6.4.1. ITS filogenija

U filogenetsku analizu ITS regiona uključeno je 68 sekvenci i dve sekvence spoljašnje grupe: *Valsa ceratosperma* (DQ241769) i *Leucostoma personii* (DQ996042). Poravnate sekvence dužine 624 bp sadrže 480 konstantnih i 20 varijabilnih karaktera, neinformativnih za potrebe parsimonije. Kod referentnih izolata ATCC64802 (FAU458) i ATCC60325 (FAU600) nedostaje sekvenca 5.8S ribozomalnog gena. Ovaj gen je visoko konzervativan tako da je sekvenca 5.8S gena identična kod svih *Diaporthe/Phomopsis* vrsta. Iz tog razloga, praznine uvedene tokom poravnanja tretirane su kao nukleotidi koji nedostaju. Preostala 124 karaktera su informativna i na osnovu njih je rekonstruisan MP filogram. Ukupno je formirano 232 jednako parsimoničnih filograma dužine (TL) 289 koraka i statističkim parametrima: CI = 0,6990; RI = 0,9449; RCI = 0,6604 i HI = 0,3010, koji ukazuju na prisustvo homoplazije. Jedan od MP filograma, sa identičnom topologijom kao kod NJ filograma, prikazan je na slici 10.

U filogramu je ukupno formirano 11 klada sa butstrap potporom većom od 90% (MP i NJ), što odgovara broju filogenetskih vrsta koje su identifikovane BLAST metodom. Prvu kladu čine izolati vrste *D. phaseolorum* var. *sojae* sa butstrapom od 99% (MP i NJ). Zajedno sa ovom vrstom grupisane su i sekvence izolata koji su identifikovani kao *D. melonis* var. *brevistylispora* MAFF410449, *P. camptothecae* i *D. kochmanii*. Drugu i treću kladu (100% MP i NJ) čine izolati vrste *P. longicolla* (= *D. longicolla*) i *Phomopsis* sp. 9 (= *D. novem*). Sa izolatima neidentifikovane grupe *Phomopsis* sp. 9 grupisana je i sekvenca izolata koji je determinisan kao *D.*

*helianthi*. Međutim, izolati PH1, PH2 i PH3, identifikovani na osnovu referentnog izolata CBS592.81 kao "pravi" *D. helianthi*, formiraju posebnu kladu sa butstrap potporom od 100% (MP i NJ). Petu kladu (100% MP i NJ) čine izolati vrste *D. neotheicola* (anamorf *P. theicola*), koja je prethodno opisana na vinovoj lozi kao *Phomopsis* sp. 1. Zajedno sa ovom vrstom grupisana je i sekvenca izolata CBS129528 koji je identifikovan kao *D. rhusicola*. Šestu (100% MP i NJ) i sedmu (95% MP i 99% NJ) kladu čine izolati *D. phaseolorum* var. *meridionalis* (= *D. aspalathi*) i *D. phaseolorum* var. *caulivora* (= *D. caulivora*). Prema topološkom rasporedu ova dva varijeteta su filogenetski jako bliska, jer su u filogramu predstavljena kao sestrinske klade. Posmatrajući sva tri varijeteta vrste *D. phaseolorum*, uočava se da *D. phaseolorum* var. *sojae* predstavlja posebnu vrstu, jer je filogenetski udaljen od druga dva varijeteta. Osmu kladu u ITS filogramu identifikovana je kao vrsta *D. viticola* sa butstrap potporom od 100% (MP i NJ). Devetu kladu (90% MP i 94% NJ) čine izolati vrste *P. occulta*, a zajedno sa izolatima ove klade grupisane su i sekvence izolata koji su determinisani kao *Phomopsis* sp. 4, *Phomopsis oblonga* IMI366395 i *P. conorum* CBS587.79. Desetu (95% MP i 98% NJ) kladu čine izolati vrste *D. eres* (anamorf *P. oblonga*), dok jedanaesta (97% MP i 99%) klada predstavlja vrstu *D. conorum* (anamorf *P. conorum*). Ove dve klade su filogenetski jako bliske i u ITS filogramu su predstavljene kao sestrinske klade sa butstrap potporom od 100% (MP i NJ). Zajedno sa izolatima vrste *D. conorum* grupisane su i sekvence izolata koji su identifikovani kao *Phomopsis* sp. 6 i *P. cotoneastri* CBS439.82.





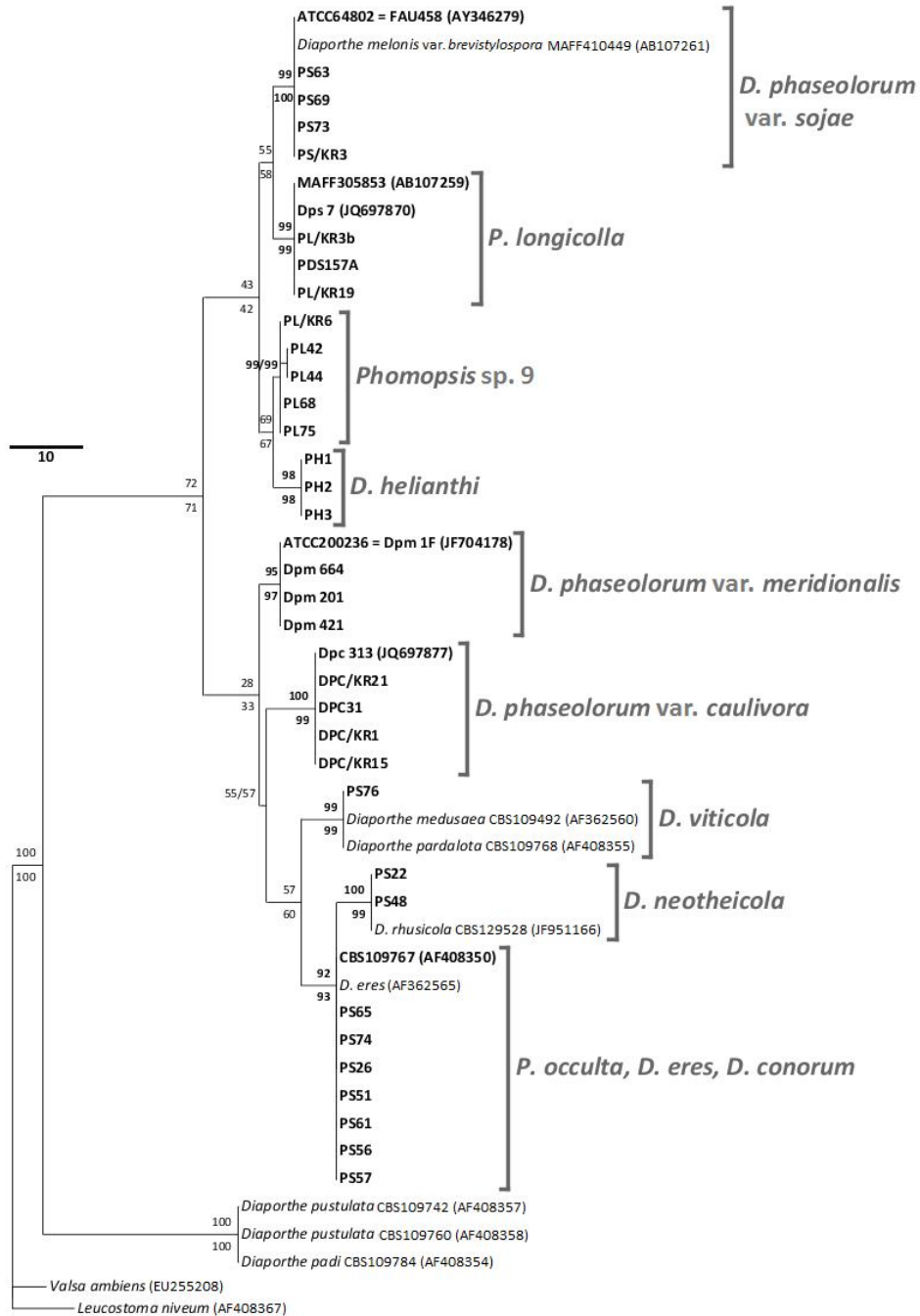
**Slika 10.** Jedan od 232 jednako parsimoničnih filograma rekonstruisan na osnovu 624 karaktera ITS regiona. Statistički parametri filograma: TL = 289; CI = 0,6990; RI = 0,9449; RCI = 0,6604; HI = 0,3010. Novogenerisane i referentne sekvence izolata su boldovane. Butstrap vrednosti su prikazane na granama, tako da se iznad nalaze vrednosti za Maximum Parsimony, a ispod za Neighbor Joining. *Valsa ceratosperma* (DQ241769) i *Leucostoma persoonii* (DQ996042) predstavljaju spoljašnju grupu.

#### 6.4.2. LSU filogenija

Filogenetska analiza dela LSU regiona sprovedena je na osnovu 48 sekvenci, uključujući dve sekvence spoljašnje grupe: *Valsa ambiens* (EU255208) i *Leucostoma niveum* (AF408367). Poravnate sekvence dužine 592 bp sadrže 535 konstantnih i devet varijabilnih karaktera, tako da je preostalih 48 informativnih karaktera poslužilo za rekonstrukciju MP filograma. Ukupno je formirano 24 jednako parsimoničnih filograma s dužinom (TL) od 86 koraka i statističkim parametrima: CI = 0,7093; RI = 0,9155; RCI = 0,6494 i HI = 0,2907, koji ukazuju na prisustvo homoplazije. Međutim, u MP filogramu klade identifikovane kao *Phomopsis* sp. 9, *D. phaseolorum* var. *meridionalis*, *D. phaseolorum* var. *caulivora* i *D. eres* nisu stabilne, jer su butstrap vrednosti ovih klada manje od 80%. To je najverovatnije posledica izuzetno male varijabilnosti LSU sekvenci, jer od ukupno 592 karaktera, 535 su konstantni karakteri, dok je svega 48 izdvojeno u grupu informativnih karaktera. Zato je sprovedena filogenetska analiza metodom minimalne evolucije (ME). Uočeno je da MP i ME filogrami imaju identičnu topologiju, ali za razliku od MP filograma, butstrap vrednosti u ME filogramu su veće od 92% i samim tim jasno definišu stabilnost formiranih klada. Jedan od MP filograma, sa identičnom topologijom kao kod ME i NJ filograma, prikazan je na slici 11. Iznad grana umesto MP butstrap vrednosti prikazane su ME vrednosti.

Na osnovu sekvenci dela LSU regiona dobijeno je filogenetsko stablo sa nešto drugačijom topologijom u odnosu na ITS filogram. U LSU filogramu formirane klade se podudaraju sa kladama ITS filograma, izuzev klada identifikovanih kao *P. occulta*, *D. eres* i *D. conorum*. Ove tri ITS klade su u LSU filogramu grupisane zajedno (92% ME [25% MP] i 93% NJ), što sugeriše da je u pitanju jedna filogenetska vrsta. Takođe, ova klada nije jasno izdvojena, jer je dužina grane jednaka nuli (0). Usled toga, formirana je politomija sa kladom koja predstavlja vrstu *D. neotheicola* (100% ME [100% MP] i 99% NJ). Za ovu vrstu ne postoje LSU sekvence u NCBI bazi podataka. Međutim, kao i u ITS filogramu, sa izolatima vrste *D. neotheicola* grupisana je sekvenca izolata CBS129528 koji je identifikovan kao *D. rhusicola*.

U LSU filogramu, prva klada sadrži izolate vrste *D. phaseolorum* var. *sojae* (99% ME [88% MP] i 100% NJ). Kao i u ITS filogramu, sa ovom vrstom grupisana je i sekvenca izolata MAFF410449 koji je identifikovan kao *D. melonis* var. *brevistyluspora*. Drugu kladu (99% ME [93% MP] i 99% NJ) čine izolati vrste *P. longicolla*, dok treća (99% ME [58% MP] i 99% NJ) i četvrta (98% ME [87% MP] i 98% NJ) klada sadrže izolate identifikovane kao *Phomopsis* sp. 9, odnosno *D. helianthi*. Petu i šestu kladu čine izolati *D. phaseolorum* var. *meridionalis* (95% ME [26% MP] i 97% NJ) i *D. phaseolorum* var. *caulivora* (100% ME [75% MP] i 99% NJ). Sličnost ITS i LSU filograma ogleda se u istom topološkom rasporedu sva tri varijeteta vrste *D. phaseolorum*. Na osnovu ovog rasporeda uočeno je da *D. phaseolorum* var. *sojae* predstavlja posebnu vrstu, jer je filogenetski udaljen od druga dva varijeteta, koja su međusobno filogenetski bliska. Sedmu kladu (99% ME [97% MP] i 99% NJ) čini izolat PS76 koji je na osnovu ITS sekvence identifikovan kao *D. viticola*. U NCBI bazi podataka ne postoje LSU sekvence ove vrste, ali su BLAST-ovanjem pronađene identične sekvence izolata CBS109768 i CBS109492 koji su identifikovani kao *Diaporthe pardalota*, odnosno *D. medusaea*. Međutim, u NCBI bazi ne postoje ITS ili TEF<sub>1</sub>- $\alpha$  sekvence ovih izolata, tako da nije bilo moguće uraditi filogenetsko poređenje ovih vrsta u drugim regionima DNK.



**Slika 11.** Jedan od 24 jednako parsimoničnih filograma rekonstruisan na osnovu 592 karaktera LSU gena. Statistički parametri filograma: TL = 86; CI = 0,7093; RI = 0,9155; RCI = 0,6494; HI = 0,2907. Novogenerisane i referentne sekvence izolata su boldovane. Butstrap vrednosti su prikazane na granama, tako da se iznad nalaze vrednosti za Maximum Parsimony, a ispod za Neighbor Joining. *Valsa ambiens* (EU255208) i *Leucostoma niveum* (AF408367) predstavljaju spoljašnju grupu.

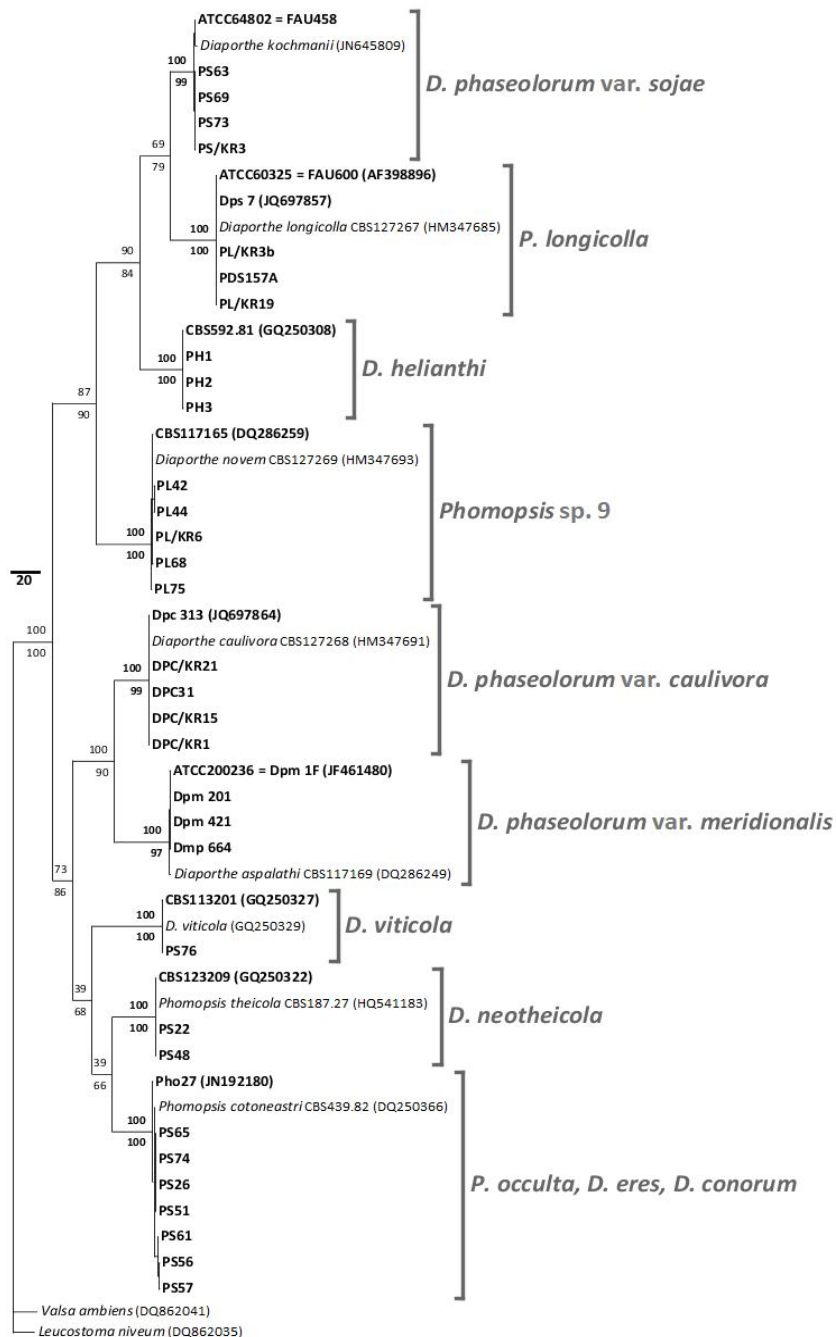
### 6.4.3. TEF<sub>1</sub>- $\alpha$ filogenija

U filogenetsku analizu dela TEF<sub>1</sub>- $\alpha$  gena uključeno je 50 sekvenci i dve sekvence spoljašnje grupe: *Valsa ambiens* (DQ862041) i *Leucostoma niveum* (DQ862035). Poravnate sekvence dužine 432 bp sadrže 87 konstantnih i 17 varijabilnih karaktera, tako da je MP filogram rekonstruisan na osnovu preostalih 328 informativnih karaktera. Formiran je samo jedan filogram, koji ima identičnu topologiju kao NJ filogram (Slika 12). Filogram je dužine (TL) 761 korak sa statističkim parametrima: CI = 0,7267; RI = 0,9416; RCI = 0,6842 i HI = 0,2733, koji ukazuju na prisustvo homoplazije.

Na osnovu sekvenci dela TEF<sub>1</sub>- $\alpha$  gena rekonstruisano je filogenetsko stablo sa sličnim topološkim rasporedom klada kao u ITS i LSU filogramu. Sve identifikovane ITS vrste jasno su izdvojene u posebne klade sa butstrap potporom od 100% za MP, odnosno sa butstrapom većim od 97% za NJ. Sličnost između LSU i TEF<sub>1</sub>- $\alpha$  filograma ogleda se u tome što su ITS klade *P. occulta*, *D. eres* i *D. conorum* grupisane zajedno. Međutim, za razliku od LSU filograma, ova grupa je jasno izdvojena u posebnu kladu, jer dužina grane nije jednaka nuli (0).

Zajedničko za ITS, LSU i TEF<sub>1</sub>- $\alpha$  filogram je topološki raspored varijeteta vrste *D. phaseolorum*. Ovaj raspored ukazuje da *D. phaseolorum* var. *sojajae* (100% MP i 99% NJ) predstavlja posebnu vrstu, jer je filogenetski udaljen od druga dva varijeteta. U ITS i LSU filogramu *D. phaseolorum* var. *caulivora* i *D. phaseolorum* var. *meridionalis* su filogenetski bliski, dok su u TEF<sub>1</sub>- $\alpha$  filogramu ova dva varijeteta jasno predstavljena kao sestrinske klade sa butstrap potporom od 100% za MP, odnosno 90% za NJ.



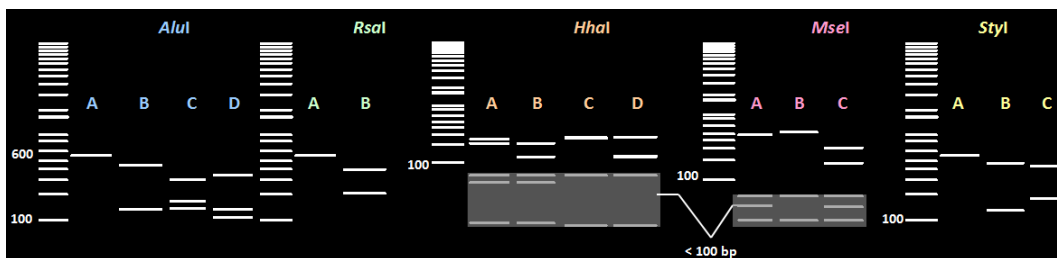


**Slika 12.** Filogenetsko stablo rekonstruirano na osnovu 432 karaktera TEF<sub>1</sub>-α gena. Statistički parametri filograma: TL = 761; CI = 0,7267; RI = 0,9416; RCI = 0,6842; HI = 0,2733. Novogenerisane i referentne sekvence su boldovane. Butstrap vrednosti su prikazane na granama, tako da se iznad nalaze vrednosti za Maximum Parsimony, a ispod za Neighbor Joining. *Valsa ambiens* (DQ862041) i *Leucostoma niveum* (DQ862035) predstavljaju spoljašnju grupu.

## 6.5. Identifikacija PCR-RFLP metodom

Sekvence ITS regiona simulativno su digestovane restrikcijom enzimima *AluI*, *RsaI*, *HhaI* i *MseI* koristeći virtual RFLP (Slika 13). Ovi restrikcioni enzimi seku DNK na specifičnim mestima i daju fragmente različite veličine, odnosno daju različite profile (A, B, C, D). Uočeno je da restrikcioni enzimi *AluI* i *HhaI* dobro razdvajaju vrste roda *Diaporthe/Phomopsis*, jer daju četiri različita profila (A, B, C, D). Međutim, odabrani set restrikcijom enzima daje isti molekularni profil (DABA) za izolate identifikovane kao *D. eres* i *D. conorum* (Slika 14). Iz tog razloga, u simulativnu digestiju uključen je i restrikcioni enzim *StyI* (Slika 13). Kombinacijom profila pet restrikcijom enzima (*AluI*, *RsaI*, *HhaI*, *MseI* i *StyI*) dobijeni su specifični molekularni determinatori za svaku ispitivanu vrstu (Slika 14).

S obzirom da izolati *D. phaseolorum* var. *meridionalis*, *D. neotheicola*, *P. occulta*, *D. eres*, *D. conorum* i *P. longicolla* imaju uniformne ITS sekvence, za utvrđivanje elektroforetskih profila odabran je samo jedan izolat od svake vrste, dok je za *D. viticola* dostupan samo jedan izolat (Slika 14). Međutim, ITS sekvence izolata unutar *D. phaseolorum* var. *caulivora*, *D. phaseolorum* var. *sojajae* i *Phomopsis* sp. 9 poseduju varijabilnost u vidu delecija, insercija ili supstitucija. Zbog toga, za utvrđivanje elektroforetskih profila za svaku navedenu vrstu odabrane su sekvence izolata, koje se među sobom razlikuju (Slika 14).



**Slika 13.** Elektroforetski profili (A, B, C, D) restrikcijom enzima *AluI*, *RsaI*, *HhaI*, *MseI* i *StyI* dobijeni simulativnom digestijom ITS sekvenci identifikovanih *Diaporthe/Phomopsis* vrsta

Na osnovu dobijenih profila, uočeno je da se okviru *D. phaseolorum* var. *caulivora* pomoću restrikcijom enzima *HhaI* razlikuju dva molekularna profila

CABAB i CAAAB, dok izolati *D. phaseolorum* var. *sojae* i *Phomopsis* sp. 9 imaju samo jednu kombinaciju elektroforetskih profila (Slika 14).

Vrsta	Izolat	Alu I	Rsa I	Hha I	Mse I	Sty I
<i>D. phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i>	Dmp 1F	A	A	B	A	A
<i>D. phaseolorum</i> var. <i>caulivora</i>	DPC/KR15	C	A	B	A	B
	DPC/KR21	C	A	A	A	B
<i>D. phaseolorum</i> var. <i>sojae</i>	PS63, PS69, PS73, PS/KR3	B	A	C	B	A
<i>D. neotheicola</i>	PS22	B	B	A	C	A
<i>D. viticola</i>	PS76	B	A	D	C	A
<i>P. occulta</i>	PS26	B	A	B	A	B
<i>D. eres</i>	PS65	D	A	B	A	C
<i>D. conorum</i>	PS57	D	A	B	A	A
<i>P. longicolla</i>	PDS157A	B	B	A	B	A
<i>Phomopsis</i> sp. 9	PL68, PL/KR6, PL44	B	A	A	B	A

**Slika 14.** Kombinacija elektroforetskih profila (A, B, C, D) pet restrikcioni enzima (*AluI*, *RsaI*, *HhaI*, *MseI* i *StyI*) dobijeni simulativnom digestijom ITS sekvenci identifikovanih *Diaporthe/Phomopsis* vrsta

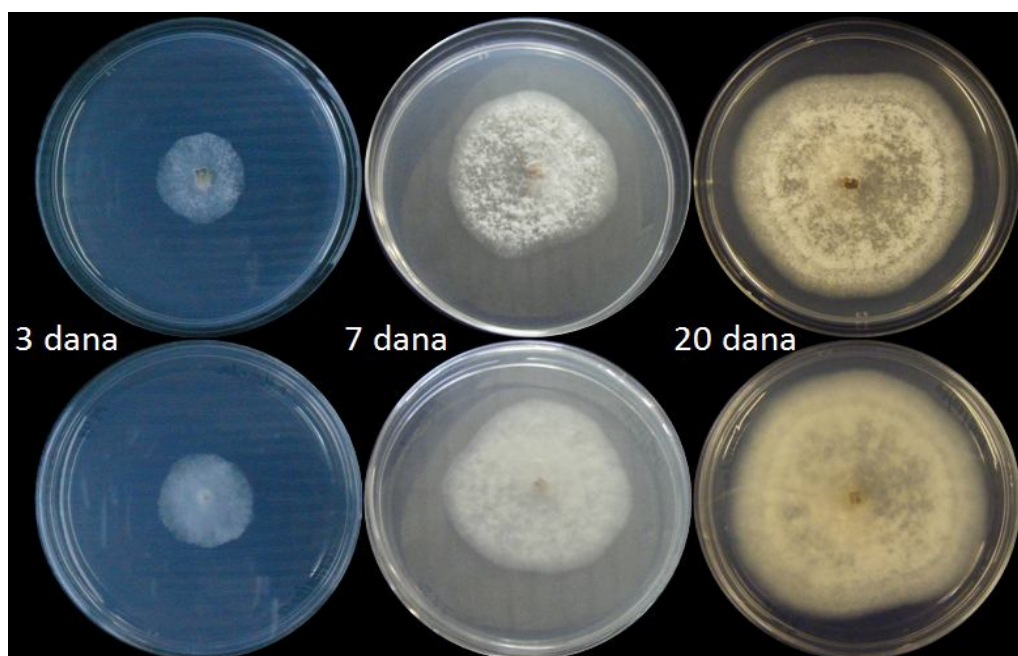
## 6.6. Morfološki profil *Diaporthe/Phomopsis* vrsta

Kod reprezentativnih izolata odabranih na osnovu ITS sekvenci detaljno su proučene morfološke karakteristike. Cilj je utvrđivanje jasnih morfoloških razlika između svake identifikovane ITS vrste. U tabeli 9 na kraju ovog poglavlja date su opšte odgajivačke i morfološke karakteristike ispitivanih *Diaporthe/Phomopsis* vrsta izolovanih iz soje.

Utvrđeno je da se svi proučavani izolati dobro razvijaju na PDA podlozi, PDA sa sterilizovanim stablima soje, OAT i Čapek podlozi, dok se podloge od semena soje i sojinog mleka nisu pokazale kao pogodne za razvoj *Diaporthe/Phomopsis* vrsta. Međutim, najbolji i najbrži porast, kao i sporulacija, konstatovani su na prirodnoj podlozi od stabla soje.

Kod izolata PS22 i PS48, identifikovanih kao *D. neotheicola*, nije bilo moguće uraditi morfološki profil, jer su izolati usled dugog čuvanja na kosom agaru izgubili

mogućnost formiranja reproduktivnih organa. Kod ovih izolata praćen je razvoj kolonije na PDA podlozi i uočeno je da gljiva ispunjava površinu Petri kutije tek nakon 20 dana (Slika 15). Vazдушna micelija je bele boje, gusta i bujna. Supstratna micelija starenjem boji podlogu u žuto-mrku boju. Prema morfološkim podacima, koji su evidentirani u momentu izolacije, PS22 i PS48 formiraju okruglaste strome prečnika do 2 mm i pojedinačne piknide bez vidljivog vrata, prečnika do 400  $\mu\text{m}$ . Na vrhovima piknida uočavaju se žućkaste kapi, koje sadrže  $\alpha$  i  $\beta$  konidije. Alfa konidije su jednoćelijske, elipsoidne, sa po dve kapi ulja koje su slabo vidljive, veličine 6,8-9,5  $\times$  2,2-2,9  $\mu\text{m}$ . Beta konidije su jednoćelijske, končaste i slabo povijene na jednom kraju, veličine 21,3-28,8  $\times$  0,8-1,0  $\mu\text{m}$ . Prisustvo peritecija nije konstatovano.

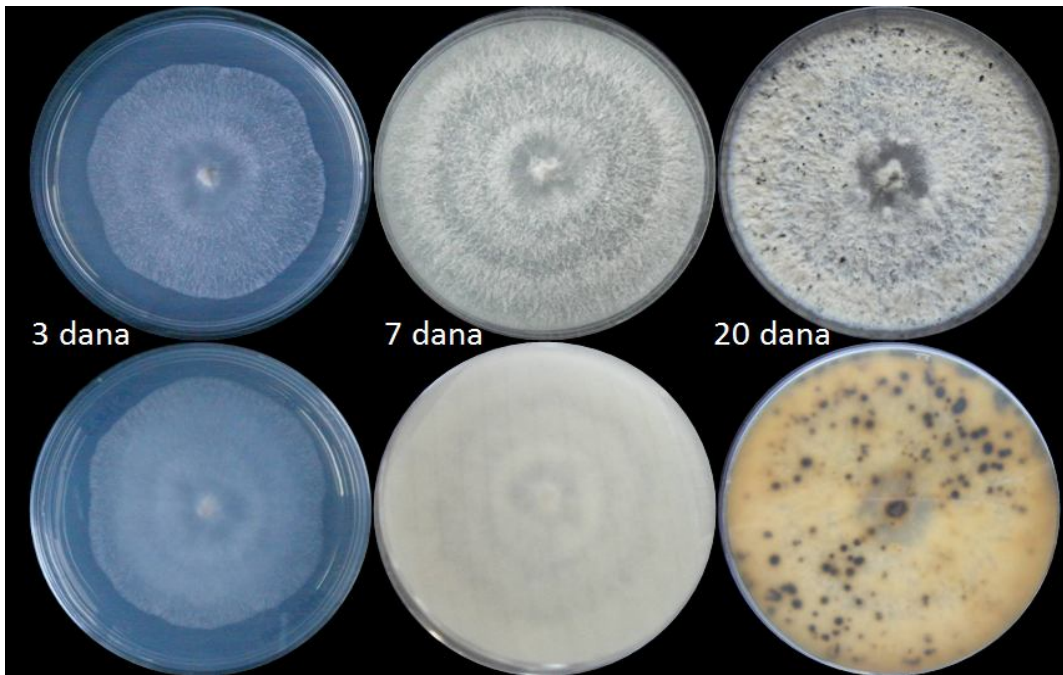


**Slika 15.** *D. neotheicola*: izgled kolonije na PDA podlozi sa lica i naličja nakon 3, 7 i 20 dana (izolat PS22)

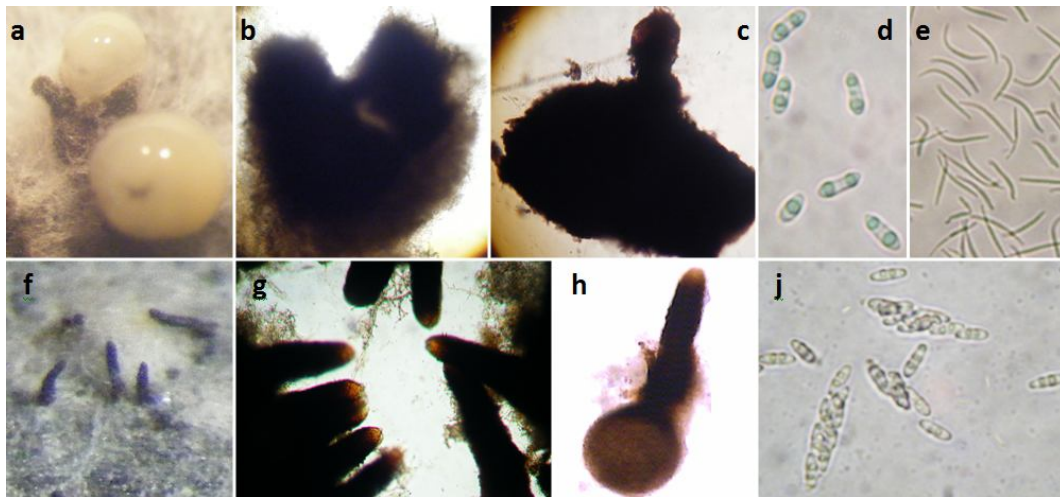
***Diaporthe phaseolorum* var. *sojae***. Petri kutije sa PDA, OAT i Čapek podlogama, proučavani izolati ispunjavaju nakon šest dana (Slika 16). Vazдушna micelija je bela, rastresita, srednje bujna i razvija se kružno, a starenjem menja boju od sivo-smeđe do braon boje, dok supstratna micelija ponekad može da boji podlogu u svetlo-rozu boju.

Nakon osam dana kulture formiraju nepravilne strome veličine od 2 do 5 mm. Međutim, izolati PS62 i PS63 obrazuju izrazito velike stromatične tvorevine nepravilnog oblika. U okviru stroma formiraju se unilokularne i multilokularne piknidijske konidiomate. Na prirodnoj podlozi od stabla soje izolati obrazuje piknide već nakon sedam dana. Piknidi, prečnika do 550  $\mu\text{m}$ , formiraju se pojedinačno ili u grupama, sa kraćim vratom ili bez njega. Međutim, izolati PS69 i PS73 imaju piknide sa izrazito dugim vratovima nalik na peritecije (Slika 17 c), dužine do 470  $\mu\text{m}$ , dok su piknidi izolata PS/KR3 i PS63 bez vrata (Slika 17 b). Ubrzo nakon formiranja piknidijskih konidiomata na ostiolama se uočavaju belo-žute kapi sa  $\alpha$  i  $\beta$  piknosporama (Slika 17 a). Sporulacija je veoma obilna, pri čemu odnos  $\alpha$  i  $\beta$  konidija značajno varira među izolatima. Sukcesivnim mikroskopiranjem uočeno je da se odnos  $\alpha$  i  $\beta$  konidija stalno menja, odnosno ponekad dominiraju  $\alpha$ , a ponekad  $\beta$  konidije. Alfa konidije su jednoćelijske, izdužene, veličine 6,9-9,6  $\times$  2,8-3,5  $\mu\text{m}$  sa dve uljane kapi (Slika 17 d). Beta konidije su jednoćelijske, končaste, povijene na jednom kraju, pa podsećaju na zapetu, veličine 13,6-19,4  $\times$  1,0-1,8  $\mu\text{m}$  (Slika 17 e).

Svi proučavani izolati, identifikovani u ovom radu kao *D. phaseolorum* var. *sojae* na podlozi od stabla, nakon tri nedelje, formiraju pojedinačne peritecije sa dugim vratovima (Slika 17 f), što ukazuje da je micelija homotalusna. Peritecije se obično obrazuju na mestima piknida. Loptasto telo peritecije, prečnika 320  $\times$  400  $\mu\text{m}$ , uronjeno je u epidermis, a dužina vrata iznosi u proseku oko 600  $\mu\text{m}$  (Slika 17 g-h). Iz peritecija se oslobađaju askusi sa po osam dvoćelijskih askospora, koje su blago sužene na sredini i imaju po dve uljane kapi u svakoj ćeliji. Dimenzije askusa su 28,7-40,5  $\times$  6,1-7,0  $\mu\text{m}$ , a askospora 9,7-10,6  $\times$  2,5-3,4  $\mu\text{m}$  (Slika 17 j).



**Slika 16.** *D. phaseolorum* var. *sojae*: izgled kolonije na PDA podlozi sa lica i naličja nakon 3, 7 i 20 dana (PS73)



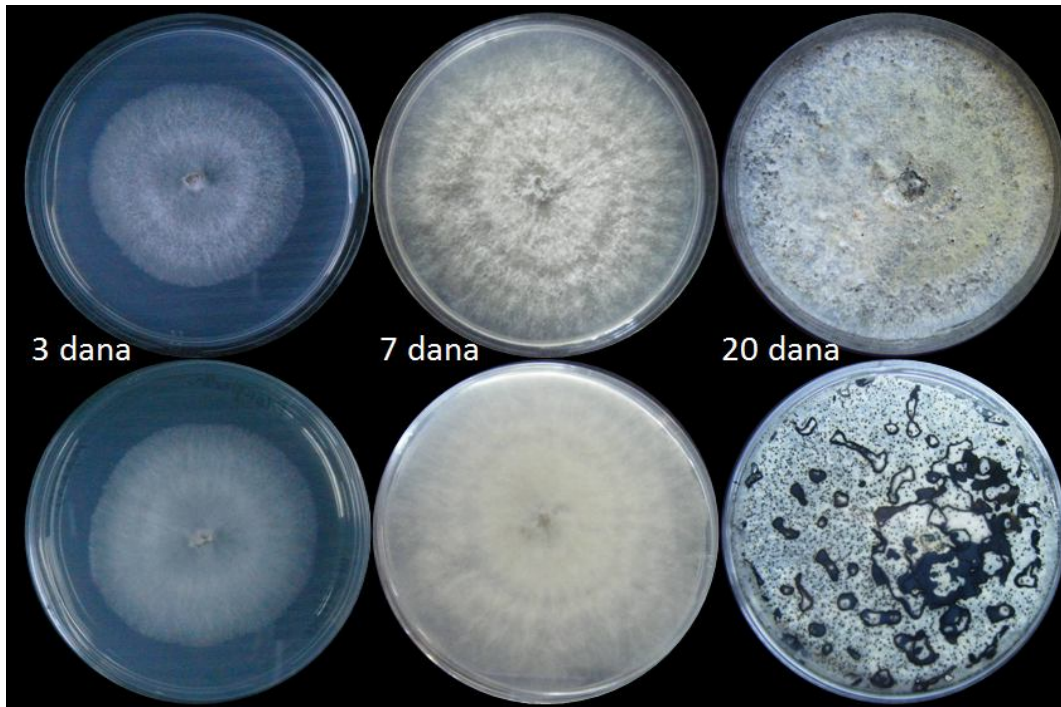
**Slika 17.** *D. phaseolorum* var. *sojae*. (a-c) piknidi; (d)  $\alpha$  konidije; (e)  $\beta$  konidije; (f-h) peritecije; (j) askusi sa askosporama

***Phomopsis longicolla***. Na svim podlogama, nakon šest do sedam dana, ispitivani izolati ispunjavaju površinu Petri kutije (Slika 18). Vazдушna micelija je bela, gusta i bujna, a oko centra se formira žuti-zeleni prsten. Starenjem micelije, po površini cele Petri kutije mogu se uočiti žuto-zelena područja. Izolati formiraju izrazito velike stromatične tvorevine nepravilnog oblika, koje mogu potpuno da prekriju dno Petri kutije.

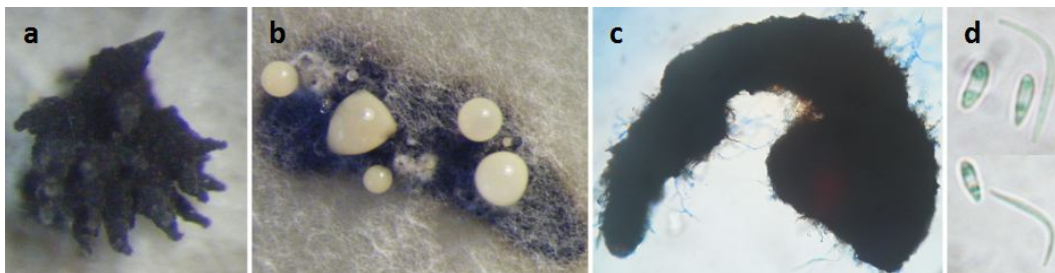
U okviru stroma formiraju se multilokularne i unilokularne piknidijske konidiomate dugih vratova, koje mogu biti pojedinačne (ređe) ili u grupama (Slika 19 a, b). Izolati PL/KR3 i PL/KR8 formirali su puno pojedinačnih piknida u podlozi. Prečnik tela piknida kreće se i do 550  $\mu\text{m}$ , a dužina vrata i do 600  $\mu\text{m}$  (Slika 19 c). Sporulacija je obilna i počinje već nakon nedelju dana, kada se može uočiti puno sluzastih kapljica na vrhovima vratova (Slika 19 b). U kapljicama su  $\alpha$  konidije elipsoidnog oblika sa dve kapi ulja, veličine 5,8-7,3  $\times$  2,5-2,9  $\mu\text{m}$  (Slika 19 d).

Na prizemnom delu stabla zrelih biljaka soje često su uočavane velike nepravilne stromatične tvorevine u okviru kojih su se formirali piknidi sa  $\beta$  konidijama. Masovno prisustvo  $\beta$  konidija ukazivalo je da se radi o anamorfnom stadijumu gljive *D. phaseolorum* var. *sojae*. Na PDA podlozi iz pojedinačnih piknida razvile su se kolonije sa belom, zbijenom vazдушnom micelijom i masivnim, crnim stromama. U okviru stroma formirale su se piknidijske konidiomate sa izraženim dugim vratovima u kojima je konstatovano prisustvo samo  $\alpha$  konidija. Sve navedene morfološke karakteristike ukazivale su na vrstu *P. longicolla*. Izolati PDS157A, PDS157B, PDS157C i PDS78 na sintetičkim i polusintetičkim podlogama nisu formirali piknide sa  $\beta$  konidijama. Međutim, svi navedeni izolati su na sterilizovanim stablima soje, koji su kraći period bili izlagani niskim temperaturama, formirali piknide iz kojih su se oslobađale  $\beta$  konidije, dok je izolat PDS157A nakon dva meseca oslobađao  $\beta$  konidije i na PDA podlozi. Molekularna identifikacija je potvrdila da sva četiri izolata pripadaju vrsti *P. longicolla*. Beta konidije su jednoćelijske, končaste, povijene na jednom kraju, veličine 23,3-31,1  $\times$  0,8-1,0  $\mu\text{m}$  (Slika 19 d). Izolati nisu formirali teleomorfni stadijum.





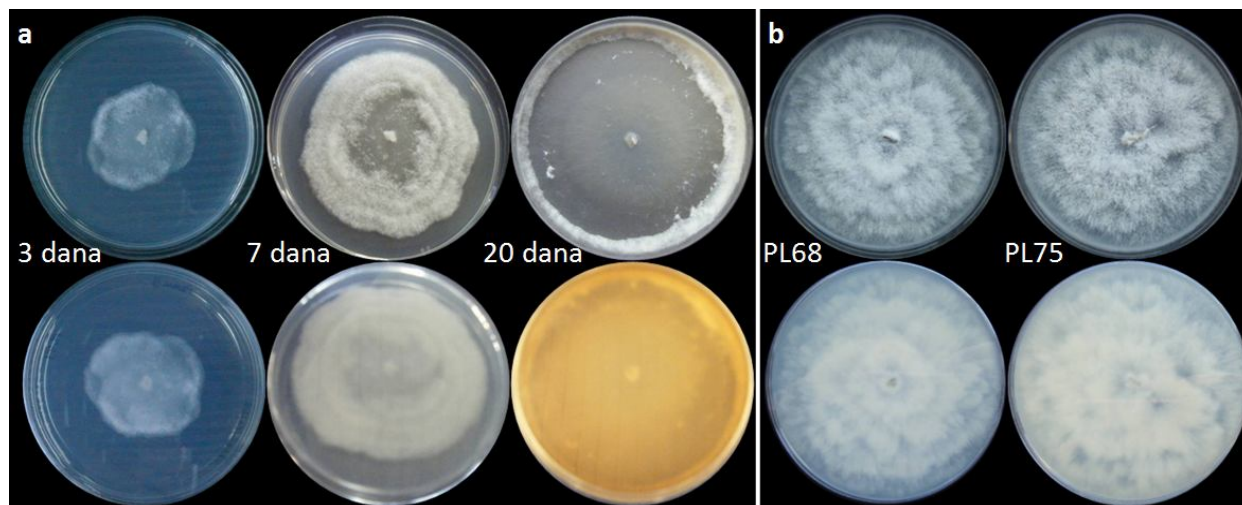
**Slika 18.** *P. longicolla*: izgled kolonije na PDA podlozi sa lica i naličja nakon 3, 7 i 20 dana (izolat PDS157A)



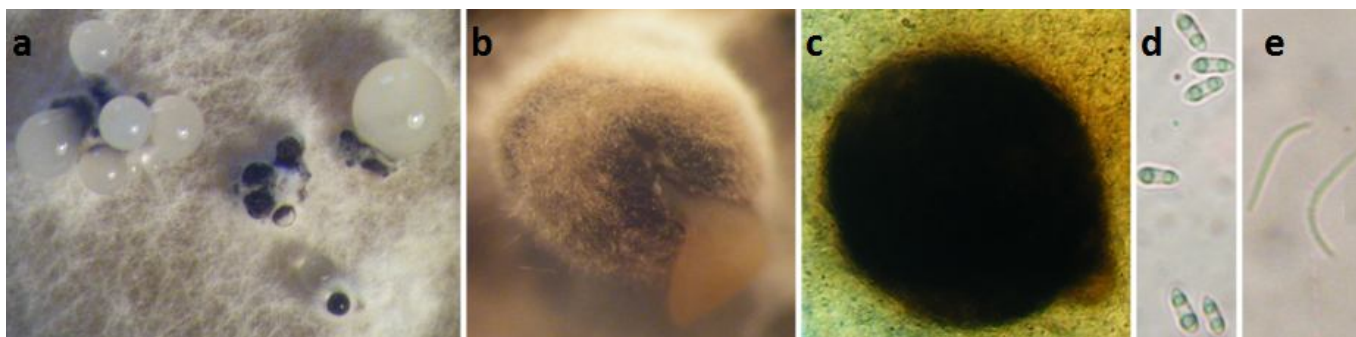
**Slika 19.** *P. longicolla*. (a-c) piknidi; (d)  $\alpha$  i  $\beta$  konidije



**Neidentifikovana grupa *Phomopsis* sp. 9.** Podloge Čapek, OAT i prirodna podloga od stabla soje poslužile su za morfološku karakterizaciju ispitivanih izolata. Izolati PL68 i PL75 izolovani 2010. godine obilno su fruktificirali, dok su izolati PL42, PL44 i PL/KR6, izolovani 2002., 2004. i 2008. godine, posle nekoliko presejavanja izgubili sposobnost formiranja plodonosnih tela. Kod ovih izolata, micelija je paučinasta, bele boje i bujna. Tokom rasta, od centra ka periferiji Petri kutije, micelija se slepljuje sa podlogom (prazan prostor), tako da je vidljiva samo po obodu Petri kutije (Slika 20 a). Izolati PL68 i PL75 se razlikuju u tome što je micelija zbijena, razvija se slojevito i ravnomerno ispunjava površinu Petri kutije (Slika 20 b). Slično vrsti *P. longicolla*, starenjem micelije u koloniji se uočavaju žuto-zelene zone. Takođe, sveži izolati formiraju strome slično kao kod vrste *P. longicolla*, ali kod starijih kultura strome su ili jako sitne ili njihovo formiranje izostaje. Piknidijske konidiate, prečnika do 550  $\mu\text{m}$ , obrazuju se u manjim ili većim grupama i mogu biti bez vratova ili sa malim vratom (Slika 21 a-c). Međutim, starenjem kolonije uočeno je da piknidi kod izolata PL68 i PL75 imaju vratove dužine i do 450  $\mu\text{m}$  slično kao kod vrste *P. longicolla*. Piknidi na PDA podlozi formiraju isključivo  $\alpha$  konidije (izolati PL42, PL44 i PL/KR6), dok su  $\beta$  konidije uočene u piknidima na sterilizovanim stablima soje (izolati PL68 i PL75). Morfološke karakteristike izolata PL42, PL44 i PL/KR6 dati su na osnovu opisa urađenog u momentu izolacije, jer su ovi izolati ubrzo postali sterilni. Alfa konidije kod izolata PL68 i PL75 su jednoćelijske, izdužene, sa po 2 ili više uljanih kapi, veličine  $6,2\text{-}9,7 \times 2,3\text{-}3,1 \mu\text{m}$  (Slika 21 d). Beta konidije su jednoćelijske, končaste, na jednom kraju zakrivljene, veličine  $19,5\text{-}29,1 \times 0,9\text{-}1,2 \mu\text{m}$  i ređe se formiraju (Slika 21 e). Izolati nisu obrazovali peritecije.



**Slika 20.** *Phomopsis* sp. 9: izgled kolonija na PDA podlozi sa lica i naličja (a) izolata PL42, PL44 i PL/KR6, nakon 3, 7 i 20 dana i (b) izolata PL68 i PL75

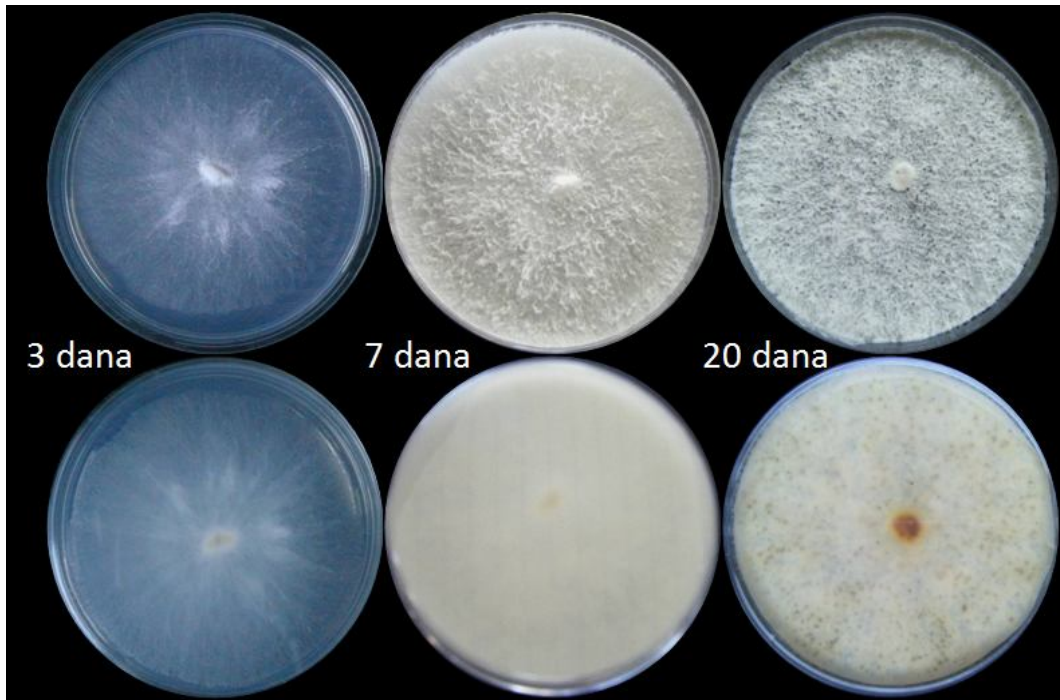


**Slika 21.** *Phomopsis* sp. 9. (a-c) piknidi; (d)  $\alpha$  konidije; (e)  $\beta$  konidije

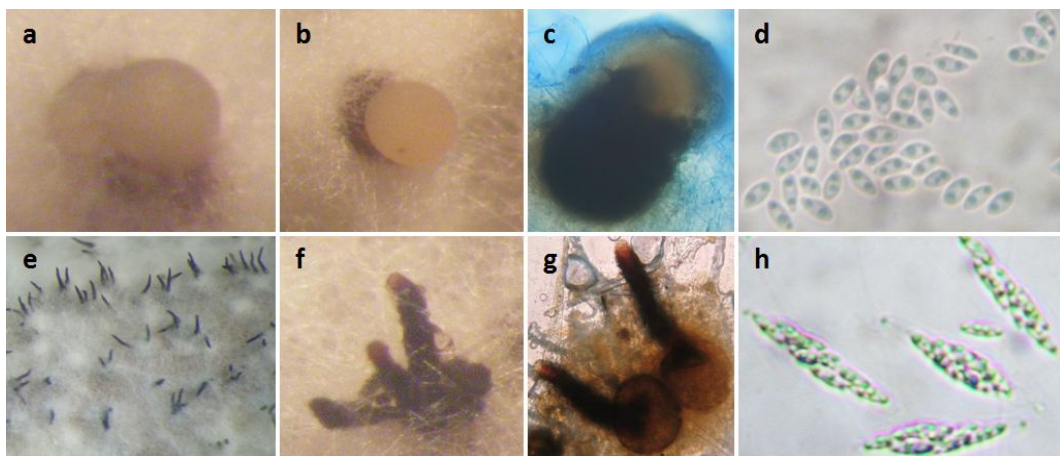
***Diaporthe phaseolorum var. caulivora.*** Na svim podlogama izolati formiraju belu, gustu i kompaktnu vazdušnu miceliju, dok supstratna micelija kod nekih izolata menja boju podloge od žute do žuto-mrke boje (Slika 22).

Na PDA podlozi, nakon pet dana od zasejavanja, izolati DPC31, DPC32, DPC36, DPC60, DPC/KR1, DPC/KR3, DPC/KR8, DPC/KR15 i DPC/KR21 formiraju pojedinačne piknide. Piknidi se obrazuju na površini kolonije, loptastog su oblika, prečnika do 300  $\mu\text{m}$  i bez vratova (Slika 23 a-c). U njima se formiraju samo  $\alpha$  konidije. One su jednoćelijske, eliptičnog oblika sa jednom, dve ili više uljanih kapi. Dimenzije konidija su 5,8-7,8  $\times$  2,4-3,8  $\mu\text{m}$  (Slika 23 d). Takođe, kod izolata DPC/KR21 uočene su i gama konidije, koje su duže, a uže od  $\alpha$  konidija, veličine 7,8-10,1  $\times$  1,6-1,9  $\mu\text{m}$  i bez uljanih kapi.

Nakon 8-10 dana mogu se uočiti kružne stromatične tvorevine, prečnika 1-3 mm u okviru kojih se posle 20 do 30 dana formiraju peritecije, najčešće oko osam na jednoj stromi. Međutim, kod izolata DPC1, DPC11, DPC36, DPC/KR9 i DPC/KR10 uočene su žućkaste zbijene strukture u okviru kojih su se formirale pojedinačne peritecije. Peritecije su crne boje sa loptastim telom uronjenim u supstrat i veoma dugim i zašiljenim vratom, koji izbija iznad površine micelije (Slika 23 e-f). Veličina tela peritecije kreće se od 270 do 420  $\mu\text{m}$ , a dužina vrata iznosi u proseku 700  $\mu\text{m}$  (Slika 23 g). U peritecijama su askusi dimenzija 23,2-34,9  $\times$  6,3-7,8  $\mu\text{m}$ . Askusi sadrže po osam dvoćelijskih, u sredini blago suženih, askospora sa po dve kapi ulja u svakoj ćeliji (Slika 23 h). Veličina askospora kreće se u rasponu 9,7-13,6  $\times$  3,4-3,9  $\mu\text{m}$ .



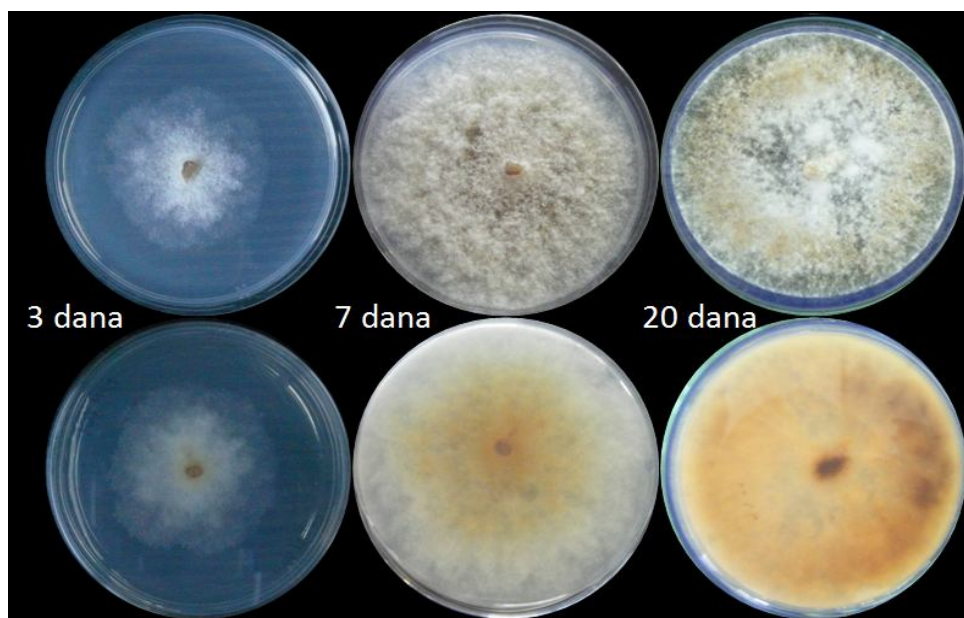
**Slika 22.** *D. phaseolorum* var. *caulivora*: izgled kolonije na PDA podlozi sa lica i naličja nakon 3, 7 i 20 dana (izolat DPC/KR21)



**Slika 23.** *D. phaseolorum* var. *caulivora*. (a-c) piknidi; (d)  $\alpha$  konidije; (e-g) peritecije; (h) askusi i askospore

***Diaporthe phaseolorum var. meridionalis***. Prirodna podloga od stabla soje i PDA poslužile su za proučavanje morfoloških karakteristika vrste. Nakon četiri do sedam dana izolati ispunjavaju površinu Petri kutije. Vazдушna micelija je bele boje, gusta i zbijena, a starenjem menja boju u žućkastu, dok supstratna micelija boji podlogu od žute do izrazito narandžaste boje (Slika 24). Nakon 20 dana izolat Dpm 1F na podlozi od stabla formira piknide loptastog oblika prečnika do 340  $\mu\text{m}$  i bez vrata. U piknidima se obrazuju samo izdužene jednoćelijske  $\alpha$  konidije sa po dve kapi ulja, veličine  $5,8-9,7 \times 2,0-2,9 \mu\text{m}$ . Ostali izolati (Dpm 201, Dpm 421 i Dpm 664) nisu formirali piknide.

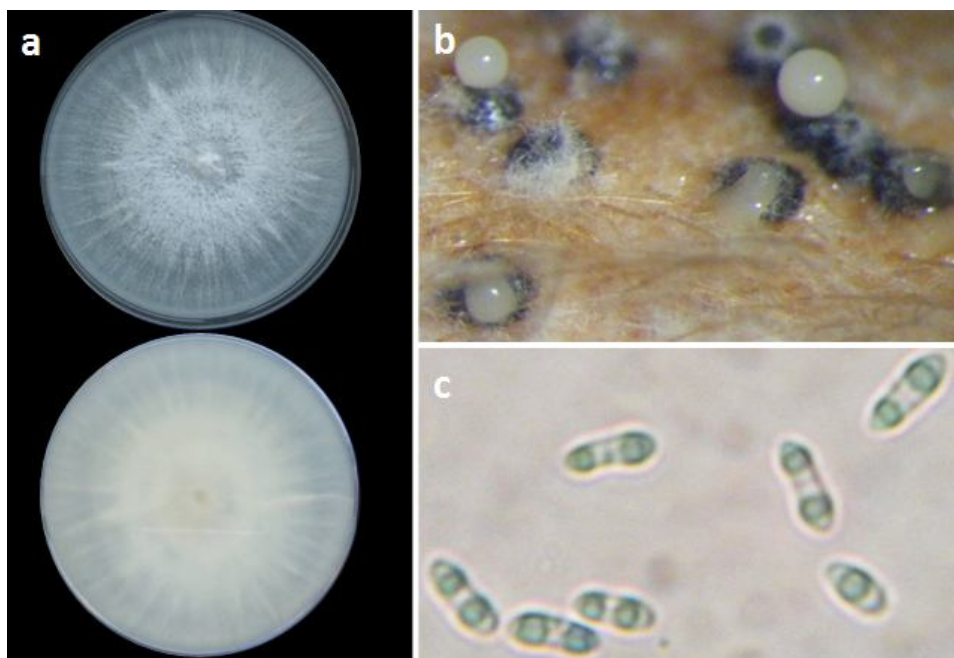
Prisustvo peritecija nije konstatovano najverovatnije zato što su ispitivani izolati stari preko 20 godina. Međutim, prema morfološkim podacima koji su evidentirani 1996. godine, izolati Dpm 201, Dpm 421, Dpm 664 i Dpm 1F u okviru stroma, prečnika 2-10 mm, formiraju peritecije (**Fernández & Hanlin, 1996**). Peritecije se nalaze u grupama, ređe pojedinačno, i imaju vratove dužine do  $897 \pm 166 \mu\text{m}$ , koji izbijaju iznad površine micelije. Iz peritecija se oslobađaju askusi, veličine  $36,4 \pm 0,6 \times 6,8 \pm 0,2 \mu\text{m}$ , koji sadrže osam dvoćelijskih askospora sa po dve uljane kapi u svakoj ćeliji, veličine  $9,6 \pm 0,2 \times 3,2 \pm 0,1 \mu\text{m}$ .



**Slika 24.** *D. phaseolorum var. meridionalis*: izgled kolonije na PDA podlozi sa lica i naličja nakon 3, 7 i 20 dana (izolat Dpm 1F)



***Diaporthe viticola***. Na podlogama od stabla soje i OAT izolat PS76 nakon osam do devet dana ispunjava površinu Petri kutije. Vazдушna micelija je bela, kompaktna i kolonija se razvija zrakasto, dok supstratna micelija podlogu boji u svetlo-rozu boju (Slika 25 a). Starenjem, po površini micelije uočavaju se guste skupine (pufne) izrazito roze boje. Na sintetičkim i polusintetičkim podlogama gljiva formira sitne strome (do 2 mm), ali nije konstatovano obrazovanje plodonosnih tela. Na podlozi od sterilizovanih stabla soje, izolat nakon devet dana formira pojedinačne okruglaste piknide (Slika 25 b), sa vidljivom ostiolom i bez vrata, prečnika do 350  $\mu\text{m}$ . Iz piknida se oslobađaju jednoćelijske  $\alpha$  konidije sa zašiljenim jednim krajem i sa po dve uljane kapi, veličine 5,8-7,8  $\times$  1,9-2,5  $\mu\text{m}$  (Slika 25 c), dok  $\beta$  konidije nisu uočene. Izolat nije formirao peritecije.

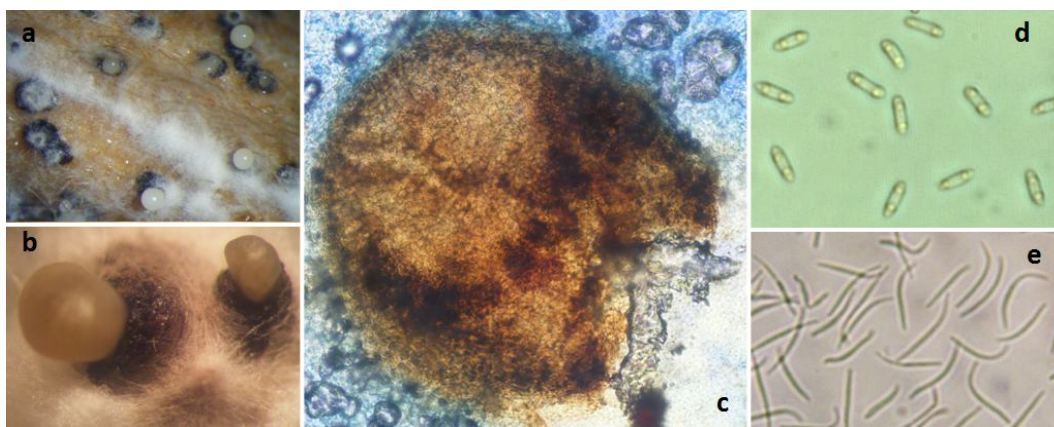


**Slika 25.** *D. viticola*. (a) izgled kolonije na PDA podlozi sa lica i naličja; (b) piknidi na sterilizovanim stablima soje; (c)  $\alpha$  konidije

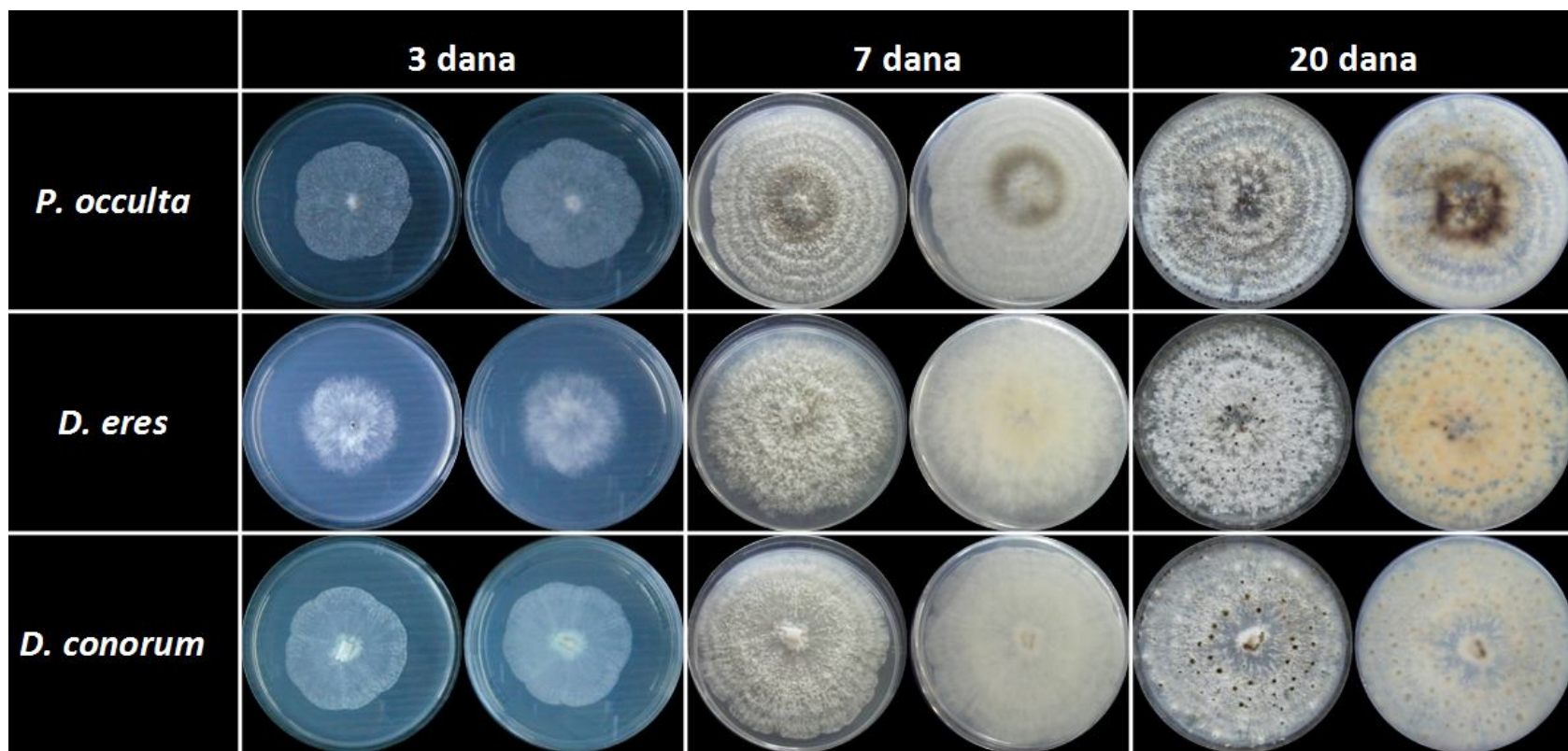
***Phomopsis occulta*, *Diaporthe eres* i *Diaporthe conorum*.** Između ITS populacija *P. occulta*, *D. eres* i *D. conorum* nisu uočene morfološke razlike (Slika 26). Na svim podlogama ispitivani izolati ispunjavaju površinu sedmi dan po zasejavanju. Kolonija se razvija kružno ili zrakasto, a vazдушna micelija je bele boje, rastresita i bujna. Oko centra kolonije neki izolati formiraju tamni prsten u okviru kojeg boje podlogu u svetlo do tamno braon boju. Izolati obrazuju okruglaste strome prečnika 2-4 mm razbacane po čitavoj površini Petri kutije (Slika 27).

Nakon 10 dana u okviru stroma formiraju se piknidijske konidiomate, koje se nalaze u grupama, a ređe pojedinačno. Konidiomate nemaju vrat, a prečnik se kreće i do 600  $\mu\text{m}$  (Slika 26 a-c). Ubrzo nakon formiranja piknida, na njihovim vrhovima se uočavaju krem kapi sa  $\alpha$  i  $\beta$  konidijama. Alfa konidije su jednoćelijske, sa zaobljenim krajevima i sa dve uljane kapi, veličine 4,8-9,7  $\times$  1,5-2,9  $\mu\text{m}$  (Slika 26 d). Beta konidije su jednoćelijske, končaste, slabo zakrivljene na jednom kraju ili skoro ravne, veličine 15,6-38,8  $\times$  0,8-1,0  $\mu\text{m}$  (Slika 26 e). Uočeno je da gljive na PDA i OAT podlogama formiraju piknide isključivo sa  $\beta$  konidijama. Kod izolata PS65 (identifikovani kao ITS populacija *D. eres*) uočene su i gama konidije veličine 8,7-11,6  $\times$  1,2-2,1  $\mu\text{m}$ .

Izolati nisu formirali peritecije, međutim treba naglasiti da su izolati PS36, PS41 i PS49 (identifikovani kao ITS populacija *D. eres*) u momentu izolovanja formirali peritecije, ali nakon pravljenja monospornog izolata, peritecije se više nikada nisu obrazovale. Ovo ukazuje da je micelija ovih izolata heterotalusna.



**Slika 26.** *P. occulta*, *D. eres* i *D. conorum*. (a-c) piknidi; (d)  $\alpha$  konidije; (e)  $\beta$  konidije



**Slika 27.** *P. occulta* (izolat PS26), *D. eres* (izolat PS74) i *D. conorum* (izolat PS57): izgled kolonija na PDA podlozi sa lica i naličja nakon 3, 7 i 20 dana



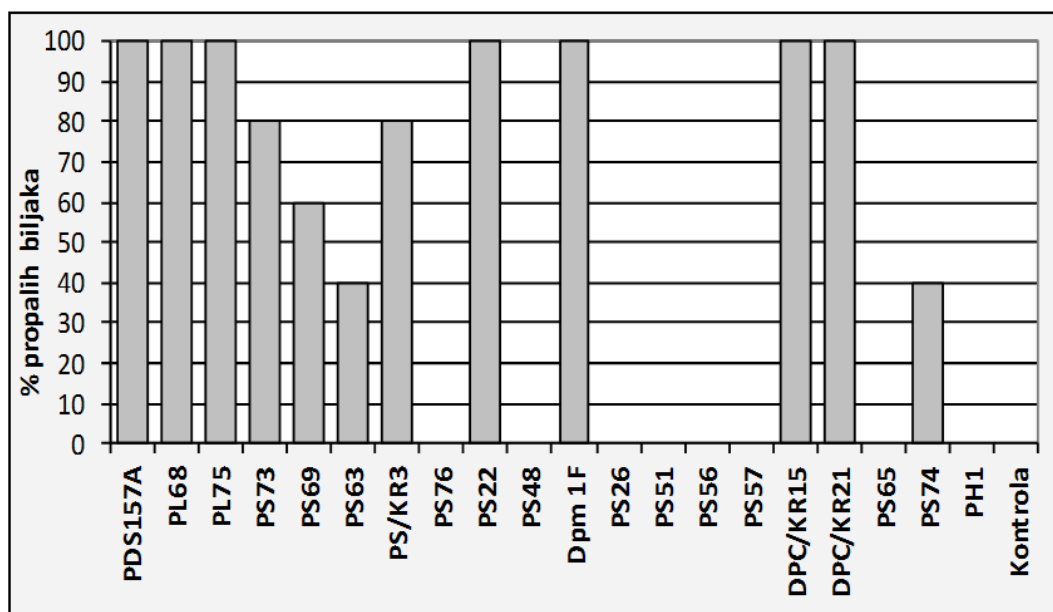
Tabela 9. Osnovne odgajivačke i morfološke karakteristike *Diaporthe/Phomopsis* vrsta

Naziv gljive	Micelija	Stroma	Piknidi	Piknospore			Peritecije
				$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	
<i>D. phaseolorum</i> <i>var. caulivora</i>	bela, zbijena, homotalusna; podlogu boji u žuto-mrku, a po površini micelije formiraju se guste skupine žućkaste boje	crne boje; kružne; r = 1 - 3 mm	retko; pojedinačno na površini kolonije; bez vrata	(+)	(-)	retko	u grupi ili pojedinačno; dugi vratovi
<i>D. phaseolorum</i> <i>var. meridionalis</i>	bela, zbijena, homotalusna; starenjem micelija menja boju, a podlogu boji od žute do izrazito narandžaste boje	crne boje; nepravilne; r = 2 - 10 mm	pojedinačno na površini kolonije; bez vrata	(+)	(-)	(-)	u grupi ili pojedinačno; dugi vratovi
<i>D. phaseolorum</i> <i>var. sojae</i>	bela, rastresita, homotalusna; starenjem micelija menja boju, a podlogu ponekad boji u svetlo rozu boju	crne boje; kružne; r = 2 - 5 mm	u okviru strome pojedinačno ili u grupama; bez vrata ili sa malim vratom, a ređe sa dugim vratom	(+)	(+)	(-)	pojedinačno; dugi vratovi
<i>P. occulta</i> , <i>D. eres</i> , <i>D. conorum</i>	bela, rastresita; starenjem micelija menja boju, a podlogu boji u tamno-braon	crne boje; kružne; r = 2 - 4 mm	u okviru strome u grupama ređe pojedinačno; bez vrata	(+)	(+)	retko	(-)
<i>P. longicolla</i>	bela, gusta; zelenkasto-žut prsten od centra rasta ka periferiji	crne boje; nepravilne; pločaste	u okviru strome u grupama ređe pojedinačno; dugi vratovi	(+)	retko	(-)	(-)
<i>Phomopsis</i> sp. 9	bela, gusta; zelenkasto-žut prsten od centra rasta ka periferiji; brzo postaje sterilna	crne boje; nepravilne; starenjem formiranje stroma izostaje	u manjim ili većim grupama; dugi vratovi ili bez vrata	(+)	retko	(-)	(-)
<i>D. viticola</i>	bela, zrakasta; podlogu boji u svetlo rozu boju; po površini micelije formiraju se guste skupine roze boje	crne boje; kružne; r = do 2 mm	pojedinačno; bez vrata	(+)	(-)	(-)	(-)
<i>D. neotheicola</i>	bela, gusta i bujna; podlogu boji u žuto-mrku do tamno braon boju	crne boje; kružne; r = do 2 mm	pojedinačno; bez vrata	(+)	(+)	(-)	(-)

## 6.7. Patogenost *Diaporthe/Phomopsis* vrsta

### 6.7.1. Provera patogenosti na biljkama soje

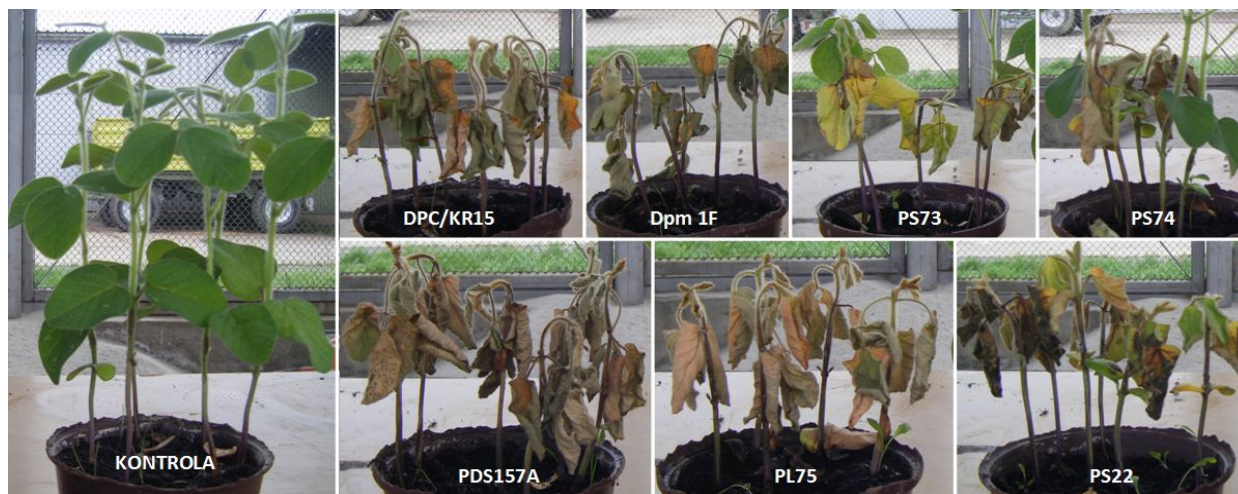
**Metoda agaroznog isečka.** Stepennost patogenosti svih izolata određivan je na osnovu broja propalih biljaka i AUDPC vrednosti. Na slici 28 grafički je predstavljen procenat uvelih biljaka nakon 20 dana od inokulacije. Ovi rezultati ukazuju da su *P. longicolla* (PDS157A), *Phomopsis* sp. 9 (PL68 i PL75), *D. phaseolorum* var. *meridionalis* (Dpm 1F), *D. phaseolorum* var. *caulivora* (DPC/KR15 i DPC/KR21) i izolati PS73, PS/KR3 (*D. phaseolorum* var. *sojae*) i PS22 (*D. neotheicola*), izuzetno patogeni na biljkama soje (Slika 29). Niži stepennost patogenosti ispoljili su izolati PS63, PS69 (*D. phaseolorum* var. *sojae*) i PS74 (*D. eres*).



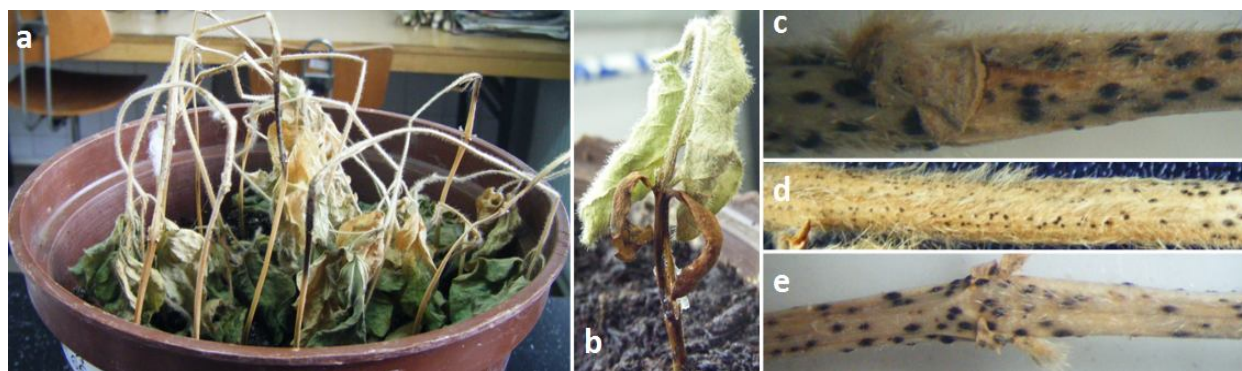
**Slika 28.** Grafički prikaz uticaja micelije *Diaporthe/Phomopsis* vrsta na propadanje biljaka

Prisutne su razlike u patogenosti i između izolata unutar iste vrste. Tako izolat PS48, identifikovan kao *D. neotheicola*, nije ispoljio patogenost, dok je drugi izolat PS22, iste vrste, prouzrokovao uvenuće svih biljaka. Slična zapažanja uočena su i između izolata vrste *D. eres* (PS65 i PS74). Uvenuće biljaka nisu prouzrokovale vrste *D. viticola* (PS76), *P. occulta* (PS26 i PS51) i *D. conorum* (PS56 i PS57).

Međutim, treba naglasiti da su na biljkama inokulisanim ovim vrstama, kao i izolatima vrste *D. eres* (PS65 i PS74), u blizini mesta uboda uočene nekrotične pege u okviru kojih su se formirali piknidi. Nakon dva meseca kompletno stablo je bilo prekriveno neravnomerno raspoređenim piknidima (Slika 30). Takođe, izolat PH1, poreklom sa suncokreta identifikovan kao *D. helianthi*, nije ispoljio patogenost na biljkama soje.

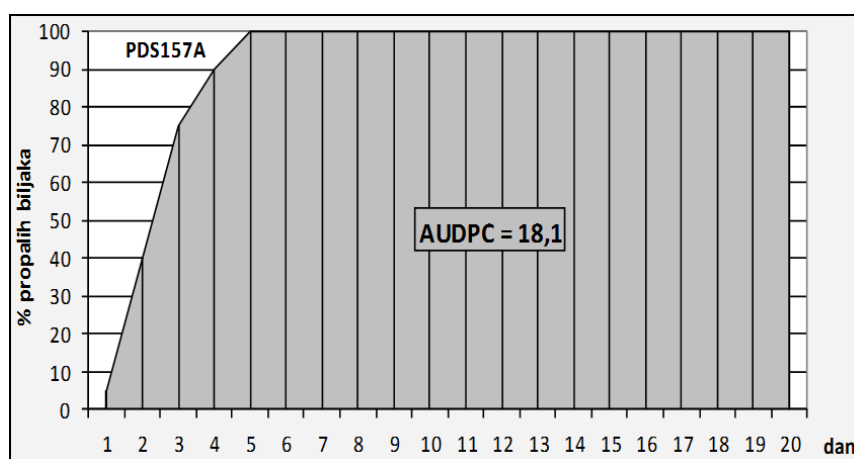


**Slika 29.** Biljke soje inokulisane metodom agaroznog isečka

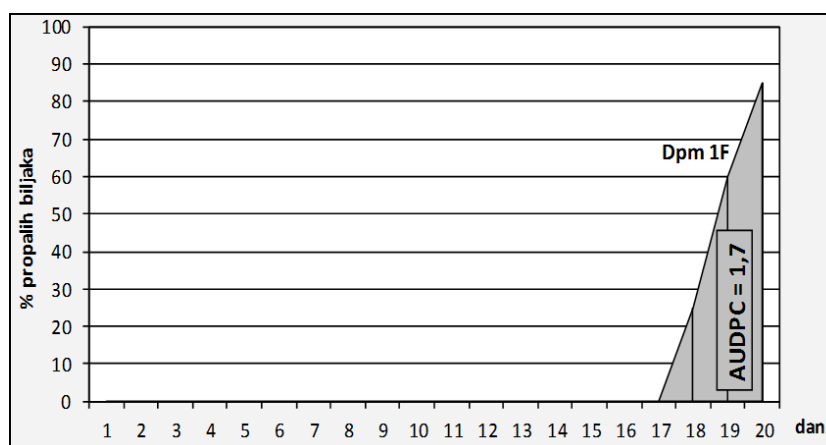


**Slika 30.** Biljke inokulisane izolatima vrste *D. viticola*, *P. occulta*, *D. conorum* i *D. eres*. (a-b) nekrotične pege; (c-e) neravnomerno raspoređeni piknidi

Dinamika uvenuća biljaka je neujednačena, kako između pojedinih vrsta, tako i između izolata iste vrste. Tako na primer izolati PDS157A i Dpm 1F su prouzrokovali propadanje svih biljaka (100%). Međutim, izolat PDS157A je prouzrokovao propadanje svih biljaka već nakon četvrtog dana od inokulacije, dok biljke inokulisane izolatom Dpm 1F nisu ispoljile nikakve promene sve do 17-tog dana, a tek nakon 20 dana izolat je prouzrokovao propadanje svih biljaka. Upravo iz tog razloga, AUDPC vrednost kod ova dva izolata se razlikuje, odnosno površina ispod krive znatno je veća kod izolata PDS157A u odnosu na površinu dobijenu kod izolata Dpm 1F (Slika 31, Slika 32).

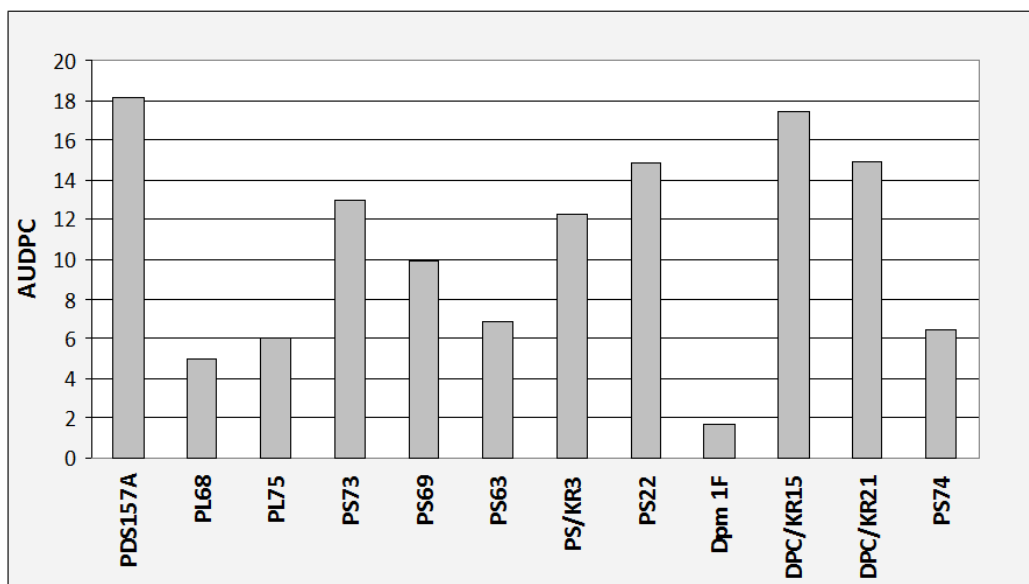


**Slika 31.** Dinamika propadanja biljaka prouzrokovana sa *P. longicolla* (izolat PDS157A)



**Slika 32.** Dinamika propadanja biljaka prouzrokovana sa *D. phaseolorum* var. *meridionalis* (izolat Dpm 1F)

Na slici 33 date su AUDPC vrednosti za sve izolate koji su prouzrokovali uvenuće biljka soje. Najveću AUDPC vrednost od 18,1 ima *P. longicolla* (PDS157A), što znači da je ovaj izolat izuzetno virulentan na biljkama soje sorte Balkan, jer za kratko vreme prouzrokuje propadanje svih biljaka (100%). Takođe, virulentnost su ispoljili i izolati vrste *D. phaseolorum* var. *caulivora* (DPC/KR15 i DPC/KR21), kao i izolat PS22 (*D. neotheicola*). Suprotno tome, *D. phaseolorum* var. *meridionalis* (Dpm 1F), kao i izolati vrste *Phomopsis* sp. 9 (PL68 i PL75), iako su prouzrokovali propadanje biljaka sa 100%, AUDPC vrednost ovih izolata je niska. Razlog je što ovi izolati prouzrokuju uvenuće biljaka posle dužeg vremenskog perioda u odnosu na vrstu *P. longicolla*. U okviru vrste *D. phaseolorum* var. *sojae* uočena je varijabilnost u pogledu virulentnosti. Posmatrajući dinamiku propadanja, kao najvirulentniji pokazao se izolat PS73 (13,0), a potom slede PS/KR3 (12,3), PS69 (9,9) i PS63 (6,9). Najmanju virulentnost ispoljio je izolat PS74 (*D. eres*) čija AUDPC vrednost iznosi 6,4.

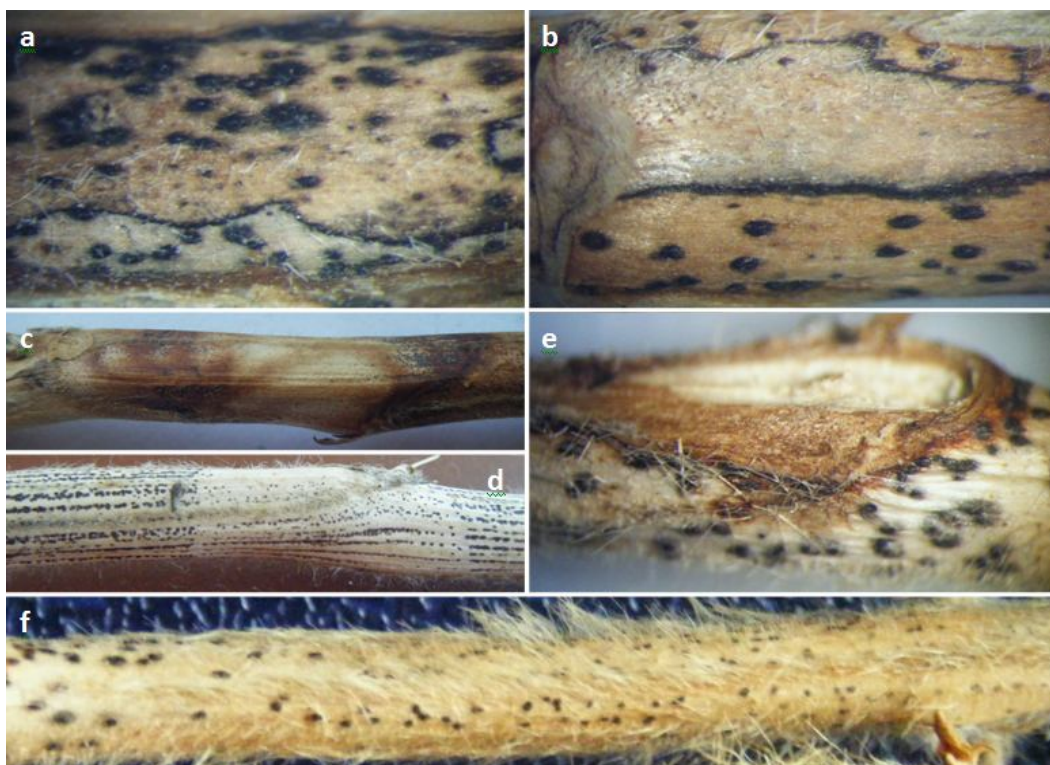


**Slika 33.** AUDPC vrednosti

**Metoda inokulacije suspenzijom spora.** U ogledu sa suspenzijom spora, nije došlo do propadanja biljaka, ali su nakon 30 dana od inokulacije zapaženi tipični simptomi na biljkama soje (Slika 34). Izolati PS69, PS/KR3, PS22, PS48 i PS56 nisu formirali reproduktivne organe, pa je bilo nemoguće proveriti njihovu



patogenost primenom ovog metoda inokulacije. Na stablima biljaka, koje su inokulisane vrstom *P. Ionicolla* (PDS157A), pojavile su se nepravilne strome u okviru kojih su se formirali piknidi sa  $\alpha$  i  $\beta$  konidijama (Slika 34 a-b). Infekcijom askosporama gljive *D. phaseolorum* var. *caulivora* (DPC/KR15 i DPC/KR21) uspešno je dobijen tipičan simptom raka stabla (Slika 34 c), dok je askosporama vrste *D. phaseolorum* var. *sojae* (PS73 i PS63) reprodukovan simptom paleži stabla (Slika 34 d). Na biljkama inokulisanim sporama vrste *Phomopsis* sp. 9 (PL75 i PL68) pojavili su se neravnomerno raspoređeni piknidi duž stabla i oko nodija (Slika 34 e-f), dok biljke inokulisane sporama ostalih izolata (PS76, Dpm 1F, PS26, PS51, PS57, PS65, PS74 i PH1) nisu ispoljile nikakve promene.



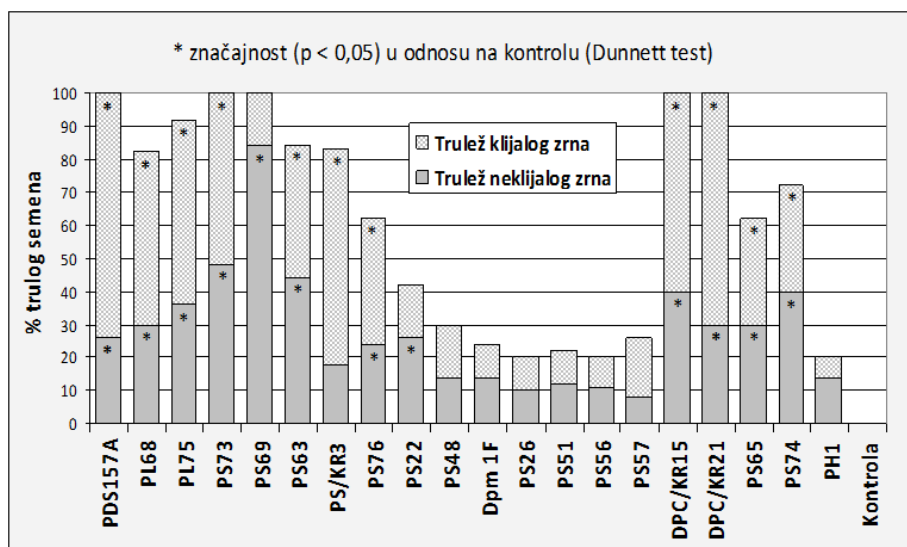
**Slika 34.** Simptomi na stablima soje prouzrokovani sporama *Diaporthe/Phomopsis* vrsta. (a-b) PL157A; (c) DPC/KR21; (d) PS63; (e) PL68; (f) PL75

## 6.7.2. Provera patogenosti na semenu soje

**Metoda inokulacije suspenzijom micelije.** Stepem patogenosti u ogledu sa suspenzijom micelije određivan je na osnovu broja trulih klijalih i trulih nekljalih zrna. Koristeći Dunnett test, srednje vrednosti svih tretmana upoređene su sa kontrolom. Klijavost semena u kontroli iznosila je 100%.

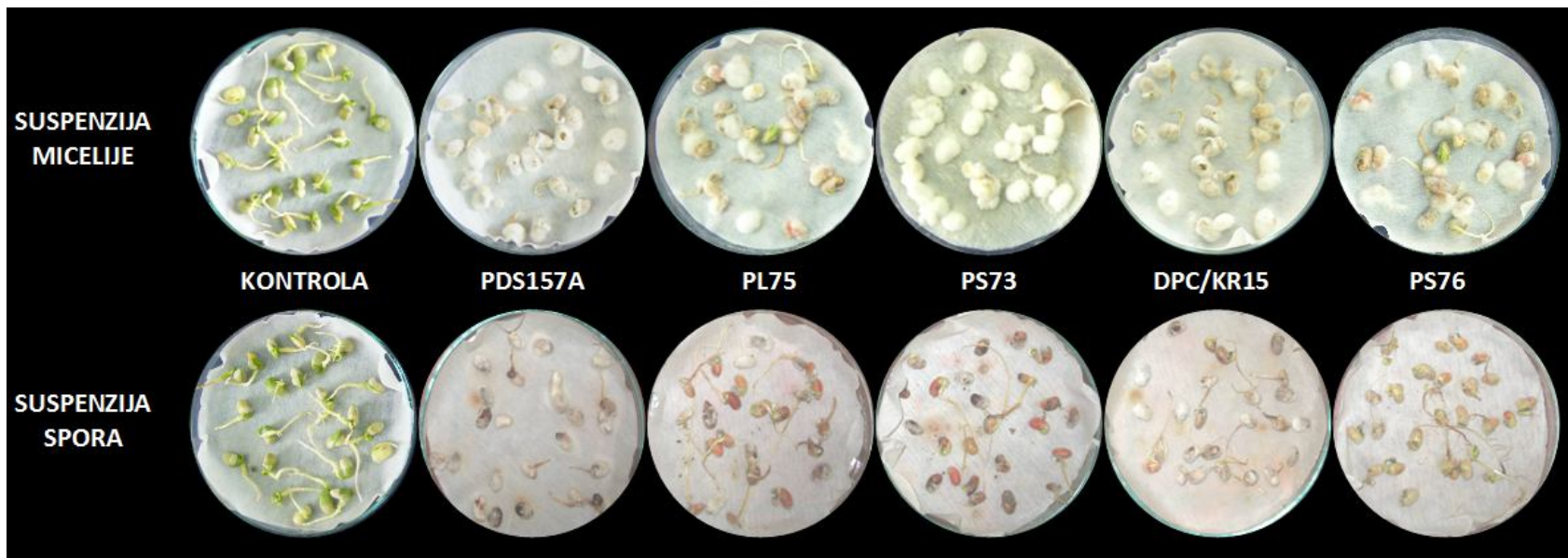
Na osnovu dobijenih rezultata može se konstatovati da *P. longicolla* (PDS157A), *Phomopsis* sp. 9 (PL68 i PL75), *D. phaseolorum* var. *sojae* (PS73, PS69, PS63 i PS/KR3) i *D. phaseolorum* var. *caulivora* (DPC/KR15 i DPC/KR21) ispoljavaju visok stepen patogenosti na semenu soje, dok su znatno slabije patogene vrste *D. viticola* (PS76) i *D. eres* (PS65 i PS74) (Slika 35, Slika 36). Sve navedene vrste podjednako prouzrokuju trulež nekljalog i klijalog zrna, izuzev izolata PS69 koji prvenstveno prouzrokuje trulež nekljalog zrna, dok izolat PS/KR3 prouzrokuje trulež klijalog zrna. Takođe, utvrđeno je da izolat PS22 (*D. neotheicola*) prouzrokuje trulež nekljalog zrna, dok izolat PS48, iste vrste, nije prouzrokovao statistički značajan procenat truleži.

Kod vrsta *D. phaseolorum* var. *meridionalis* (Dpm 1F), *P. occulta* (PS26 i PS51), *D. conorum* (PS56 i PS57) i *D. helianthi* (PH1), u odnosu na kontrolu, nije utvrđen statistički značajan procenat trulog semena.



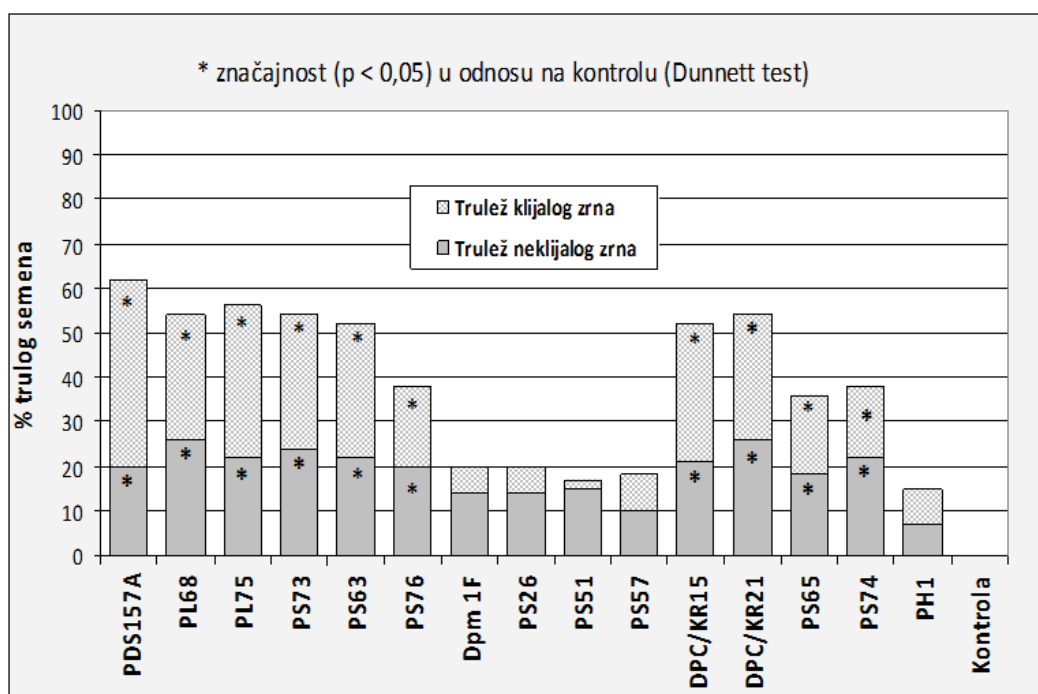
**Slika 35.** Grafički prikaz uticaja micelije *Diaporthe/Phomopsis* vrsta na trulež semena soje





**Slika 36.** Seme soje inokulisano suspenzijom micelije (gore) i suspenzijom spora (dole).

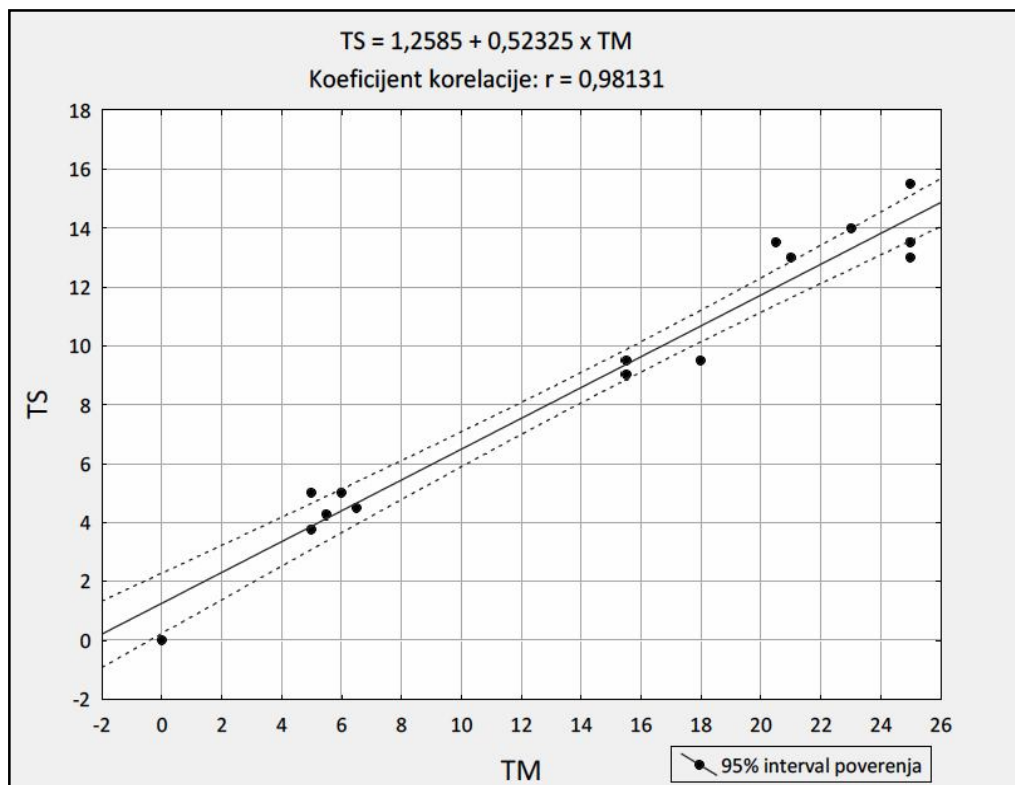
**Metoda inokulacije suspenzijom spora.** Stepjen patogenosti je odredivan na identičan način kao u ogledu sa suspenzijom micelije. Klijavost semena u kontroli iznosila je 100%. Kao i u prethodnom ogledu, vrsta *P. longicolla* (PDS157A), *Phomopsis* sp. 9 (PL68 i PL75), *D. phaseolorum* var. *sojae* (PS73 i PS63) i *D. phaseolorum* var. *caulivora* (DPC/KR15 i DPC/KR21) ispoljile su visok stepen patogenosti (Slika 36, Slika 37). Niži stepen patogenosti pokazale su vrste *D. viticola* (PS76) i *D. eres* (PS65 i PS74), dok kod vrsta *D. phaseolorum* var. *meridionalis* (Dpm 1F), *P. occulta* (PS26 i PS51), *D. conorum* (PS56 i PS57) i *D. helianthi* (PH1) procentualni udeo trulog semena nije statistički značajan u odnosu na kontrolu.



**Slika 37.** Uticaja spora *Diaporthe/Phomopsis* vrsta na trulež semena soje

### 6.7.3. Poređenje testova patogenosti

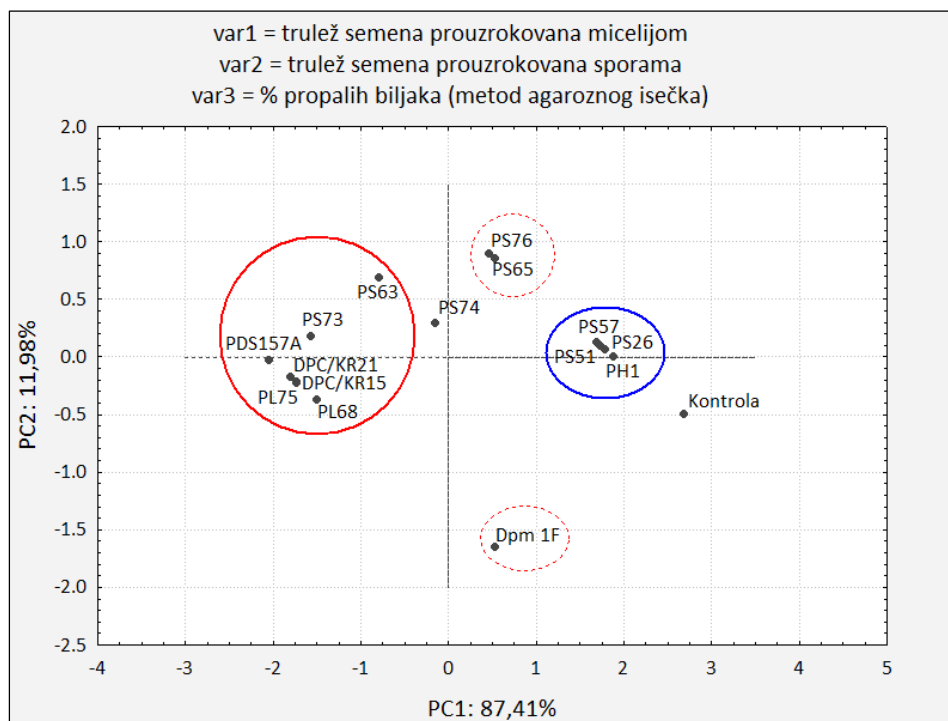
Na osnovu koeficijenta korelacije ( $r$ ) sagledana je veze između ukupnog broja trulih zrna (klijalih i neklijalih) u ogledu sa suspenzijom micelije i broja trulih zrna u ogledu sa suspenzijom spora (Slika 38). S obzirom da je dobijen visok pozitivan koeficijent korelacije ( $r = 0,98$ ), može se konstatovati da je broj trulih zrna u ogledu sa micelijom ekvivalentan broju trulih zrna u ogledu sa suspenzijom spora.



**Slika 38.** Korelacija između broja trulih zrna pri inokulaciji suspenzijom micelije (TM) i sporama (TS)

Poređenjem rezultata testova patogenosti sprovedenih na biljkama i semenu soje, grafički je predstavljeno grupisanje izolata na osnovu stepena patogenosti (Slika 39). Rezultati analize glavnih komponentata (PCA) pokazuju da kumulativna varijabilnost sadržana u prve dve komponente (PC1 i PC2) iznosi preko 99%, s očekivanim najvećim udelom prve komponente (PC1) od oko 87%.

Treća komponenta u ukupnoj varijabilnosti doprinosi svega 0,61%, pa se može zanemariti. Iz tog razloga, grupisanje izolata prema stepenu patogenosti dovoljno je predstaviti pomoću prve dve komponente.



**Slika 39.** Grupisanje izolata prema stepenu patogenosti PCA ordinationom tehnikom. Ose (PC1 i PC2 - prva i druga glavna komponenta) doprinose objašnjenju 87,41%, odnosno 11,98% ukupne varijanse

Kao najpatogeniji izdvojeni su *P. longicolla* (PDS157A), *Phomopsis* sp. 9 (PL68 i PL75), *D. phaseolorum* var. *caulivora* (DPC/KR15 i DPC/KR21) i *D. phaseolorum* var. *sojae* (PS73 i PS63). Manje patogen pokazao se izolat PS74 (*D. eres*), dok vrste *P. occulta* (PS26 i PS51), *D. conorum* (PS57) i *D. helianthi* (PH1) nisu patogene. Izolati PS65 (*D. eres*) i PS76 (*D. viticola*) pokazali su da mogu biti patogeni samo na semenu, dok je izolat Dpm 1F (*D. phaseolorum* var. *meridionalis*) ispoljio visok stepen patogenosti samo na biljkama soje.

## 6.8. Taksonomija *Diaporthe/Phomopsis* vrsta

Na osnovu detaljno proučene etiologije naziva svake vrste i u skladu sa dobijem rezultatima molekularnih, morfoloških i patogenih istraživanja predložene su izvesne izmene u taksonomiji roda *Diaporthe/Phomopsis*. Taksonomija je predložena prema novoprihvaćenom konceptu "jedna gljiva - jedno ime", koji stupa na snagu 01. januara 2013. godine (McNeill *et al.*, 2011). Pored svakog taksonomskog naziva naveden je MycoBank (MB#) broj ili referenca. MycoBank je online baza podataka u kojoj se nalaze imena svih vrsta gljiva. Svakoj prijavljenoj vrsti, nakon što je stručnjaci provere da li je u skladu sa kodeksom klasifikacije (ICN), dodjeljuje se jedinstveni MycoBank broj ([www.mycobank.org](http://www.mycobank.org)).

Takođe, za pretragu taksonomskih naziva, kao i njihovih sinonima, poslužila je i Index Fungorum baza ([www.indexfungorum.org](http://www.indexfungorum.org)). Pored taksonomskog pregleda, za svaku gljivu naveden je spektar domaćina i rasprostranjenost. Ovi podaci su preuzeti iz USDA ARS Fungal Database (<http://nt.ars-grin.gov/fungalDATABASES/>) i EPPO baze (<http://gd2.eppo.org/>).

### 1. *Diaporthe phaseolorum* (MB164797)

*Basionym*: *Sphaeria phaseolorum* (MB416577)

= *Septomazzantia phaseolorum* (MB450524)

Anamorf: *Phomopsis phaseoli* (MB274192)

*Basionym*: *Phoma phaseoli* (MB244513)

= *Phoma subcircinata* (MB237779)

#### a) *Diaporthe phaseolorum* var. *phaseolorum* (MB418436)

Anamorf: *Phomopsis phaseoli* (MB274192)

*Basionym*: *Phoma phaseoli* (MB244513)

= *Phomopsis phaseoli* var. *phaseoli* (MB246576)

Poznati domaćini: *Phaseolus vulgaris* i *P. lunatus*

Rasprostranjenost: Severna Amerika, Karibi, Južna i Istočna Afrika.

**b) *Diaporthe phaseolorum* var. *batatatis* [*batatae*] (MB537138)**

*Basionym: Diaporthe batatatis* [*batatas*] (MB530389)

= *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *batatatis* (**Morgan-Jones, 1989**)

= *Chorostate batatae* [*batatas*] (MB143521)

Anamorf: *Phomopsis phaseoli* (MB274192)

*Basionym: Phoma phaseoli* (MB244513)

= *Phomopsis batatae* [*batatas*] (MB499438)

≡ *Phoma batatae* [*batatas*] (MB158618)

Poznati domaćini: *Ipomoea batatas*, *I. reptans* i *Dioscorea alata*.

Rasprostranjenost: Južna i Srednja Amerika, Novi Zeland i Azija.

**c) *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* (MB346720)**

= *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *caulivora* (MB118262)

= *Diaporthe caulivora* (MB518520)

Anamorf: *Phomopsis phaseoli* (MB274192)

*Basionym: Phoma phaseoli* (MB244513)

= *Phomopsis phaseoli* f. sp. *caulivora* (MB118264)

Poznati domaćini: *Glycine max*, *Abutilon theophrasti* i *Dipsacus lacinatus*.

Rasprostranjenost: Južna i Severna Amerika i Evropa.

**d) *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* (MB416161)**

= *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* (**Morgan-Jones, 1989**)

= *Diaporthe aspalathi* (MB500803)

Anamorf: *Phomopsis phaseoli* (MB274192)

*Basionym: Phoma phaseoli* (MB244513)

= *Phomopsis phaseoli* f. sp. *meridionalis* (MB445638)

= *Phomopsis meridionalis* (**Jaccoud Filho & Lee, 2004b**)

Poznati domaćini: *Glycine max*, *Acer truncatum* i *Aspalathus linearis*.

Rasprostranjenost: Argentina, Kina, Južni SAD i Južna Afrika.

## 2. *Diaporthe sojae* (MB278338)

- = *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* (MB123980)
- = *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *sojae* (**Morgan-Jones, 1989**)
- = *Diaporthe capsici* (MB111401)
- = *Diaporthe melonis* var. *brevistylospora* (MB126352)
- = *Diaporthe kochmanii* (MB561571)

Anamorf: *Phomopsis sojae* (MB454013)

Basionym: *Phoma sojae* (**Wolf & Lehman, 1920**)

- = *Phomopsis phaseoli* var. *sojae* (Index Fungorum)
- = *Phomopsis glycines* (MB266190)
- = *Phomopsis capsici* (MB100274)
- ≡ *Phoma capsici* (MB202635)
- = *Phomopsis brevistylospora* (MB126351)
- = *Phomopsis camptothecae* (MB344453)

Poznati domaćini: širok spektar domaćina, ali je gljiva ekonomski najznačajnija na soji.

Rasprostranjenost: Amerika, Evropa, Afrika, Azija i Okeanija.

## 3. *Diaporthe neotheicola* (MB512257)

- = *Diaporthe rhusicola* (MB560170)

Anamorf: *Phomopsis theicola* (MB446039)

- = *Phomopsis* sp. 1 (**Mostert et al., 2001**)

Poznati domaćini: *Camellia sinensis*, *Aspalathus linearis*, *Acer negundo*, *Euphorbia pulcherrima*, *Foeniculum vulgare*, *Hydrangea macrophylla*, *Protea*, *Prunus*, *Pyrus*, *Vitis vinifera*, *Rhus pendulina* i *Glycine max*.

Rasprostranjenost: Portugal, Južna Afrika, Italija i Srbija.

**4. *Diaporthe eres* (MB172054)**

- = *Diaporthe conorum* (MB186351)
  - ≡ *Sphaeria conorum* (MB220956)
- = *Diaporthe occulta* (MB159719)
  - ≡ *Valsa occulta* (MB185791)
- = *Diaporthe controversa* (MB186445)
  - ≡ *Sphaeria controversa* (MB152350)
  - ≡ *Valsa controversa* (MB465739)
- = *Diaporthe mali* (MB150935)
- = *Diaporthe perniciosa* (MB273986)
- = *Diaporthe scobina* (MB245235)
  - ≡ *Sphaeria scobina* (MB465762)

Anamorf: *Phomopsis eres* (**Grove, 1918**)

Basionym: *Phoma eres* (MB207140)

- = *Phomopsis oblonga* (MB120993)
  - ≡ *Phoma oblonga* (MB162068)
- = *Phomopsis conorum* (MB238433)
  - ≡ *Phoma conorum* (MB217067)
- = *Phomopsis* sp. 6 (**Van Niekerk et al., 2005**)
- = *Phomopsis cotoneastri* (MB320174)
- = *Phomopsis occulta* (MB102123)
  - ≡ *Phoma occulta* (MB154792)
- = *Phomopsis* sp. 4 (**Van Niekerk et al., 2005**)
- = *Phomopsis controversa* (MB101042)
  - ≡ *Phoma controversa* (MB217104)
- = *Phomopsis mali* (MB445714)
  - ≡ *Phoma mali* (MB226713)
- = *Phomopsis prunorum* (MB320201)
  - ≡ *Phoma prunorum* (MB233583)
- = *Phomopsis perniciosa* (MB273987)
- = *Phomopsis scobina* (MB123288)
  - ≡ *Phoma scobina* (MB163985)



Poznati domaćini: preko 300 biljnih vrsta, uključujući i nekoliko ekonomski značajnih, zabeleženi su kao domaćini. Međutim, ovo je prvi put da je *D. eres* konstatovan na semenu soje (*Glycine max*).

Rasprostranjenost: Severna Amerika, Evropa, Azija i Afrika.

**5. *Diaporthe pseudolongicolla*** nom. nov. (MB564245)

= *Diaporthe novem* (MB518521)

Anamof: *Phomopsis* sp. 9 (**Janse van Rensburg et al., 2006**)

Poznati domaćini: *Asclepias syriaca*, *Aspalathus linearis*, *Glycine max*, *Helianthus annuus*, *Hydrangea macrophylla* i *Vitis vinifera*.

Rasprostranjenost: Južna Afrika, Italija, Portugal, Srbija i Hrvatska.

**6. *Phomopsis longicolla*** (MB105685)

= *Diaporthe longicolla* (MB563213)

Poznati domaćini: *Glycine max*, *Ambrosia trifida*, *Euphorbia maculata*, *Rumex crispus*, *Xanthium strumarium*, *Abutilon theophrasti*, *Arachis hypogaea*, *Aster exilis*, *Acer truncatum*, *Caperonia palustris*, *Desmanthus illinoensis*, *Eclipta prostrata*, *Euphorbia nutans*, *Ipomoea lacunosa*, *Polygonum aviculare*, *Sida spinosa* i *Chamaesyce nutans*.

Rasprostranjenost: SAD, Srbija, Australija, Italija, Hrvatska, Grčka i Novi Meksiko.

**7. *Diaporthe viticola*** (MB234198)

Poznati domaćini: *Vitis vinifera* i *Hydrangea macrophylla*, a ovo je prvi put da je *D. viticola* konstatovana na semenu soje (*Glycine max*).

Rasprostranjenost: Samo u Evropi (Portugal, Nemačka, Italija i Srbija) i Australiji.

Sekvence reprezentativnih izolata, koje su poslužile za molekularnu, morfološku i patogenu karakterizaciju *Diaporthe/Phomopsis* vrsta, deponovane su u NCBI bazu podataka ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). U ovoj bazi, svi izolati su zavedeni prema predloženoj taksonomiji (Tabela 10).

Tabela 10. Sekvence izolata deponovane u NCBI bazu podataka				
Vrsta	Izolat	Pristupni broj u NCBI		
		ITS	LSU	TEF <sub>1-α</sub>
<b><i>D. phaseolorum</i> var. <i>caulivora</i></b>	DPC/KR21	JF418934	JF411057	JF461465
	DPC31	JF418935	JF411058	JF461466
	DPC/KR1	JF418936	JQ697879	JQ697852
	DPC/KR15	JF418937	JQ697878	JF461467
<b><i>D. phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i></b>	Dpm 664	JF430485	JF704177	JF461479
	Dpm 201	JQ697850	JQ697876	JQ697863
	Dpm 421	JQ697849	JQ697875	JQ697862
<b><i>D. sojae</i></b>	PS/KR3	JF430489	JF704169	JF461471
	PS63	JQ697848	JQ697874	JQ697861
	PS69	JQ697847	JQ697873	JQ697860
	PS73	JQ697846	JQ697872	JQ697859
<b><i>P. longicolla</i></b>	PL/KR19	JF430483	JF704167	JF461469
	PL/KR3b	JF430482	JF704166	JF461468
	PDS157A	JQ697845	JQ697871	JQ697858
<b><i>D. neotheicola</i></b>	PS22	JF430495	JF704179	JF461481
	PS48	JF430496	JQ697865	JF461482
<b><i>D. viticola</i></b>	PS76	JQ697840	JQ697866	JQ697853
<b><i>D. pseudolongicolla</i></b>	PL/KR6	JF704181	JF704180	JF704182
	PL68	JQ697842	JQ697868	JQ697855
	PL75	JQ697841	JQ697867	JQ697854
	PL42	JQ697843	JQ697869	JQ697856
<b><i>D. eres</i></b>	PS26	JF430491	JF704173	JF461475
	PS51	JF430492	JF704174	JF461476
	PS65	JF430487	JF704171	JF461473
	PS74	JF430488	JF704172	JF461474
	PS56	JF430493	JF704175	JF461477
	PS57	JF430494	JF704176	JF461478
<b><i>D. helianthi</i></b>	PH1	JF430484	JF704168	JF461470

## 7. DISKUSIJA

### 7.1. BLAST identifikacija i filogenetske analize

Savremene molekularne metode identifikacije i karakterizacije fitopatogenih gljiva uvele su sasvim nove pristupe u taksonomiju. Najnovija istraživanja roda *Diaporthe/Phomopsis* baziraju se na sekvencama različitih regiona rDNK na osnovu kojih se sprovodi filogenetsko grupisanje.

U našoj zemlji na osnovu morfoloških karakteristika identifikovane su vrsta *P. longicolla* i dva varijeteta vrste *D. phaseolorum* (*D. phaseolorum* var. *sojae* i *D. phaseolorum* var. *caulivora*) (Jasnić & Vidić, 1981; 1983; Jasnić & Vidić, 1985; Vidić & Jasnić, 1994; Petrović & Vidić, 2010). Međutim, mnogi autori su ukazivali na izuzetnu varijabilnost vrste *D. phaseolorum* var. *sojae* (Fernández & Hanlin, 1996; Zhang *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1999; Riccioni *et al.*, 1998; 2003; 2005; Pioli *et al.*, 2003; Jaccoud Filho & Lee, 2004a; Costamilan *et al.*, 2008) i sugerisali da *D. phaseolorum* var. *sojae* predstavlja ili nekoliko varijeteta vrste *D. phaseolorum* ili nekoliko posebnih vrsta (Zhang *et al.*, 1998; Riccioni & Vrandečić, 2007). S obzirom da je u ovom istraživanju uočena izražena morfološka varijabilnost izolata determinisanih kao *D. phaseolorum* var. *sojae*, za precizno utvrđivanje *Diaporthe/Phomopsis* vrsta bila su neophodna proučavanja na molekularnom nivou.

Pored poznatih patogena soje (*P. longicolla*, *D. phaseolorum* var. *caulivora* i *D. phaseolorum* var. *sojae*), na osnovu ITS sekvenci identifikovane su i *D. viticola*, *D. neotheicola*, *P. occulta*, *D. eres*, *D. conorum* i neidentifikovana grupa *Phomopsis* sp. 9. Treba naglasiti da su sve novootkrivene vrste izolovane iz semena soje, izuzev izolata PS58 (*P. occulta*) i PS59 (*D. conorum*) koji su izolovani iz stabla, a poreklom su iz Ukrajine. Dosadašnja istraživanja ukazivala su na prisustvo drugih *Diaporthe/Phomopsis* vrsta na semenu soje (Zhang *et al.*, 1998; Riccioni & Vrandečić, 2007; Riccioni & Haegi, 2008; Santos *et al.*, 2011), ali ovo je prvi nalaz novih vrsta na semenu soje u Srbiji, dok su *D. viticola* i *D. eres* po prvi put detektovane na semenu soje u svetu i kod nas.

Radi utvrđivanja što bolje filogenetske veze u istraživanje su uključeni i izolati vrste *D. phaseolorum* var. *meridionalis* poreklom iz SAD, kao i *D. helianthi* parazit suncokreta. Kod sva tri filogenetska stabla (ITS, LSU, TEF<sub>1</sub>-α) sve *Diaporthe/Phomopsis* vrste se jasno izdvajaju u posebne filogenetske klade sa visokim bootstrap vrednostima. Pored poznatih patogena soje (*P. longicolla* i sva tri varijeteta vrste *D. phaseolorum*) u sva tri filograma su izdvojene i klade identifikovane kao *D. neotheicola*, *D. viticola* i *Phomopsis* sp. 9. Interesantna je grupa izolata koja je u ITS filogramu podeljena u tri posebne klade identifikovane kao *P. occulta*, *D. eres* i *D. conorum*. Međutim, u LSU i TEF<sub>1</sub>-α filogramu ove tri ITS populacije grupisane su u jednu kladu, odnosno predstavljene su kao jedna filogenetska vrsta.

Posmatrajući varijetete vrste *D. phaseolorum*, uočeno je da je *D. phaseolorum* var. *sojae* u sva tri filograma filogenetski udaljen od druga dva varijeteta (*D. phaseolorum* var. *caulivora* i *D. phaseolorum* var. *meridionalis*). Takođe, postoji i veliki broj razlika u nukleotidima u vidu delecija/insercija i supstitucija. Sekvenca *D. phaseolorum* var. *sojae* razlikuje se u 51 nukleotidu od *D. phaseolorum* var. *meridionalis*, odnosno u 42 nukleotida od *D. phaseolorum* var. *caulivora*. Navedeni podaci sugerišu da je *D. phaseolorum* var. *sojae* posebna filogenetska vrsta, a ne varijetet vrste *D. phaseolorum*, što je u saglasnosti sa rezultatima drugih autor (**Zhang et al., 1998; Riccioni & Vrandečić, 2007**). Druga dva varijeteta (*D. phaseolorum* var. *caulivora* i *D. phaseolorum* var. *meridionalis*) su filogenetski bliska u ITS i LSU filogramu, dok su u TEF<sub>1</sub>-α filogramu jasno predstavljeni kao sestrinske klade. To ukazuje da *D. phaseolorum* var. *caulivora* i *D. phaseolorum* var. *meridionalis* predstavljaju "prave" varijetete vrste *D. phaseolorum*, što je ranije utvrđeno od strane više autora (**Fernández & Hanlin, 1996; Zhang et al., 1998; Pioli et al., 2003**).

U literaturi, autori navode da je *D. phaseolorum* var. *sojae* s molekularne tačke gledišta jako bliska vrsti *P. longicolla* (**Fernández & Hanlin, 1996; Zhang et al., 1998**). Međutim, proučavanja sve tri filogenije (ITS, LSU, TEF<sub>1</sub>-α) jasno pokazuju da su ove dve gljive posebne filogenetske vrste. U okviru vrste *P. longicolla* nije uočena ni najmanja varijabilnost, odnosno sekvence svih 64 proučavanih izolata su uniformne u sva tri ispitivana regiona DNK. Međutim, kod vrste *D.*

*phaseolorum* var. *caulivora* uočena je izvesna varijabilnost u ITS regionu. Usled supstitucije na 462 bp, izolati *D. phaseolorum* var. *caulivora* se jasno dele u dve podgrupe, što je u saglasnosti sa prethodnim istraživanjima (**Zhang et al., 1998; Riccioni et al., 1998; 2003; 2005**). Nešto veća varijabilnost prisutna je među ITS sekvencama *D. phaseolorum* var. *sojae*. U okviru ove vrste izdvajaju se četiri podgrupe, koje se među sobom razlikuju u samo jednom nukleotidu na 181, 209 i 472 bp.

O predstavnicima roda *Diaporthe/Phomopsis* koji se javljaju na soji nema puno literaturnih podataka, koja se odnose na identifikaciju vrsta ovog roda pomoću sekvenci različitih regiona DNK. Međutim, postoji obilje publikacija koje su se bavile problematikom molekularne identifikacije *Diaporthe/Phomopsis* vrsta poreklom iz različitih zeljastih i drvenastih biljaka. Najviše se radilo na ispitivanju vrsta roda *Phomopsis* koje se javljaju na vinovoj lozi. Dugo vremena verovalo se da je na vinovoj lozi prisutna samo vrsta *P. viticola*. Međutim, primenom sekvenci ITS regiona rDNK utvrđeno je da čak 15 različitih vrsta mogu kolonizirati ovu biljnu vrstu (**Van Niekerk et al., 2005**).

Na osnovu morfoloških karakteristika sve vrste roda *Phomopsis*, koje se javljaju na vinovoj lozi podeljene su na *Taxon 1*, *Taxon 2*, *Taxon 3* i *Taxon 4* (**Merrin et al., 1995**). Kasnije je utvrđeno da *Taxon 1* predstavlja vrstu *D. perfuncta*, *Taxon 2* vrstu *P. viticola*, dok su druga dva *Taxon*-a ostala neidentifikovana (**Phillips, 1999**). Ubrzo je opisan teleomorf *Taxon*-a 1 kao *D. viticola* (**Scheper et al., 2000**), dok je *Taxon 4* identifikovan kao *Libertella* spp. (**Mostert et al., 2001**). Takođe, uvedena je i numerička klasifikacija, tako da je *Taxon 3* označen kao *Phomopsis* sp. 1, dok je izolat sa vinove loze poreklom iz Italije označen kao *Phomopsis* sp. 2 (**Mostert et al., 2001**). Međutim, ispitivanjem filogenije ITS regiona pokazalo se da se svi analizirani *Phomopsis* izolati sa vinove loze mogu podeliti u osam grupa, pa je numerička klasifikacija proširena sve do *Phomopsis* sp. 8 (**Van Niekerk et al., 2005**). Godinu dana kasnije, na osnovu rezultata dobijenih ispitivanjem ITS regiona i gena TEF<sub>1</sub>- $\alpha$  kod *Phomopsis* vrsta, izolovanih iz biljke *A. linearis*, uvedena je neidentifikovana grupa *Phomopsis* sp. 9 (**Janse van Rensburg et al., 2006**). Pored toga, istraživanje je rezultiralo identifikacijom grupe *Phomopsis* sp. 1 kao *Phomopsis theicola* (teleomorf *Diaporthe*

*theicola*). Međutim, ispitivanjem morfoloških i odgajivačkih karakteristika, kao i primenom MSP-PCR profila i sekvenci ITS regiona, ustanovljeno je da *D. theicola* nije teleomorf gljive *P. theicola*. Shodno tome, predložen je modifikovani naziv za teleomorfni stadijum ove gljive - *Diaporthe neotheicola* CBS123209 (**Santos & Phillips, 2009**).

U ovom istraživanju, na osnovu sekvenci ITS regiona identifikovane su grupa *Phomopsis* sp. 1 (identifikovana kao *D. neotheicola* (**Santos & Phillips, 2009**)), *Phomopsis* sp. 4 (identifikovana u ovom radu kao *P. occulta*), *Phomopsis* sp. 6 (identifikovana u ovom radu kao *D. conorum*) i neidentifikovana grupa *Phomopsis* sp. 9. Takođe, jedan izolat je identifikovan kao *Taxon* 1, odnosno kao vrsta *D. viticola*.

Izolati PS22 i PS48 su pomoću ITS i TEF<sub>1</sub>- $\alpha$  sekvenci identifikovani kao vrsta *D. neotheicola* u poređenju sa referentnim izolatom CBS123209 poreklom iz biljke *F. vulgare*. U NCBI bazi podataka ne postoje sekvence LSU regiona za ovu vrstu. Međutim, ustanovljeno je da su LSU sekvence proučavanih izolata u potpunosti identične sa sekvencom referentnog izolata CBS129528. Ovaj izolat je identifikovan kao vrsta *D. rhusicola* i poreklom je iz drvenaste biljke *Rhus pendulina* (**Crous & Groenewald, 2011**). Autori navode da je ova gljiva veoma slična sa vrstom *D. neotheicola*, ali je ipak izdvojena kao posebna vrsta. Filogenetskom analizom sekvenci ITS i LSU regiona u ovom radu je utvrđeno da je vrsta *D. rhusicola* uvek grupisana sa vrstom *D. neotheicola*, tako da se sa sigurnošću može konstatovati da se radi o istoj vrsti.

Referentni izolat *D. viticola* CBS113201, poreklom sa vinove loze, poslužio je za identifikaciju izolata PS76. Kao domaćini ovog patogena u literaturi se navode vinova loza i biljka *Hydrangea macrophylla* (**Van Niekerk et al., 2005; Santos et al., 2010**), a ovo je prvi nalaz vrste *D. viticola* na semenu soje, pa se može konstatovati da soja predstavlja potencionalnu biljku domaćina ovom patogenu.

Za grupu izolata, koja je na osnovu ITS sekvence izolata ER1637 identifikovana kao vrsta *P. occulta*, pronađeno je nekoliko bliskih sekvenci sa 99% identiteta, i to: grupa *Phomopsis* sp. 4, *P. occulta* MAFF410330, *P. conorum* CBS587.79 i *P. oblonga* IMI366395. Slično je i sa grupom izolata, koja je identifikovana kao vrsta *D. conorum* CBS186.37, jer su pronađene još dve sekvence

sa 100% identičnosti, i to: grupa *Phomopsis* sp. 6 i vrsta *P. cotoneastri* CBS439.82. Pored vrste *D. conorum*, identifikovana je i sestrinska klada na osnovu referentnog izolata CBS109767 kao vrsta *D. eres*. Međutim, iako se ove tri grupe (*P. occulta*, *D. eres* i *D. conorum*) u ITS filogramu jasno odvajaju jedna od druge, u LSU i TEF<sub>1-α</sub> filogramu ove tri ITS populacije su predstavljene kao jedna filogenetska vrsta. Ovo ukazuje da ITS region brže evoluira u odnosu na druga dva regiona DNK, što je konstatovano i od strane drugih autora (**Riccioni & Haegi, 2008; Santos et al., 2010**). Takođe, literaturni podaci ukazuju na prisustvo dve različite ITS populacije poreklom iz iste peritecije (**Santos et al., 2010**). Autori navode da se ove dve populacije razlikuju samo u ITS sekvencama, dok sekvence MAT i TEF<sub>1-α</sub> lokusa sugerišu da se radi o istoj vrsti.

Nekoliko izolata, prethodno determinisanih na osnovu morfoloških karakteristika kao *P. longicolla*, identifikovano je na osnovu referentnog izolata CBS117165 kao grupa *Phomopsis* sp. 9. Referentni izolat je poreklom iz biljke *A. linearis*, ali s obzirom da je bio sterilan kada je deponovan u CBS kolekciju, nije mu dodeljen naziv, već je označen prema numerološkom klasifikacionom sistemu (**Janse van Rensburg et al., 2006**). Treba naglasiti da je neidentifikovana grupa *Phomopsis* sp. 9 prethodno bila poistovećivana sa izolatima poreklom iz Italije koji su determinisani kao vrsta *D. helianthi* (**Rekab et al., 2004; Van Niekerk et al., 2005**). Međutim, izolati PH1, PH2 i PH3, identifikovani na osnovu referentnog izolata CBS592.81 kao *D. helianthi*, predstavljaju posebnu filogenetsku vrstu, jer su u sva tri filograma (ITS, LSU, TEF<sub>1-α</sub>) jasno izdvojeni od klade identifikovane kao *Phomopsis* sp. 9.

## 7.2. Primena PCR-RFLP metode u detekciji i identifikaciji

Među prvim molekularnim tehnikama koje su primenjene u identifikaciji *Diaporthe/Phomopsis* vrsta spadaju RAPD markeri i PCR-RFLP tehnika. Na osnovu ovih metoda u okviru roda *Diaporthe/Phomopsis* opisane su dve vrste, *P. longicolla* i *D. phaseolorum*, s time da je vrsta *D. phaseolorum* podeljena na tri varijeteta: *D. phaseolorum* var. *sojae*, *D. phaseolorum* var. *caulivora* i *D. phaseolorum* var. *meridionalis* (**Fernández & Hanlin, 1996; Zhang et al., 1998; 1999; Riccioni et**

*al.*, 1998; 2003; 2005; Pioli *et al.*, 2003; Jaccoud Filho & Lee, 2004a; Costamilan *et al.*, 2008). Ustanovljeno je da *D. phaseolorum* var. *caulivora*, *D. phaseolorum* var. *meridionalis* i *P. longicolla* imaju specifične elektroforetske profile za razliku od *D. phaseolorum* var. *sojae*, koji je jako varijabilan i daje mnoštvo različitih profila (Fernández & Hanlin, 1996; Zhang *et al.*, 1998; Riccioni *et al.*, 2003; Riccioni & Vrandečić, 2007). Autori sugeriraju da je *P. longicolla* posebna vrsta, *D. phaseolorum* var. *meridionalis* i *D. phaseolorum* var. *caulivora* varijeteti unutar vrste *D. phaseolorum*, dok *D. phaseolorum* var. *sojae* predstavlja ili nekoliko varijeteta vrste *D. phaseolorum* ili nekoliko posebnih vrsta (Zhang *et al.*, 1998; Riccioni & Vrandečić, 2007). Za identifikaciju vrste *P. longicolla* i dva varijeteta vrste *D. phaseolorum* (*D. phaseolorum* var. *caulivora* i *D. phaseolorum* var. *sojae*) predloženi su molekularni profili dobijeni kombinacijom četiri restrikciona enzima: *AluI*, *RsaI*, *HhaI* i *MseI* (Riccioni *et al.*, 2003).

S obzirom da je u ovom radu sekvencioniran ITS region, na osnovu sekvenci sprovedena je simulativna digestija pomoću *AluI*, *RsaI*, *HhaI* i *MseI* restrikcionih enzima. Dobijeni profili su identični sa profilima koji su ranije determinisani, izuzev jednog. Umesto profila BAAC (Riccioni *et al.*, 2003), dobijen je profil BADC, koji je specifičan za vrstu *D. viticola*. Svi determinisani profili su specifični za svaku identifikovanu ITS vrstu, izuzev profila DABA, koji determiniše ITS populacije *D. eres* i *D. conorum*. Iz tog razloga u odabrani set je uveden i restrikcioni enzim *StyI*, koji jasno odvaja ove dve ITS populacije.

Na osnovu rezultata dobijenih u ovom istraživanju, PCR-RFLP tehnika sa setom restrikcionih enzima *AluI*, *RsaI*, *HhaI*, *MseI* i *StyI* ispoljava potencijal da bude korisna za brzu i pouzdanu identifikaciju sva tri varijeteta vrste *D. phaseolorum* (*D. phaseolorum* var. *meridionalis*, *D. phaseolorum* var. *caulivora*, *D. phaseolorum* var. *sojae*), zatim vrste *P. longicolla*, *Phomopsis* sp. 9, *D. neotheicola* i *D. viticola*, kao i ITS populacije *P. occulta*, *D. eres* i *D. conorum*.

### 7.3. Morfološki profil *Diaporthe/Phomopsis* vrsta

Proučavanjem morfoloških karakteristika identifikovanih ITS vrsta, utvrđeno je da se dimenzije konidija, piknida i peritecija nalaze u okviru dimenzija



koje su date od strane mnogih autora (Prilog 1, Prilog 2). Pored toga, utvrđeno je da se dimenzije reproduktivnih organa različitih vrsta preklapaju, ali i da veoma variraju između izolata unutar jedne vrste, kao i unutar samog izolata. To je u skladu sa prethodnim istraživanjima na osnovu kojih su autori konstatovali da dimenzije konidija nisu pouzdani pokazatelji pri identifikaciji *Diaporthe/Phomopsis* vrsta, zbog izražene varijabilnosti koja se javlja kako između izolata iste vrste, tako i unutar samog izolata (**Santos et al., 2010**). Iz tog razloga dimenzije piknida, peritecija i spora neće biti detaljno diskutovane. Međutim, na osnovu prisustva ili odsustva peritecija, piknida,  $\alpha$  i  $\beta$  konidija, donekle je moguće razlikovati *Diaporthe/Phomopsis* vrste koje se javljaju na soji.

Morfološkom analizom izolata sva tri varijeteta vrste *D. phaseolorum*, može se konstatovati da se *D. phaseolorum* var. *sojae* jasno razlikuje od *D. phaseolorum* var. *caulivora* i *D. phaseolorum* var. *meridionalis*. Micelija *D. phaseolorum* var. *sojae* je homotalausna, rastresita, srednje bujna i razvija se kružno, dok je micelija *D. phaseolorum* var. *caulivora* i *D. phaseolorum* var. *meridionalis* homotalusna, gusta i kompaktna. Prema ranijim podacima, micelija *D. phaseolorum* var. *sojae* je heterotalusna (**Welch & Gilman, 1948**), međutim rezultati ovih istraživanja su pokazala suprotno, što je u saglasnosti sa novijim istraživanjima (**Santos et al., 2011**). Kolonija *D. phaseolorum* var. *caulivora* se razvija zrakasto, dok se kod *D. phaseolorum* var. *meridionalis* razvija ravnomerno po celoj površini Petri kutije. Osnovna razlika između ova tri varijeteta je to što *D. phaseolorum* var. *sojae* u okviru stroma uvek formira piknidijske konidiomate sa  $\alpha$  i  $\beta$  konidijama, dok druga dva varijeteta samo ponekad obrazuju pojedinačne piknide samo sa  $\alpha$  konidijama. Navedene morfološke karakteristike su u saglasnosti sa prethodnim istraživanjima (**Hobbs et al., 1985; Vidić, 1987; Jaccoud-Filho & Lee, 2004a; Janse van Rensburg et al., 2006**). Međutim, u literaturi se navodi da se iz piknida *D. phaseolorum* var. *caulivora* oslobađaju i  $\beta$  konidije (**Fernández & Hanlin, 1996**). U ovom istraživanju proučeno je ukupno 51 izolat *D. phaseolorum* var. *caulivora*, s time da je samo devet izolata formiralo piknidijski stadijum, ali ni kod jednog nisu konstatovane  $\beta$  konidije. Međutim, kod izolata DPC/KR21 uočene su gama konidije, koje liče na  $\beta$  konidije, ali su znatno šire i nisu zakrivljene.

U literaturi se navodi da je *D. phaseolorum* var. *sojae* varijabilan u pogledu formiranja peritecija, odnosno uočeno je da samo mali broj izolata formira savršeni stadijum (Vidić *et al.*, 1996; Fernández & Hanlin, 1996; Medić-Pap, 2006). Međutim, u ovom istraživanju svi ispitivani izolati, identifikovani pomoću ITS sekvenci kao *D. phaseolorum* var. *sojae*, uvek su formirali peritecije. Za *D. phaseolorum* var. *caulivora* i *D. phaseolorum* var. *meridionalis* karakteristično je da peritecije formira u grupama, dok *D. phaseolorum* var. *sojae* peritecije najčešće obrazuje pojedinačno, što je u saglasnosti sa prethodnim istraživanjima (Fernández & Hanlin, 1996; Pioli *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2011). S obzirom da su prisutne bitne razlike u morfološkim karakteristikama između *D. phaseolorum* var. *sojae* i druga dva varijeteta, to pruža dovoljno osnova za izdvajanje *D. phaseolorum* var. *sojae* u posebnu vrstu. Druga dva varijeteta *D. phaseolorum* var. *caulivora* i *D. phaseolorum* var. *meridionalis* predstavljaju "prave" varijetete vrste *D. phaseolorum*, što je u skladu i sa rezultatima molekularnih istraživanja. U literaturi se navodi da su *D. phaseolorum* var. *caulivora* i *D. phaseolorum* var. *meridionalis* simptomatološki i morfološki slični i da su usled prostorne izolacije taksonomski kategorizovani kao varijeteti vrste *D. phaseolorum* (Fernández & Hanlin, 1996; Zhang *et al.*, 1998; Pioli *et al.*, 2001; 2003).

Izolati identifikovani na osnovu ITS sekvenci kao *D. phaseolorum* var. *sojae*, *P. occulta*, *D. eres* i *D. conorum* morfološki su jako slični. Micelija je kod svih izolata rastresita i srednje bujna. Kod vrsta *P. occulta*, *D. conorum* i *D. phaseolorum* var. *sojae*, kolonija se razvija kružno, a kod vrste *D. eres* zrakasto. Kod sve četiri grupe izolata, gljiva obrazuje sitne okrugle stromatične tvorevine u okviru kojih se formiraju piknidijske konidiomate sa  $\alpha$  i  $\beta$  konidijama. Glavna razlika između *D. phaseolorum* var. *sojae* i ostalih grupa je što monosporni izolati *D. phaseolorum* var. *sojae* uvek formiraju peritecije, dok druge tri grupe izolata ne obrazuju teleomorfni stadijum. To znači da je micelija izolata *P. occulta*, *D. eres* i *D. conorum* heterotalusna, što je u skladu sa prethodnim istraživanjima (Anagnostakis, 2007; Santos *et al.*, 2010). Takođe, bitna činjenica je da su izvorni (MAS) izolati PS36, PS41 i PS49, identifikovani kao *D. eres*, u momentu izolacije takođe formirali peritecije, međutim nakon izdvajanja monospornog izolata formiranje peritecija je izostalo. To potvrđuje konstataciju da su ovi izolati heterotalusni, odnosno za

obrazovanje peritecija neophodno je dođe do ukrštanja kompatibilnih izolata. Publikovano je nekoliko radova u kojima se navodi da polnu reprodukciju kod gljiva reguliše MAT lokus i da samo gljive sa različitim MAT lokusom mogu formirati polni stadijum (**Dyer et al., 1992; Turgeon, 1998; Pöggeler, 2001; Santos et al., 2010; 2011**).

*D. phaseolorum* var. *sojae* se jasno razlikuje od vrsta *P. occulta*, *D. eres* i *D. conorum* na osnovu sposobnosti da formira peritecija, međutim ove tri grupe izolata morfološki se međusobno ne razlikuju. Takođe, u LSU i TEF<sub>1</sub>- $\alpha$  filogeniji ove ITS populacije su predstavljene kao jedna filogenetska vrsta, a do sličnih rezultata su došli i drugi autori (**Riccioni & Haegi, 2008; Santos et al., 2010**).

Morfološke razlike između *D. phaseolorum* var. *sojae* i izolata PS22 i PS48 identifikovanih kao *D. neotheicola* nisu mogle biti utvrđene, jer su ova dva izolata dugo čuvana na kosom agaru, pa su izgubila mogućnost fruktifikacije. Međutim, zapažena je očigledna razlika u izgledu kolonije. Kolonija *D. phaseolorum* var. *sojae* je bela, rastresita, srednje bujna i razvija se kružno, dok je kod vrste *D. neotheicola* bele boje, gusta i bujna, a starenjem supstratna micelija boji podlogu u žuto-mrku do tamno-braon boju. Prema podacima, koji su evidentirani odmah nakon izolovanja, zapaženo je da i *D. neotheicola* formira piknide sa  $\alpha$  i  $\beta$  konidijama kao i *D. phaseolorum* var. *sojae*, ali samo *D. phaseolorum* var. *sojae* obrazuje peritecije. U literaturi se navodi da *D. neotheicola* formira piknide, koji oslobađaju  $\alpha$  i  $\beta$  konidije, dok se peritecije obrazuju samo u slučaju ukrštanja dva kompatibilna izolata, što znači da je micelija heterotalusna (**Santos & Phillips, 2009; Santos et al., 2010**).

Izolat PS76 identifikovan kao *D. viticola* formirao je samo piknide sa  $\alpha$  konidijama na podlozi od sterilizovanih stabla soje, dok se peritecije nisu obrazovale. Prema literaturnim podacima gljiva može da formira i piknide sa  $\beta$  konidijama (**Mostert et al., 2001**). Micelija je homotalusna (**Santos et al., 2010**), a za formiranje peritecija neophodni su specifični uslovi, inkubacija dva meseca na temperaturi od 10°C ispod bliskog-UV svetla (**Van Niekerk et al., 2005**).

Vrsta *P. longicolla* se razlikuje od ostalih *Diaporthe/Phomopsis* vrsta na osnovu izgleda kolonije i makroskopskih i mikroskopskih karakteristika. Ova gljiva ima gustu i bujnu miceliju, a oko centra se formira žuto-zeleni oreol, koji se vremenom može proširiti po celoj površini Petri kutije. Obrazuje masovne strome

u okviru kojih se formiraju piknidi sa jako dugim vratovima iz kojih se luče samo  $\alpha$  konidije. Međutim, kod izolata PDS157A, PDS157B, PDS157C i PDS78 dobijenih iz prizemnog dela stabla uočine su i  $\beta$  konidije. Tokom ovog istraživanja nijedan izolat vrste *P. longicolla* nije formirao peritecije. Sve navedene morfološke karakteristike se podudaraju sa rezultatima istraživanja, koja su se bavila detaljnim ispitivanjem vrste *P. longicolla* (Hobbs *et al.*, 1985; Vidić *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1998; Medić-Pap, 2006; Cui *et al.*, 2009; Walcott, 2010). U literaturi se navodi da *P. longicolla* ima oba tipa MAT lokusa, pa je na osnovu toga uveden naziv teleomorfog stadijuma kao *Diaporthe longicolla* (Santos *et al.*, 2011). Međutim, autori navode da gljiva ne formira peritecije.

Na osnovu ITS sekvenci iz grupe izolata, koji su prethodno determinisani kao *P. longicolla*, izdvojena je neidentifikovana grupa *Phomopsis* sp. 9. Za ovu grupu je karakteristično da sveže izolovana gljiva jako liči na vrstu *P. longicolla*, odnosno obrazuje bujnu belu miceliju sa žuto-zelenim oreolom, kao i krupne strome u okviru kojih se formiraju piknidijske konidiomate iz kojih se oslobađaju  $\alpha$  konidije, a retko se mogu uočiti i  $\beta$  konidije. Kao i vrsta *P. longicolla*, grupa *Phomopsis* sp. 9 ne formira peritecije. Glavna razlika između ove dve vrste je što izolati grupe *Phomopsis* sp. 9 vrlo brzo postaju sterilni. Tokom razvoja kolonije, od centra ka periferiji Petri kutije, micelija se ne vidi (prazan prostor), dok je na krajevima izuzetno bujna, a formiranje stroma i piknida izostaje. Referentni izolat je takođe bio sterilan kada je deponovan u CBS kolekciju, pa mu nije dodeljen naziv, već je označen prema numerološkom klasifikacionom sistemu kao *Phomopsis* sp. 9 (Janse van Rensburg *et al.*, 2006). Kasnije je predložen formalni naziv *Diaporthe novem* (Santos *et al.*, 2011), a autori naglašavaju da je gljiva heterotalusna i da se fertilne peritecije formiraju samo ako dođe do ukrštanja dva izolata sa različitim MAT lokusima. U ranijim istraživanjima, *Phomopsis* sp. 9 je poistovećivan sa vrstom *D. helianthi* (Rekab *et al.*, 2004; Van Niekerk *et al.*, 2005), međutim, između ove dve vrste, osim očigledne filogenetske udaljenosti, postoje i morfološke razlike. Izolati vrste *D. helianthi* na hranljivim podlogama formiraju sitne pojedinačne piknide isključivo sa  $\beta$  konidijama, dok *Phomopsis* sp. 9 formira piknidijske konidiomate sa  $\alpha$  konidijama, a retko se mogu uočiti i  $\beta$  konidije.

#### 7.4. Patogenost *Diaporthe/Phomopsis* vrsta

Tačna identifikacija i karakterizacija gljiva je prvi i osnovni korak ka smislenom proučavanju patogenosti i epidemiologije. Dosadašnja istraživanja bavila su se ispitivanjem patogenosti poznatih parazita soje, odnosno vrsta *P. longicolla*, *D. phaseolorum* var. *meridionalis*, *D. phaseolorum* var. *caulivora* i *D. phaseolorum* var. *sojae*. Međutim, tokom ovog istraživanja na soji su otkrivene nove vrste, tako da literaturni podaci o njihovoj patogenosti na soji ne postoje.

Metodom glavnih komponenata jasno su grupisani izolati prema stepenu patogenosti na biljkama i semenu soje. Kao najpatogeniji izdvojeni su *P. longicolla* (PL157A), *Phomopsis* sp. 9 (PL68 i PL75), *D. phaseolorum* var. *caulivora* (DPC/KR15 i DPC/KR21) i *D. phaseolorum* var. *sojae* (PS63 i PS73). Da su vrste *P. longicolla*, *D. phaseolorum* var. *sojae* i *D. phaseolorum* var. *caulivora* patogene na biljkama i semenu soje, pokazuju i rezultati istraživanja mnogih autora (**Kmetz et al., 1978; Vidić, 1987; Vidić et al., 1995; 1998; 2002; Riccioni et al., 2003; Duvnjak, 2004; Medić-Pap, 2006; Mengistu, 2007; Costamilan, 2008**). U literaturi se navodi da je najčešći i najpatogeniji prouzročivač truleži semena vrsta *P. longicolla* (**Hartman et al., 1999; Vidić et al., 1998; 2002; Riccioni et al., 2003; Petrović & Vidić, 2010; Vidić et al., 2011**). Međutim, konstatovano je da je trulež semena primarno prouzrokovana ovom vrstom, ali da i druge *Diaporthe/Phomopsis* vrste mogu biti uključene u ovaj proces (**Hartman et al., 1999**). O patogenosti vrste *Phomopsis* sp. 9 na soji ne postoje literaturni podaci, međutim na osnovu rezultata ovog istraživanja sa sigurnošću se može reći da je *Phomopsis* sp. 9 patogen kako na biljkama, tako i na semenu soje.

Slabiju patogenost ispoljio je izolat PS74 (*D. eres*), dok vrste *P. occulta* (PS26 i PS51), *D. conorum* (PS57) i *D. helianthi* (PH1) nisu izazvale patološke promene na biljkama i semenu soje. Izolati PS65 (*D. eres*) i PS76 (*D. viticola*) pokazali su da mogu biti patogeni samo na semenu, dok je vrsta *D. phaseolorum* var. *meridionalis* (Dpm 1F) ispoljila visok stepen patogenosti samo na biljkama soje. Literaturni podaci ukazuju da je *D. phaseolorum* var. *meridionalis* patogen kako na biljkama, tako i na semenu soje (**Pioli et al., 1999; 2001; 2003; Jaccoud-Filho & Lee, 2004a; 2004b**). Međutim, treba naglasiti da je izolat Dpm 1F star više od 20

godina i najverovatnije je usled dugog čuvanja na kosom agaru izgubio virulentnost.

Uočene su razlike u patogenosti između izolata iste vrste, što je u skladu sa rezultatima proučavanja, koja su se bavila ispitivanjem patogenosti vrsta *P. longicolla* i *D. phaseolorum* var. *sojae* (Vidić et al., 1995). Autori navode da postoji značajna varijabilnost u patogenosti izolata, što je naročito izraženo u okviru vrste *D. phaseolorum* var. *sojae*. Interesantno je da se izolat PS73, identifikovan kao *D. phaseolorum* var. *sojae*, s molekularne tačke gledišta razlikuje u odnosu na sve druge izolate iste vrste. Ovaj izolat se u ITS regionu razlikuje u samo jednom nukleotidu od ostalih izolata i pokazao se kao najpatogeniji u svim ogledima koji su sprovedeni u cilju određivanja stepena patogenosti. Slična zapažanja su uočena i kod izolata PS22 i PS48, koji su identifikovani kao *D. neotheicola*. Izolat PS22 ispoljio je visok stepen patogenosti na biljkama i nešto manju patogenost na semenu soje, dok izolat PS48 nije patogen. Oba izolata su usled dugog čuvanja na kosom agaru izgubila mogućnost fruktifikacije, pa je bilo nemoguće proveriti njihovu patogenost u ogledima sa sporama. Takođe, varijabilnost u patogenosti pokazala je i ITS populacija *D. eres*. Uočeno je da izolat PS74 može biti patogen i na biljkama i na semenu soje, dok je izolat PS65 patogenost ispoljio samo na semenu. Upravo zbog izražene varijabilnosti između izolata iste vrste, neophodno je u istraživanja uključiti što veći broj izolata. Takođe, sve *Diaporthe/Phomopsis* vrste su sklone promenama pri dužem čuvanju na kosom agaru i često postaju sterilne. Iz tog razloga, u ispitivanjima patogenosti trebalo bi, pored većeg broja izolata, koristiti sveže izolate.

U literaturi se navodi da problem u radu sa vrstama roda *Diaporthe/Phomopsis* predstavlja nemogućnost izazivanja simptoma bolesti primenom veštačkih inokulacija sporama (Frosheiser, 1957). Međutim, unošenjem spora vrste *P. longicolla*, *D. phaseolorum* var. *caulivora*, *D. phaseolorum* var. *sojae* i *Phomopsis* sp. 9 u povrede načinjene u pazuhu lisnih drški, uspešno su reprodukovani simptomi bolesti, što potvrđuje prethodna istraživanja (Vidić, 1987).

U ovom radu, pri ispitivanju patogenosti *Diaporthe/Phomopsis* vrsta na semenu soje, kao inokulum u prvom ogledu je korišćena suspenzija micelije, a u

drugom suspenzija spora. Poređenjem rezultata ova dva testa, uočena je visoka pozitivna korelacija ( $r = 0,98$ ), što znači da je broj trulih zrna u ogledu sa micelijom ekvivalentan broju trulih zrna u ogledu sa sporama. Ovo je od praktičnog značaja, jer je ogled sa micelijom mnogo lakše sprovesti u odnosu na ogled sa sporama.

### 7.5. Taksonomija *Diaporthe/Phomopsis* vrsta

Gljive su posebna grupa organizama čija taksonomija i sistematika predstavlja velik izazov savremenoj nauci. Prve taksonomske podele su se bazirale na morfološkom konceptu vrste, odnosno na uočavanju fenotipskih razlika između vrsta. Važnost makroskopskih i mikroskopskih taksonomskih karaktera nije ni danas zanemarena i predstavlja ključni faktor pri razlikovanju taksona višeg ranga. Međutim, najzastupljeniji je biološki koncept, koji vrstu definiše kao grupu prirodnih populacija koje se međusobno ukrštaju, daju fertilno potomstvo i reproduktivno su izolovane od drugih vrsta. Nedostatak ovog koncepta je to što nije primenljiv kod organizama koji se razmnožavaju bespolnim putem (**Taylor et al., 2000**). Gljive sa potpunim ciklusom razvića (holomorfi) imaju bespolnu (anamorfnu) i polnu (teleomorfnu) fazu. Ove dve faze se morfološki razlikuju i iz tog razloga imaju različite binominalne nazive. Problem sistematike se javlja u činjenici da postoji veliki broj gljiva koje nemaju ili im nije otkrivena polna faza života, te se sistematika morala oslanjati na striktno morfološke podatke, dok nisu otkrivene molekularne metode. Zajedno sa razvojem molekularnih metoda identifikacije, razvijen je i filogenetski koncept, koji vrstu definiše kao monofiletičku grupu organizama sa bar jednim unikatnim karakterom nasleđenim od zajedničkog pretka (**Taylor et al., 2000**). Sa taksonomskog aspekta napravljen je kompromis da naknadnim otkrićem veze između anamorfa i teleomorfa jedne vrste, ovi razvojni stadijumi zadrže latinske binomene. Međutim, prema novom kodeksu klasifikacije (ICN), koji stupa na snagu 01. januara 2013. godine, uvedeno je da se gljive koje imaju anamorfni i teleomorfni stadijum označavaju jednim imenom (**McNeill et al., 2011**). Zato su u ovom radu predložene taksonomske promene date u skladu sa konceptom "jedna gljiva - jedno ime".

Klasifikacija predložena 1996. godine i koja je usvojena od strane većine autora, predstavnike roda *Diaporthe/Phomopsis*, prouzrokovao je kompleksa oboljenja na soji, deli na dve vrste: *Phomopsis longicolla* Hobbs (teleomorf nepoznat) i *Diaporthe phaseolorum* (Cook & Ellis) Sacc. (anamorf *Phomopsis phaseoli* (Desmaz.) Sacc.), s tim da vrstu *D. phaseolorum* čine tri varijeteta: *D. phaseolorum* var. *sojae* (Lehman) Wehmeyer, *D. phaseolorum* var. *caulivora* Athow & Caldwell i *D. phaseolorum* var. *meridionalis* Fernández (**Fernández & Hanlin, 1996**).

Poređenjem molekularnih, morfoloških i patogenih karakteristika sa sigurnošću se može reći da su pored poznatih patogena, na soji prisutne i druge vrste roda *Diaporthe/Phomopsis*. Na osnovu ITS sekvenci identifikovane su sledeće vrste: *D. phaseolorum* (*D. phaseolorum* var. *caulivora*, *D. phaseolorum* var. *meridionalis* i *D. phaseolorum* var. *sojae*), *P. longicolla*, *D. viticola*, *D. neotheicola*, *P. occulta*, *D. eres*, *D. conorum* i neidentifikovana grupa *Phomopsis* sp. 9. Sve navedene vrste su detektovane na soji u Srbiji, izuzev *D. phaseolorum* var. *meridionalis*.

Molekularne i morfološke karakteristike varijeteta vrste *D. phaseolorum*, ukazuju da je *D. phaseolorum* var. *sojae* posebna vrsta, dok su *D. phaseolorum* var. *caulivora* i *D. phaseolorum* var. *meridionalis* "pravi" varijeteti vrste *D. phaseolorum*. Između ova tri varijeteta postoji očigledna morfološka razlika u anamorfu, jer *D. phaseolorum* var. *caulivora* i *D. phaseolorum* var. *meridionalis* formiraju piknide samo sa  $\alpha$  konidijama, dok *D. phaseolorum* var. *sojae* uvek obrazuje piknidijske konidiate sa  $\alpha$  i  $\beta$  konidijama. Logičan predlog je da se *D. phaseolorum* var. *sojae* izdvoji u posebnu vrstu pod nazivom *Diaporthe sojae*, što je svojevremeno predlagano (**Lehman, 1923**). Međutim, prema drugim autorima *D. phaseolorum* var. *sojae* treba preimenovati u *D. phaseolorum* (**Santos et al., 2011**). Isti autori su za *D. phaseolorum* var. *caulivora* predložili naziv *D. caulivora*, dok za *D. phaseolorum* var. *meridionalis* sugerišu naziv *D. aspalathi* (**Janse van Rensburg et al., 2006; Santos et al., 2011**). U ovom istraživanju metodom agaroznog isečka utvrđen je visok stepen patogenosti *D. phaseolorum* var. *caulivora* i *D. phaseolorum* var. *meridionalis* na biljkama soje. S druge strane, usled simptomatološke i morfološke sličnosti, kao i filogenetske bliskosti, nema osnova da se ovim ekonomski značajnim parazitima menjaju nazivi. Treba naglasiti da je



naziv *D. aspalathi* uveden samo iz razloga što je *D. phaseolorum* var. *meridionalis* izolovan iz biljke *Aspalathus linearis* (Janse van Rensburg et al., 2006). Ranije je već rečeno da problem u taksonomiji predstavlja što pojedini autori, kada po prvi put utvrde prisustvo neke od *Diaporthe/Phomopsis* vrsta na novoj biljci domaćinu, smatraju da je prouzročivač nova vrsta i automatski daju nov naziv. Tako je *D. phaseolorum* var. *sojae* izolovan iz tri različita domaćina (*Cucumis melo*, *Camptotheca acuminata* i *Helianthus annuus*) opisan pod tri različita naziva, i to: *D. melonis* var. *brevistylospora*, *P. camptothecae* i *D. kochmanii*. Ovakav način klasifikacije samo unosi bespotrebnu konfuziju u taksonomiju roda *Diaporthe/Phomopsis*. Gljive ovog roda koloniziraju različite zeljaste i drvenaste biljne vrste, ali samo na nekim prouzrokuju patološke promene. Za *D. phaseolorum* var. *sojae* je poznato da ima izuzetno širok spektar domaćina, ali samo na biljkama i semenu soje prouzrokuje značajne štete. Upravo iz tog razloga, ovaj patogen treba da ostane prepoznatljiv po basionimu *D. sojae*. Predlog da se *D. phaseolorum* var. *sojae* preklasifikuje u *D. phaseolorum* uvešće još samo dodatne nejasnoće u taksonomiju ove već kompleksne vrste. S obzirom da je vrsta *D. phaseolorum* prema važećoj i opšte prihvaćenoj klasifikaciji podeljena na pet varijeteta (*D. phaseolorum* var. *caulivora*, *D. phaseolorum* var. *meridionalis*, *D. phaseolorum* var. *sojae*, *D. phaseolorum* var. *phaseolorum* i *D. phaseolorum* var. *batatatis*), identifikacija gljive kao *D. phaseolorum* bez preciziranja varijeteta, može se smatrati nepotpunom.

Iz *D. phaseolorum* var. *sojae* izdvojene su tri grupe izolata koje su na osnovu ITS sekvenci identifikovane kao *P. occulta*, *D. eres* i *D. conorum*. Međutim, na osnovu LSU i TEF<sub>1</sub>- $\alpha$  filogenije, kao i morfoloških karakteristika, uočeno je da su ove tri ITS populacije identične, odnosno da predstavljaju istu vrstu. Proučavanjem etiologije vrste *D. eres*, došlo se do zaključka da se sve tri ITS populacije mogu identifikovati kao grupa *D. eres*. U čuvenoj publikaciji iz 1933. godine "The genus *Diaporthe* Nitschke and its segregates", po prvi put je napravljena značajna taksonomska revizija roda *Diaporthe* (Wehmeyer, 1933). Autor naglašava da *D. eres* predstavlja izuzetno veliku grupu vrsta, koja ima širok spektar domaćina, izrazito su varijabilni, ali morfološki jako slični. Oko 140 različitih naziva roda *Diaporthe* podvedeno je pod vrstu *D. eres* i danas se svi ti nazivi koriste kao

sinonimi ove vrste. Iz biljke *Ulmi campestris* prvo je izolovan anamorf *Phoma oblonga* (**Desmazières, 1853**), a nekoliko godina kasnije otkriven je i teleomorf gljive, koji je opisan pod nazivom *D. eres* (**Nitschke, 1870**). Iz iste biljke domaćina naknadno je izolovana i determinisana gljiva *Phoma eres* (**Saccardo, 1879**). Upoređujući vrste *P. oblonga* i *P. eres*, autor je došao do zaključka da je u pitanju ista vrsta. Kasnije su obe gljive preklasifikovane u rod *Phomopsis* (**Von Höhnel, 1906; Grove, 1918**), ali s obzirom da je naziv *P. oblonga* prvi uveden u taksonomiju, onda je i zadržan kao zvanični naziv anamorfnog stadijuma vrste *D. eres*. Međutim, pošto postoji jako puno sinonima, kako teleomorfa, tako i anamorfa, autori su u literaturi upotrebljavali različite nazive, što je uvelo veliku konfuziju u taksonomiju ove vrste. Zbog toga je 1973. godine dat pregled svih sinonima i predlog da teleomorfni stadijum bude označen kao *D. eres*, a anamorfni kao *Phomopsis* spp. (**Boerema & Verhoeven, 1973**). Kao sinonimi vrste *D. eres* navode se *D. conorum* i *D. occulta*, a za anamorfni stadijum *Phomopsis* spp. sinonimi su: *P. oblonga*, *P. eres*, *P. conorum* i *P. occulta* (navedeni su samo sinonimi koji su od značaja za tumačenje rezultata ovog istraživanja).

Na osnovu svega navedenog, može se konstatovati da ITS grupe *P. occulta*, *D. eres* i *D. conorum* predstavljaju jednu vrstu, odnosno tri različite populacije u okviru izrazito varijabilne grupe *D. eres*. Važno je naglasiti da je uočen različit stepen patogenosti između ovih populacija. Vrste *P. occulta* i *D. conorum* nisu ispoljile patogenost na soji, dok populacija identifikovana kao *D. eres* može biti patogena na semenu soje. U Italiji su na semenu soje detektovane ITS populacije *P. occulta* i *D. conorum* (**Riccioni & Haegi, 2008**), dok je ITS populacija *D. eres* po prvi put konstatovana na semenu soje u Srbiji.

Takođe, iz *D. phaseolorum* var. *sojae* su izdvojena dva izolata (PS22 i PS48) koji su identifikovani kao *D. neotheicola*. U literaturi se navodi da je ova vrsta heterotalusna, odnosno utvrđeno je da samo ukrštanjem izolata sa različitim MAT lokusom dolazi do obrazovanja peritecija (**Santos & Phillips, 2009; Santos et al., 2010**). S obzirom da je konstatovan teleomorf, prema konceptu "jedna gljiva - jedno ime" za ovu vrstu treba usvojiti naziv *D. neotheicola*, koji je predložen 2009. godine (**Santos & Phillips, 2009**).

Vrsta *P. longicolla* se na osnovu morfoloških, molekularnih i patogenih karakteristika razlikuje od ostalih pripadnika roda *Diaporthe/Phomopsis*. Kod ove gljive do sada nisu konstatovane peritecije. Međutim, prema literaturnim podacima ova vrsta ima oba tipa MAT lokusa, pa je uveden naziv za savršeni stadijum - *D. longicolla* (Santos *et al.*, 2011). S obzirom da kod ove gljive još uvek nisu konstatovane peritecije, uvođenje naziva *D. longicolla* je preuranjeno, jer nije ispravno uvoditi nova taksonomska imena na osnovu samo jednog parametra, u ovom slučaju MAT lokusa. Isti autori navode da je kod vrste *D. phaseolorum* var. *caulivora* detektovan samo jedan tip MAT lokusa (Santos *et al.*, 2011), iako je gljiva homotalusna, što podrazumeva da ima oba tipa MAT gena.

Iz grupe izolata, koji su prethodno determinisani kao *P. longicolla*, izdvojeni su izolati PL42, PL44, PL/KR6, PL68 i PL75, koji su na osnovu ITS sekvenci identifikovani kao *Phomopsis* sp. 9. S obzirom da je referentni izolat bio sterilan kada je deponovan u CBS kolekciju, nije mu dodeljen naziv, već je označen prema numerološkom klasifikacionom sistemu (Janse van Rensburg *et al.*, 2006). Kasnije je predložen formalni naziv *D. novem* (Santos *et al.*, 2011), međutim time ništa nije promenjeno, jer "novem" na latinskom jeziku označava broj devet. Numerološki klasifikacioni sistem nije validan, jer predstavlja prelazno rešenje prilikom identifikacije nekog organizma. Upravo iz tog razloga, naziv *D. novem* se ne može smatrati ispravnim, jer po tom sistemu sve *Diaporthe/Phomopsis* spp. vrste mogu se označiti na taj način (npr. *Diaporthe duo*, *D. tres* itd.), što nije u skladu sa kodeksom klasifikacije ([www.ibot.sav.sk/icbn/main.htm](http://www.ibot.sav.sk/icbn/main.htm), Art. 23.6). S obzirom da postoji izražena sličnost između izolata vrste *P. longicolla* i *Phomopsis* sp. 9 u morfološkim karakteristikama i stepenu patogenosti, smatra se da je za neidentifikovanu grupu *Phomopsis* sp. 9 najprikladniji naziv *Phomopsis pseudolongicolla*. Tokom istraživanja ova gljiva nije formirala savršeni stadijum. Međutim, u literaturi se navodi da je gljiva heterotalusna i da se fertilne peritecije formiraju samo ako dođe do ukrštanja dva izolata sa različitim MAT lokusom (Santos *et al.*, 2011). S obzirom da je utvrđen teleomorfni stadijum, za vrstu *Phomopsis* sp. 9 predlaže se naziv *Diaporthe pseudolongicolla*, nom. nov., K. Petrović, V. Đorđević, M. Vidić & L. Riccioni. Naziv je deponovan u MycoBank bazu podataka pod evidencionim brojem MB564245.

## 8. ZAKLJUČAK

- ◆ Poređenjem molekularnih, morfoloških i patogenih karakteristika može se zaključiti da su u okviru roda *Diaporthe/Phomopsis* na semenu soje u Srbiji prisutne sledeće vrste: *D. phaseolorum* var. *caulivora*, *D. phaseolorum* var. *sojae*, *P. longicolla*, *D. neotheicola*, *D. eres* i *D. viticola*, kao i neidentifikovana grupa *Phomopsis* sp. 9.
- ◆ U okviru vrste *D. phaseolorum* razlikuju se dva varijeteta: *D. phaseolorum* var. *caulivora* i *D. phaseolorum* var. *meridionalis*, dok *D. phaseolorum* var. *sojae* predstavlja posebnu vrstu. Zato je predloženo da se *D. phaseolorum* var. *sojae* preklasifikuje u basionim *D. sojae*.
- ◆ Na osnovu molekularnih i morfoloških karakteristika iz vrste *D. sojae* izdvojene su tri grupe izolata identifikovane na osnovu ITS sekvenci kao *P. occulta*, *D. eres* i *D. conorum*. Međutim, analizom LSU i TEF<sub>1</sub>- $\alpha$  gena, kao i morfoloških karakteristika, uočeno je da su ove tri ITS populacije identične, odnosno da predstavljaju jednu vrstu. Etiologija vrste *D. eres* ukazuje da sve tri ITS populacije pripadaju izrazito varijabilnoj grupi *D. eres*.
- ◆ Iz grupe izolata, koji su prethodno determinisani kao *P. longicolla*, izdvojeno je nekoliko izolata, koji su na osnovu sekvenci ITS i TEF<sub>1</sub>- $\alpha$  regiona identifikovani kao *Phomopsis* sp. 9. Sekvence LSU regiona takođe ukazuju da se radi o posebnoj filogenetskoj vrsti. S obzirom da postoji izražena sličnost, u pogledu morfoloških i patogenih karakteristika, između vrsta *P. longicolla* i *Phomopsis* sp. 9, za neidentifikovanu grupu *Phomopsis* sp. 9 predložen je taksonomski naziv *D. pseudolongicolla* nom. nov.
- ◆ Iz semena soje izolovane su i vrste *D. viticola* i *D. neotheicola*. Vrsta *D. viticola* se na osnovu izgleda kolonije jasno razlikuje od ostalih pripadnika roda *Diaporthe/Phomopsis* izolovanih iz soje, dok morfološki profil za vrstu *D. neotheicola* nije utvrđen, jer su ispitivani izolati sterilni.

- ◆ Utvrđeno je da sve proučavane vrste mogu da završe životni ciklus na biljkama soje, što ukazuje da je soja izuzetno pogodna biljka domaćin za *Diaporthe/Phomopsis* vrste. Takođe, *D. viticola* i *D. eres* su prvi put detektovane na semenu soje u svetu i kod nas, pa je time proširen spektar domaćina za ove dve vrste.
- ◆ Vrste *D. phaseolorum* var. *caulivora*, *D. sojae*, *P. longicolla* i *D. pseudolongicolla* su izuzetno patogene kako na biljkama, tako i na semenu soje, dok su *D. viticola* i *D. eres* patogene samo na semenu. Za razliku od ITS populacije *D. eres*, druge dve populacije *P. occulta* i *D. conorum* nisu ispoljile patogenost, pa se može zaključiti da su na semenu soje prisutne kao saprofiti. Međutim, postoji mogućnost da ovi saprofiti pri određenim uslovima prouzrokuju trulež semena ili umanje semenski kvalitet (klijanje i energiju klijanja). O patogenosti vrste *D. neotheicola* ne mogu se izvoditi konačni zaključci, jer nedostaju podaci pri veštačkim inokulacijama suspenzijom spora.
- ◆ Pri određivanju zdravstvenog stanja semena soje neophodno je utvrditi koje su *Diaporthe/Phomopsis* vrste prisutne i u kom procentu. Dozvoljen procenat zaraženog semena gljivama roda *Diaporthe/Phomopsis* u Srbiji je 10%, ali je bitno utvrditi u kom procentu je seme zaraženo patogenim, odnosno saprofitnim vrstama. U cilju iznalaženja bržeg načina detekcije i identifikacije, ITS sekvence proučavanih *Diaporthe/Phomopsis* vrsta poslužile su za virtuelnu digestiju restrikcionim enzimima *AluI*, *RsaI*, *HhaI*, *MseI* i *StyI*. S obzirom da su za svaku vrstu dobijeni različiti molekularni profili, konstatovano je da PCR-RFLP tehnika potencijalno može biti korisna metoda za brzu i pouzdanu identifikaciju *Diaporthe/Phomopsis* vrsta koje se javljaju na soji.
- ◆ Najpouzdanija metoda identifikacije *Diaporthe/Phomopsis* vrsta je sekvencioniranje. U dijagnostičkim postupcima dovoljno je koristiti ITS sekvence, međutim za filogenetske analize, neophodno je koristiti sekvence različitih gena, koji će pružiti sveobuhvatnu procenu evolucije.

## 9. LITERATURA

**Ainsworth, G. C., Bisby, G. R. (1971):** Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi, 6<sup>th</sup> edition. Farnham Royal, Commonwealth Agricultural Bureaux [for the] Commonwealth Mycological Institute.

**Anagnostakis, S. L. (2007):** *Diaporthe eres* (*Phomopsis oblonga*) as a pathogen of butternut (*Juglans cinerea*) in Connecticut. *Disease Notes*, 91 (9): 1198.

**Asante, S. N. A., Wolffhechel, H. (1998):** First report of *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* on soybean seeds from Ghana. *Plant Disease*, 82: 1401.

**Athow, K. L., Caldwell, R. M. (1954):** A comparative study of *Diaporthe* stem canker and pod and stem blight of soybean. *Phytopathology*, 44: 319-325.

**Backman, P. A., Weaver, D. B., Morgan-Jones, G. (1985):** Soybean stem canker: an emerging disease problem. *Plant Disease*, 69: 641-647.

**Berbee, L. M., Taylor, W. J. (2001):** Fungal molecular evolution: gene trees and geologic time. The *Mycota*: a comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research. Volume VII: Systematics and Evolution, Part B, pp. 229-245. (published in 2000, labeled 2001 by Springer)

**Black, B. D., Padgett, G. B., Russin, J. S., Griffin, J. L., Snow, J. P., Berggren, G. T. Jr. (1996):** Potential weed hosts for *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*, casual agent for soybean stem canker. *Plant Disease*, 80: 763-765.

**Boerema, G. H., Verhoeven, A. A. (1973):** Check-list for scientific names of common parasitic fungi. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 79: 165-179.

**Borja, I., Solheim, H., Hietala, A. M., Fossdal, C. G. (2006):** Etiology and real-time polymerase chain reaction-based detection of *Gremmeniella*- and *Phomopsis*-associated disease in Norway spruce seedlings. *Phytopathology*, 96: 1305-1314.

- Bretz, T. W. (1943):** Surveys in Iowa and Missouri. *Plant Disease Reporter*, 27: 377-380.
- Brill, L. M., Sinclair, J. B. (1990):** Seradiagnosis of fungi of the *Diaporthe/Phomopsis* complex of soybeans. (Abstract), *Phytopathology*, 80: 962.
- Bruns, D. T., White, J. T., Taylor, J. W. (1991):** Fungal molecular systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 22: 525-564.
- Carbone, I., Kohn, L. M. (1999):** A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91: 553-556.
- Castlebury, A. L., Rossman, Y. A., Jaklitsch, J. W., Vasilyeva, N. L. (2002):** A preliminary overview of the *Diaporthales* based on large subunit nuclear ribosomal DNA sequences. *Mycologia*, 94 (6): 1017-1031.
- Cenis, J. L. (1992):** Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research*, 20: 2380.
- Cerkauskas, R. F., Sinclair, J. B. (1980):** Use of paraquat to aid detection of fungi in soybean tissues. *Phytopathology*, 70: 1036-1038.
- Cooke, M. C., Ellis, J. B. (1878):** New Jersey fungi. *Grevillea*, Vol. VI (39): 81-96.
- Costamilan, M. L., Yorinori, T. J., Almeida, M. R. A., Seixas, D. S. C., Binneck, E., Araújo, R. M., Carbonari, A. J. (2008):** First report of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* infecting soybean plants in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 33: 381-385.
- Crall, J. M. (1952):** A toothpick method of inoculation. *Phytopathology*, 42: 5-6.
- Crous, W. P., Groenewald, Z. J. (2011):** *Diaporthe rhusicola*. Fungal Planet description sheets, *Persoonia*, 26: 134-135.

- Cui, Y. L., Duan, C. X., Wang, X. M., Li, H. J., Zhu, Z. D. (2009):** First report of *Phomopsis longicolla* causing soybean stem blight in China. *New Disease Reports*, 18: 49.
- Curzi, M. (1926):** De novis *Theae* micromycetibus pathogenis. *Atti dell'Istituto Botanico della Università e Laboratorio Crittogamico di Pavia*, série 3, 3: pp. 60, 65.
- Desmazières, J. B. H. J. (1836):** Annales des Sciences Naturelles, *Botanique et Biologie Vegetale*, série 2, 6: 247.
- Desmazières, J. B. H. J. (1853):** Annales des Sciences Naturelles, *Botanique et Biologie Vegetale*, série 3, 20: 218.
- Diogo, E. L. F., Santos, J. M., Phillips, A. J. L. (2010):** Phylogeny, morphology and pathogenicity of *Diaporthe* and *Phomopsis* species on almond in Portugal. *Fungal Diversity*, 44: 107–115.
- Duvnjak, T. (2004):** *Phomopsis longicolla* Hobbs uzročnik truleži sjemena soje u Hrvatskoj. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Osijek.
- Dyer, P. S., Ingram, D. S., Johnstone, K. (1992):** The control of sexual morphogenesis in the Ascomycotina. *Biological Reviews*, 67: 421-458.
- Ellis, J. B., Everhart, B. M. (1892):** The North American Pyrenomycetes. Newfield, New Jersey, p. 460.
- Felsenstein, J. (1985):** Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783–791.
- Fernández, A. F., Hanlin, T. R. (1996):** Morphological and RAPD analyses of *Diaporthe phaseolorum* from soybean. *Mycologia*, 88: 425-440.
- Freitas, M. A., Café Filho, A. C., Nasser, L. C. B. (2002):** Cultural practices and genetic resistance as factors affecting soybean stem canker and plant yield in the Cerrado. *Fitopatologia Brasileira*, 27: 5-11.



- Frosheiser, F. I. (1957):** Studies on ethiology and epidemiology of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*, the cause of stem canker of soybeans. *Phytopathology*, 47: 87-94.
- Gleason, M. L., Ghabrial, S. A., Ferriss, R. S. (1987):** Serological detection of *Phomopsis longicolla* in soybean seeds. *Phytopathology*, 77: 371-375.
- Grove, W. B. (1917):** The British species of *Phomopsis*. *Bulletin of miscellaneous information/Royal Botanic Gardens, Kew, England*, 2: 49-73.
- Grove, W. B. (1918):** New or noteworthy fungi, Part VI. *Journal of Botany, British and Foreign*, London, 56: 291.
- Halsted, B. D. (1890):** Some fungous diseases of the sweet potato. *New Jersey Agricultural Experiment Station Bulletin*, 76: 32.
- Harter, L. L. (1917):** Podblight of the lima bean caused by *Diaporthe phaseolorum*. *Journal of Agricultural Research*, 11: 473-504.
- Harter, L. L., Field, E. C. (1912):** *Diaporthe*, the ascogenous form of sweet potato dry rot. *Phytopathology*, 2: 121-124.
- Harter, L. L., Field, E. C. (1913):** A dry rot of sweet potatoes caused by *Diaporthe batatatis*. Bureau of Plant Industry, U.S. Department of Agricultural, Washington, D.C., *Bulletin*, 281: 37.
- Hartman, G. L., Sinclair, J. B., Rupe, J. C. (1999):** Compendium of soybean diseases, 4<sup>th</sup> edition. APS Press, The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.
- Henson, J. M., French, R. (1993):** The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annual Review of Phytopathology*, 31: 81-109.
- Hepperly, P. R., Kirkpatrick, B. L., Sinclair, J. B. (1980):** *Abutilon theophrasti*: wild host for three fungal parasites of soybean. *Phytopathology*, 70: 307-310.

Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P. M., Lücking, R., Lumbsch, T., Lutzoni, F., Matheny, P. B., McLaughlin, D. J., Powell, M. J., Redhead, S., Schoch, C. L., Spatafora, J. W., Stalpers, J. A., Vilgalys, R., Aime, M. C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G. L., Castlebury, L. A., Crous, P. W., Dai, Y. C., Gams, W., Geiser, D. M., Griffith, G. W., Gueidan, C., Hawksworth, D. L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R. A., Hyde, K., Ironside, J. E., Kõljalg, U., Kurtzman, C. P., Larsson, K. H., Lichtwardt, R., Longcore, J., Miądlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J. M., Mozley-Standridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J. D., Roux, C., Ryvarden, L., Sampaio, J. P., Schüßler, A., Sugiyama, J., Thorn, R. G., Tibell, L., Untereiner, W. A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiß, M., White, M. M., Winka, K., Yao, Y. J., Zhang, N. (2007): A higher-level phylogenetic classification of the *Fungi*. *Mycological Research*, 111: 509-247.

Higley, P. M., Tachibana, H. (1987): Physiologic specialization of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* in soybean. *Plant Disease*, 71: 815-817.

Hildebrand, A. A. (1953): An elaboration of the tootpick method of inoculating plants. *Canadian Journal of Agricultural Science*, 33: 506-507.

Hildebrand, A. A. (1954): Observations on the occurrence of the stem canker and pod and stem blight fungi on mature stems of soybean. *Plant Disease Reporter*, 38: 640-646.

Hildebrand, A. A. (1956): Observations on stem canker and pod and stem blight of soybeans in Ontario. *Canadian Journal of Botany*, 34: 577-599.

Hobbs, T. W., Schmitthenner, A. F., Kuter, G. A. (1985): A new *Phomopsis* species from soybean. *Mycologia*, 77: 535-544.

Holliday, P. (1980): Fungus diseases of tropical crops. Cambridge University Press, pp. 130-131.

**Hrustić, M., Miladinović, J. (2011):** Importance, origin and expansion of soybean, In: *Soybean* (Eds. J. Miladinović, M. Hrustić, M. Vidić), Institute of Field and Vegetable Crops, Novi Sad and Sojaprotein, Bečej, Serbia, pp. 11-44.

**Hrustić, M., Miladinović, J., Đukić, V., Tatić, M., Balešević-Tubić, S. (2008):** Privredni značaj, osobine i tehnologija proizvodnje soje. *Biljni lekar*, 3-4: 171-186.

**Ivanović, M., Koprivica, M., Milijašević, S., Dukić, N., Duduk, B. (2004):** Primena molekularnih metoda u dijagnostici biljnih bolesti. *Pesticidi i fitomedicina*, 19: 223-231.

**Jaccoud Filho, D. S., Lee, D. (2004a):** Contribution to the study of the *Phomopsis/Diaporthe* complex of soybean seeds by using morphological and DNA profile, In: *Proceedings of the World Soybean Research Conference VII & International Soybean Processing and Utilization Conference IV* (Eds. K. Lawrance), Foz do Iguaçu, PR, Brazil, p. 324.

**Jaccoud Filho, D. S., Lee, D. (2004b):** Detection and identification of *Phomopsis meridionalis* in soybean seeds by using PCR, In: *Proceedings of the World Soybean Research Conference VII & International Soybean Processing and Utilization Conference IV* (Eds. K. Lawrance), Foz do Iguaçu, PR, Brazil, p. 324.

**Janse van Rensburg, J. C., Lamprecht, S. C., Groenewald, J. Z., Castlebury, L. A., Crous, P. W. (2006):** Characterisation of *Phomopsis* spp. associated with die-back of rooibos (*Aspalathus linearis*) in South Africa. *Studies in Mycology*, 55: 65-74.

**Jasnić, S., Vidić, M. (1981):** Crna pegavost stabla nova bolest soje u Jugoslaviji. *Glasnik zaštite bilja*, 2: 44-46.

**Jasnić, S., Vidić, M. (1983):** *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* - nov parazit soje u Jugoslaviji. *Zaštita bilja*, 34: 213-223.

**Jasnić, S., Vidić, M. (1985):** Occurrence of soybean diseases in Yugoslavia. *Eurosoya*, 3: 43-46.

- Jurković, D., Vrandečić, K., Ćosić, J., Riccioni, L., Duvnjak, T. (2007):** Morphological identification of *Diaporthe/Phomopsis* sp. isolated from *Xanthium italicum*. *Agriculture: Scientific and Professional Review*, 13: 10-14.
- Keeling, B. L. (1984):** Evidence for physiologic specialization in *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*. *Journal of the Mississippi Academy of Sciences (Supplement)*, 29: 5.
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., Minter, D. W., Stalpers, J. A. (2008):** Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi, 10<sup>th</sup> edition. Cabi Publishing, pp. 55, 203, 664.
- Kmetz, K. T., Ellett, C. W., Schmitthenner, A. F. (1974):** Isolation of seedborne *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis* from immature soybean plants. *Plant Disease Reporter*, 58: 978-982.
- Kmetz, K. T., Ellett, C. W., Schmitthenner, A. F. (1978):** Soybean seed decay: prevalence and symptom expression of *Phomopsis* sp., *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* and *D. phaseolorum* var. *caulivora*. *Phytopathology*, 68: 836-840.
- Kmetz, K. T., Ellett, C. W., Schmitthenner, A. F. (1979):** Soybean seed decay: sources of inoculum and nature of infection. *Phytopathology*, 69: 798-801.
- Koch, L. W., Hildebrand, A. A. (1943):** Pod and stem blight, In: *23<sup>rd</sup> Annual Report Canadian Plant Disease Survey*, 1942, Ottawa, p. 29.
- Kulik, M. M. (1984):** Symptomless infection, persistence, and production of pycnidia in host and non-host plants by *Phomopsis batatae*, *Phomopsis phaseoli*, and *Phomopsis sojae*, and the taxonomic implications. *Mycologia*, 76: 274-291.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., Higgins, D. G. (2007):** Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23 (21): 2947-2948.

- Lehman, S. G. (1922):** Pod and stem blight of the soybean. *Journal of Elisha Mitchell Scientific Society*, 38: 13.
- Lehman, S. G. (1923):** Pod and stem blight of the soybean. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 10(2): 111-178.
- Li, S. (2011):** Phomopsis seed decay of soybean. In: *Soybean - Molecular Aspects of Breeding* (Eds. A. Sudarić), InTech, Rijeka, Croatia, pp. 277-292.
- Li, S., Bradley, C. A., Hartman, G. L., Pedersen, W. L. (2001):** First report of *Phomopsis longicolla* from Velvetleaf causing stem lesions on inoculated soybean and velvetleaf plants. *Plant Disease*, 85: 1031.
- Li, S., Kurtzweil, N. C., Grau, C. R., Hartman, G. L. (2004):** Occurrence of soybean stem canker (*Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis*) in Wisconsin. *Plant Disease*, 88: 576.
- Luttrell, E. S. (1947):** *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* on crop plants. *Phytopathology*, 37: 445-465.
- Mannerucci, G. F., Gambogi, P. (1978):** *Phomopsis* sp. su semi di soia in Toscana. *Informatore Fitopatologico*, 10: 7-11.
- McGee, D. C. (1992):** Soybean diseases. APS Press, The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, pp. 13-20.
- McNeill, J., Turland, J. N., Monro, M. A., Lepschi, J. B. (2011):** XVIII International Botanical Congress: preliminary mail vote and report of Congress action on nomenclature proposals. *Taxon*, 60: 1-14.
- Medić-Pap, S. (2006):** Mikoflora prouzrokovala bolesti semena soje. Magistarska teza, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.

- Mengistu, A., Castlebury, L. A., Smith, J. R., Rossman, A. Y., Reddy, K. N. (2007):** Isolates of *Diaporthe/Phomopsis* from weeds and their effect on soybean. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 29: 283-289.
- Merrin, S. J., Nair, N. G., Tarran, J. (1995):** Variation in *Phomopsis* recorded on grapevine in Australia and its taxonomic and biological implications. *Australasian Plant Pathology*, 24: 44-56.
- Mitić, N., Vukojević, J., Franić-Mihajlović, D. (1997):** A comparative study of *Diaporthe/Phomopsis* fungi on soybean from two different regions of the world. *Mycopathologia*, 139: 107-113.
- Morgan-Jones, G. (1989):** The *Diaporthe/Phomopsis* complex: taxonomic considerations, In: *Proceedings of the World Soybean Research Conference IV* (Eds. A. Pascale), Editora Orientación Gráfica, Buenos Aires, Argentina, pp. 1699-1706.
- Mostert, L., Crous, P. W., Kang, J. C., Phillips, A. J. L. (2001):** Species of *Phomopsis* and a *Libertella* sp. occurring on grapevines with specific reference to South Africa: morpho-logical, cultural, molecular and pathological characterization. *Mycologia*, 93: 146-167.
- Muntañola-Cvetković, M., Mihaljčević, M., Petrov, M. (1981):** On the Identity of the Causative Agent of a Serious *Phomopsis-Diaporthe* Disease in Sunflower Plants. *Nova Hedwigia*, 34: 417-435.
- Nitschke, T. (1870):** Pyrenomycetes Germanici. *Breslau*, 2: 245.
- Petch, T. (1922):** Additions to Ceylon fungi (II). *Annals of the Royal Botanic Garden, Peradeniya*, 7: 311.
- Peterson, J. L., Strelecki, R. F. (1965):** The effect of variants of *Diaporthe phaseolorum* on soybean germination and growth in New Jersey. *Plant Disease Report*, 49: 228-229.

**Petrović, K., Vidić, M (2010):** Rasprostranjenost parazita semena soje u Srbiji. X Savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor, Zbornik rezimea, pp. 108-109.

**Pevsner, J. (2009):** Bioinformatics and functional genomics. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, pp. 215-272.

**Phillips, A. J. L. (1999):** The relationship between *Diaporthe perijuncta* and *Phomopsis viticola* on grapevines. *Mycologia*, 91: 1001-1007.

**Pioli, R., Gattuso, S., Prado, D., Borghi, A. (1997):** Recent outbreak of stem canker (*Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis*) of soybean in Santa Fe, Argentina. *Plant Disease*, 81: 1215.

**Pioli, N. R., Morandi, N. E., Bisaro, V. (2001):** First Report of Soybean Stem Canker Caused by *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* in Argentina. *Plant Disease*, 85: 95.

**Pioli, N. R., Morandi, N. E., Gosparini, C. O., Borghi, A. L. (1999):** First Report on Pathogenic Variability of Different Isolates of *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* on Soybean in Argentina. *Plant Disease*, 83: 1071.

**Pioli, N. R., Morandi, N. E., Martínez, C. M., Lucca, F., Tozzini, A., Bisaro, V., Hopp, H. E. (2003):** Morphologic, molecular, and pathogenic characterization of *Diaporthe phaseolorum* variability in the core soybean-producing area of Argentina. *Phytopathology*, 93: 136-146.

**Ploetz, R. C., Shokes, F. M. (1985):** Soybean stem canker incited by ascospores and conidia of the fungus causing the disease in the southeastern United States. *Plant Disease*, 69: 990-992.

**Posada, D., Crandall, K. A. (1998):** Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14: 817–818.

**Pöggeler, S. (2001):** Mating-type genes for classical strain improvements of ascomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56: 589-601.

- Punithalingam, E., Holliday, P. (1972):** *Diaporthe phaseolorum*. In: *CMI Descriptions of pathogenic bacteria and fungi*, Commonwealth Mycological Institute, 336: 2-3.
- Rehner, S. A., Uecker, F. A. (1994):** Nuclear ribosomal internal transcribed spacer phylogeny and host diversity in the coelomycete *Phomopsis*. *Canadian Journal of Botany*, 72: 1666-1674.
- Rehner, S. A., Samuels, G. J. (1994):** Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analysed from nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycological Research*, 98: 625-634.
- Rekab, D., Del Sorbo, G., Reggio, C., Zoina, A., Forrao, G. (2004):** Polymorphisms in nuclear rDNA and mtDNA reveal the polyphyletic nature of isolates of *Phomopsis* pathogenic to sunflower and a tight monophyletic clade of defined geographic origin. *Mycological Research*, 108 (4): 393-402.
- Riccioni, L., Conca, G., Pucci, N. (2003):** Identification by PCR-RFLP of *Phomopsis/Diaporthe* species on Italian soybean. (Abstract 1076), In: *8<sup>th</sup> International Congress of Plant Pathology (ICPP)*, Christchurch, New Zealand.
- Riccioni, L., Duvnjak, T., Pucci, N., Hartman, G. L. (2005):** PCR-RFLP identification of the *Phomopsis/Diaporthe* species on soybean seeds, In: *Abstract Booklet of 5<sup>th</sup> ISTA - SHC Seed Health Symposium* (Eds. V. Binoit), Angers, France, p. 12.
- Riccioni, L., Haegi, A. (2008):** Characterization of *Diaporthe/Phomopsis* species on herbaceous and woody plants in Italy. *Journal of Plant Pathology*, S2: 437.
- Riccioni, L., Vrandečić, K. (2007):** New *Diaporthe/Phomopsis* species on soybean. *Journal of Plant Pathology (Supplement)*, 89: 57.



**Riccioni, L., Zhang, A., Hartman, G. (1998):** Messa a punto di un metodo biomolecolare per la identificazione di *Diaporthe/Phomopsis* spp. *Notiziario sulla protezione delle piante*, 9: 97-104.

**Roger, A. J., Sandblom, O., Doolittle, W. F., Philippe, H. (1999):** An evaluation of elongation factor 1 alpha as a phylogenetic marker for eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 218-233.

**Roy, K. W., Baird, R. E., Abney, T. S. (2000):** A review of soybean (*Glycine max*) seed, pod, and flower mycofloras in North America, with methods and a key for identification of selected fungi. *Mycopathologia*, 150: 15-27.

**Roy, K. W., Miller, W. A. (1983):** Soybean stem canker incited by isolates of *Diaporthe* and *Phomopsis* spp. from cotton in Mississippi. *Plant Disease*, 67: 135-137.

**Roy, K. W., Ratnayake, S., McLean, K. (1997):** Colonization of weeds by *Phomopsis longicolla*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 19: 193-196.

**Saccardo, P. A. (1879):** Nova addenda ad Mycologiam Venetam. *Michelia*, I (5): 521.

**Saccardo, P. A. (1882):** Sylloge Fungorum omnium hucusque cognitorum, Vol. I. Padova, Italy, pp. 606, 638, 692.

**Saccardo, P. A. (1884):** Ibid, Vol. III, p. 120.

**Saccardo, P. A. (1915):** Fungi ex insula Melita (Malta). *Nuovo Giornale Botanico Italiano*, 22: 47.

**Santos, J. M., Correia, V. G., Phillips, A. J. L. (2010):** Primers for mating-type diagnosis in *Diaporthe* and *Phomopsis*: their use in teleomorph induction in vitro and biological species definition. *Fungal Biology*, 114: 255-270.

- Santos, J. M., Phillips, A. J. L. (2009):** Resolving the complex of *Diaporthe* (*Phomopsis*) species occurring on *Foeniculum vulgare* in Portugal. *Fungal Diversity*, 34: 111-125.
- Santos, J. M., Vrandečić, K., Ćosić, J., Duvnjak, T., Phillips, A. J. L. (2011):** Resolving the *Diaporthe* species occurring on soybean in Croatia. *Persoonia*, 27: 9-19.
- Scheper, R. W. A., Crane, D. C., Whisson, D. L., Scott, E. S. (2000):** The *Diaporthe* teleomorph of *Phomopsis* Taxon 1 on grapevines. *Mycological Research*, 104: 226-231.
- Schmitthenner, A. F., Kmetz, K. T. (1980):** Role of *Phomopsis* sp. in the soybean seed rot problem, In: *Proceedings of the World Soybean Research Conference II* (Eds. F. T. Corbin), Westview Press, Boulder, Colorado, pp. 355-366.
- Setti, B., Bencheikh, M., Henni, J. E., Claire, N. (2011):** Advances of molecular markers application in plant pathology research. *European Journal of Scientific Research*, 50: 110-123.
- Sinclair, J. B. (1991):** Latent infection of soybean plants and seeds by fungi. *Plant Disease*, 75: 220-224.
- Smith, W. A., Knox-Davies, P. S. (1989a):** Die-back of rooibos tea caused by *Diaporthe phaseolorum*. *Phytophylactica*, 21: 183-188.
- Smith, W. A., Knox-Davies, P. S. (1989b):** Comparison of *Diaporthe phaseolorum* isolates from rooibos tea *Aspalathus linearis*. *Phytophylactica*, 21: 301-306.
- StatSoft, Inc. (2009):** STATISTICA (data analysis software system), version 9.
- Swofford, D. L. (2002):** PAUP\* 4.0b10: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

**Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011):** MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* (submitted).

**Taylor, W. J., Jacobson, J. D., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, M. D., Hibbett, S. D., Fisher, C. M. (2000):** Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 31: 21-32.

**Thickett, K., VanDerWal, J., Lovett-Doust, L., Anderson, T. R. (2007):** A method for screening soybean seedlings for resistance to northern stem canker caused by *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*. *Canadian Journal of Plant Science*, 87: 443-446.

**Tucker, C. M. (1935):** *Diaporthe phaseolorum* on papper fruits. *Mycologia*, 27: 580-585.

**Turgeon, B. G. (1998):** Application of mating type gene technology to problems in fungal biology. *Annual Review of Phytopathology*, 36: 115-137.

**Uddin, W., Stevenson, K. L., Pardo-Schultheiss, R. A. (1997):** Pathogenicity of a species of *Phomopsis* causing a shoot blight on peach in Georgia and evaluation of possible infection courts. *Plant Disease*, 81: 983-989.

**Uecker, F. A. (1988):** A world list of *Phomopsis* names with notes on nomenclature, morphology and biology. *Mycologia Memoir*, 13.

**Uecker, F. A. (1989):** A time sequence of development of *Diaporthe phaseolorum* (*Diaporthaceae*) from *Stokesia laevis*. *Memoirs of the New York Botanical Garden*, 49: 38-50.

**Van Niekerk, J. M., Groenewald, J. Z., Farr, D. F., Fourie, P. H., Halleen, F., Crous, P. W. (2005):** Reassessment of *Phomopsis* species on grapevines. *Australasian Plant Pathology*, 34: 27-39.

**Vechiato, M. H., Maringoni, A. C., Martins, E. M. F., Kohara, E. Y. (2003):** Caracterização de isolados de *Diaporthe* spp. e *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis*. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, 70: 159-167.

**Velicheti, R. K., Lamison, C., Brill, L. M., Sinclair, J. B. (1993):** Immunodetection of *Phomopsis* species in asymptomatic soybean plants. *Plant Disease*, 77: 70-73.

**Viégas, A. P. (1962):** Podridao do pimentao. *Bragantia*, 21: 377-381.

**Vidić, M. (1987):** Epidemiologija *Diaporthe phaseolorum* (Cke et Ell.) Sacc. var. *caulivora* Athow et Caldwell prouzrokovala crne pegavosti stabla soje. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.

**Vidić, M. (1991):** Variability of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* on soybean in the Vojvodina province in Serbia. *Zaštita bilja*, 197: 183-189.

**Vidić, M., Jasnić, S. (1994):** *Phomopsis* vrste na soji u Jugoslaviji. III jugoslovenski kongresa o zaštiti bilja, Vrnjačka Banja, Zbornik rezimeja, p. 38.

**Vidić, M., Jasnić, S., Hrustić, M., Jocković, Đ. (1994):** Virulentnost izolata *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* na soji. *Zaštita bilja*, 207: 67-71.

**Vidić, M., Jasnić, S., Jocković, Đ. (1998):** Occurrence of *Phomopsis longicolla* Hobbs on soybean in Yugoslavia. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 33: 313-321.

**Vidić, M., Jasnić, S., Miladinović, J. (1995):** Patogenost izolata *Phomopsis sojae* i *Phomopsis longicolla* na soji. *Zaštita bilja*, 46: 197-205.

**Vidić, M., Jasnić, S., Petrović, K. (2011):** Vrste roda *Diaporthe/Phomopsis* na soji u Srbiji. *Pesticidi i fitomedicina*, 26: 301-315.

**Vidić, M., Jasnić, S., Stojšin V. (1996):** Cultural and morphological characteristic of *Phomopsis sojae* and *Phomopsis longicola* originating from soybean. *Zaštita bilja*, 215: 37-44.

**Vidić M., Miladinović J., Đorđević V. (2002):** Uticaj odlaganja žetve soje na intenzitet pojave truleži semena. *Zaštita Bilja*, 53: 39–50.

**Von Höhnel, F. (1906):** Fragmente zur Mycologie. *Sitzungsberichte der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften*, 115: 680.

**Vrandečić, K., Ćosić, J., Riccioni, L., Duvnjak, T., Jurković, D. (2004):** *Phomopsis longicolla* Hobbs. - new pathogen on *Abutilon theophrasti* Med. in Croatia. *Plant Pathology*, 53: 251.

**Vrandečić, K., Ćosić, J., Riccioni, L., Duvnjak, T., Jurković, D. (2005):** Isolation of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* from *Abutilon theophrasti* in Croatia. *Plant Pathology*, 54: 576.

**Walcott, R. R. (2010):** ISTA Handbook of Seed Health Testing, Annexe to Chapter 7: 7-016: Acidified PDA method for the detection of *Phomopsis* complex on *Glycine max*. International Seed Testing Association (ISTA), Bassersdorf, Switzerland.

#### **Web Site:**

**1. ApE – A plasmid Editor by M. Wayne Davis**

<<http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>> [pristupano 2012]

**2. Delta Research Center, University of Missouri**

<<http://aes.missouri.edu/delta/research/soyloss.stm>> [pristupano 2012]

**3. EPPO Global Database**

<<http://gd2.eppo.org/>> [pristupano 12. 03. 2012]

**4. FAOSTAT, FAO Statistic Division**

<<http://faostat.fao.org/>> [pristupano 04. 06. 2012]

**5. Index Fungorum**

<<http://www.indexfungorum.org/>> [pristupano tokom 2011/12 godine]

**6. International Code of Botanical Nomenclature**

<<http://ibot.sav.sk/icbn/main.htm>> [pristupano 15. 12. 2011]

**7. MycoBank, Fungal Databases**

<<http://www.mycobank.org>> [pristupano tokom 2011/12 godine]

**8. National center for biotechnology information (NCBI)**

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>> [pristupano tokom 2011/12 godine]

**9. NIAS GenBank**

<<http://www.gene.affrc.go.jp>> [pristupano 15. 01. 2012]

**10. TreeBASE, A Database of Phylogenetic Knowledge**

<<http://www.treebase.org>> [pristupano 5. 01. 2012]

**11. USDA ARS Fungal Database**

<<http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>> [pristupano 12. 03. 2012]

**Wehmeyer, L. E. (1933):** The genus *Diaporthe* Nitschke and its segregates. University of Michigan Press, Ann Arbor, Michigan, *Studies Scientific Series* 9: 1-349.

**Weiß, M., Göker, M. (2011):** Molecular phylogenetic reconstruction, In: *The Yeasts: a taxonomic study*, 5<sup>th</sup> edition (Eds. C. P. Kurtzman, J. W. Fell, T. Boekhout), Elsevier, UK, Vol. 1, Part III, pp. 159-174.

**Welch, A. W. (1947):** A study of soybean diseases and their control. Report of Agricultural Research for the year ending June 30, 1947, Part I. Iowa Agricultural Experiment Station, Ames, p. 171.

**Welch, A. W., Gilman, J. C. (1948):** Hetero- and homo- thallic types of *Diaporthe* on soybeans. *Phytopathology*, 38: 628-637.

**White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990):** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, In: *PCR Protocols* (Eds. M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White), Academic Press, New York, pp. 315-322.

**Whitehead, M. D. (1966):** Stem canker and blight of birdsfoot-trefoil and soybean incited by *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae*. *Phytopathology*, 56: 396-400.

**Wolf, F. A., Lehman, S. G. (1920):** Notes of new or little known plant diseases in North Carolina. *North Carolina Agricultural Experiment Station Annual Report*, 43: 55-58.

**Xiong, J. (2006):** Essential bioinformatics. Cambridge University Press, New York, pp. 127-169.

**Yourinori, J. T. (1994):** Fungal Disease, In: *Tropical soybean, improvement and production*, FAO, pp. 37-60.

**Zhang, A. W., Hartman, G. L., Curio-Penny, B., Pedersen, W.L., Becker, K. B. (1999):** Molecular detection of *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* from soybean seeds. *Phytopathology*, 89: 796-804.

**Zhang, A. W., Hartman, G. L., Riccioni, L., Chen, W. D., Ma, R. Z., Pedersen, W. L. (1997):** Using PCR to distinguish *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* from other soybean fungal pathogens and to detect them in soybean tissues. *Plant Disease*, 81: 1143-1149.

**Zhang, A. W., Riccioni, L., Pedersen, W. L., Kollipara, K. P., Hartman, G. L. (1998):** Molecular identification and phylogenetic grouping of *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* isolates from soybean. *Phytopathology*, 88: 1306-1314.

**Živković, Marija (2007):** Osnovni principi PCR metode i njena primena u kliničkoj praksi. *Medicinski časopis*, 41 (2), S2: 32-37.

## 10. PRILOZI

Prilog 1. Hronološki pregled morfoloških karakteristika teleomorfno­g stadijuma *Diaporthe*

Prilog 2. Hronološki pregled morfoloških karakteristika anamorfnog stadijuma *Phomopsis*

Prilog 3. Morfološke karakteristike patogena soje roda *Diaporthe/Phomopsis*



Prilog 1. Hronološki pregled morfoloških karakteristika teleomornog stadijuma *Diaporthe*

Peritecije (µm)	Askusi (µm)	Askospore (µm)	Referenca
<b><i>Diaporthe phaseolorum</i> var. <i>phaseolorum</i></b>			
<i>Na stablu pasulja (Phaseolus vulgaris):</i> u grupi askomata loptasta i uronjena u tkivo ima male bodljikave vratove crne boje	izduženi	dužine 16 µm 4 uljane kapi	<b>Cooke &amp; Ellis, 1878</b> <b>Saccardo, 1882</b>
<i>Na prezimelim stablima pasulja:</i> u grupi vrat dužine 250-500	30-35 × 6-7	10-12 × 3 dvočelijske 4 uljane kapi	<b>Ellis &amp; Everhart, 1892</b>
<b><i>Diaporthe phaseolorum</i> var. <i>batatatis</i></b>			
<i>Na kukuruznoj podlozi:</i> u grupama 9-25 peritecija askomata prečnika 120-370 vrat dužine 500-3000	23-38 × 7-12	8-12 × 4-6 dvočelijske	<b>Harter &amp; Field, 1913</b>
<i>Na hranljivoj podlozi:</i> u grupi		8,0-9,5 × 2,0-3,0	<b>Wehmeyer, 1933</b>
<b><i>Diaporthe phaseolorum</i> var. <i>sojae</i></b>			
<i>Na prezimelim ostacima lima pasulja (Phaseolus lunatus) :</i> pojedinačno rasute vrat dužine 158,0-355,5	28,0-46,2 × 5,2-8,0	6,4-12,0 × 2,3-4,0 dvočelijske 2-4 uljane kapi	<b>Harter, 1917</b>
<i>Na biljkama lima pasulja:</i> pojedinačno rasute ili u grupi askomata veličine 110-200 × 160-350 vrat prečnika 50-80, dužine 120-400	28,0-46,0 × 5,5-8,0	8,0-12,0 × 2,0-3,5 dvočelijske	<b>Wehmeyer, 1933</b>
<i>(nastavak na sledećoj strani)</i>			

Peritecije (µm)	Askusi (µm)	Askospore (µm)	Referenca
<i>Na PDA + sterilizovane peteljke lista soje:</i> u grupama 3-15 peritecija askomata prečnika 116-318 × 145-348 vrat prečnika 40-60, dužine 1500	37,2-50,2 × 7,2-12,0	9,6-12,4 × 2,4-4,2 dvočelijske	<b>Lehman, 1923</b>
<i>Na PDA podlozi:</i> obično u grupi askomata prečnika 150-300	34,2-44,1 × 7,2-9,0	9,0-11,0 × 2,5-3,5 dvočelijske	<b>Tucker, 1935</b>
<i>Na prezimelim stablima soje:</i> pojedinačno askomata prečnika 163-272 × 190-340	28,0-44,8 × 7,8-10,6	9,0-13,5 × 3,0-4,8 dvočelijske	<b>Luttrell, 1947</b>
<i>Na prezimelim stablima soje:</i> pojedinačno askomata prečnika 156-260 × 192-335 vrat dužine 347-521	37,0-52,0 × 7,4-12,9	10,4-18,5 × 3,7-5,5 dvočelijske	<b>Welch &amp; Gilman, 1948</b>
<i>Na prezimelim stablima soje:</i> pojedinačno askomata prečnika 148-282 × 185-346 vrat prečnika 60-142, dužine 350-1500	38,0-51,2 × 5,0-10,3	9,2-13,5 × 3,3-5,6 dvočelijske	<b>Athow &amp; Caldwell, 1954</b>
<i>Na PDA podlozi izolati iz biljke Lotus corniculatus:</i> formiraju se u stromi	28-41 × 6,5-10	11,5 × 3,5 dvočelijske	<b>Anderegg, 1959</b> (navedeno u Kulik, 1984)
<i>Na PDA podlozi:</i> formiraju se u stromi askomata prečnika 151-265 × 172-330 vrat prečnika 35-56, dužine 1300-1600	21,1-46,4 × 7,2-11,5	8,6-12,8 × 2,8-5,0 dvočelijske	<b>Whitehead, 1966</b>
<i>Na APDA podlozi:</i> formiraju se na mestima piknida ili na novim mestima	26,0-55,0 × 5,1-7,5	9,0-13,0 × 2,6-4,3 dvočelijske	<b>Kmetz, 1975</b> (navedeno u Kulik, 1984)
<i>(nastavak na sledećoj strani)</i>			

Peritecije (µm)	Askusi (µm)	Askospore (µm)	Referenca
<i>Na PDA podlozi:</i> pojedinačno, retko u grupi askomata prečnika 148-282 × 185-346 vrat prečnika 60-100, dužine 60-150	35,0-51,0 × 3,3-10,0	9-13 × 2-6 dvoćelijske	<b>McGee, 1992</b>
<i>Na PDA podlozi:</i> u grupi askomata prečnika 209,9 ± 42,2 × 246,0 ± 43,6 vrat prečnika 59,0 ± 1,1-94,0 ± 11,7, dužine 557,5 ± 104,2	31,5 ± 0,9 × 6,5 ± 0,1	8,5 ± 0,3 × 3,1 ± 0,1 dvoćelijske	<b>Fernández &amp; Hanlin, 1996</b>
<i>Na APDA podlozi:</i> pojedinačno, retko u grupi askomata prečnika 370-395 vrat dužine 350-800	30-42 × 5-6	7-10 × 2-3 dvoćelijske	<b>Medić-Pap, 2006</b>
<i>Na stablu biljke Foeniculum vulgare:</i> pojedinačno askomata prečnika 230-270 vrat dužine 210-430	32,5-38,0 × 6,5-9,5	8,0-11,3 × 2,0-3,0	<b>Santos et al., 2011</b>
<b><i>Diaporthe phaseolorum var. caulivora</i></b>			
<i>Na prezimelim stablima soje:</i> u grupama 1-7 peritecija, najčešće 2-4 po stromi askomata prečnika 178-325 × 275-390 vrat dužine 280-546	27,2-40,8 × 6,8-8,5	8,5-10,2 × 3,4-5,1 dvoćelijske	<b>Welch &amp; Gilman, 1948</b>
<i>Na prezimelim stablima soje:</i> u grupama 2-12 peritecija; najčešće 3-5 po stromi, retko pojedinačno askomata prečnika 165-340 × 282-412 vrat prečnika 29,0-138,5, dužine 240-518	29,8-40,2 × 4,5-7,0	8,6-11,8 × 3,0-3,9 dvoćelijske	<b>Athow &amp; Caldwell, 1954</b>
<i>Na APDA podlozi:</i> pojedinačno ili u grupama	24,0-50,0 × 5,0-8,1	7,5-14,5 × 2,8-3,3 dvoćelijske	<b>Kmetz, 1975 (navedeno u Kulik, 1984)</b>
<i>(nastavak na sledećoj strani)</i>			

Peritecije ( $\mu\text{m}$ )	Askusi ( $\mu\text{m}$ )	Askospore ( $\mu\text{m}$ )	Referenca
<i>Na prezimelim stablima soje:</i> u grupama najčešće po 8 peritecija askomata prečnika 170-450 × 180-500 vrat dužine 320-1500	22,5-35,0 × 5,0-8,7	8,7-12,0 × 2,5-3,7 dvoćelijske	<b>Vidić, 1987</b>
<i>Na PDA podlozi:</i> u grupama askomata prečnika 277,3 ± 51,5 × 316,8 ± 56,0 vrat prečnika 65,8 ± 7,7-113,9 ± 18,2, dužine 562,8 ± 110,0	26,7 ± 1,0 × 5,7 ± 0,1	8,2 ± 0,1 × 2,3 ± 0,1 dvoćelijske	<b>Fernández &amp; Hanlin, 1996</b>
<i>Na APGA podlozi:</i> pojedinačno ili u grupama	dužine 30,45 ± 2,25	8,95 ± 0,5 × 2,8 ± 0,115 dvoćelijske	<b>Pioli et al., 2003</b>
<i>Na PDA podlozi:</i> u grupama vrat jako dugačak	30,0-40,0 × 6,0-8,25	7,5-11,25 × 2,5 dvoćelijske	<b>Jaccoud-Filho &amp; Lee, 2004a</b>
<i>Na PDA podlozi izolati iz biljke <i>Abutilon theophrasti</i>:</i> askomata prečnika 200-360 × 295-450 vrat dužine 300-1200	25,1-42,0 × 4,2-8,3	8,0-13,1 × 2,5-4,4 dvoćelijske	<b>Vrandečić et al., 2005</b>
<i>Na APDA podlozi:</i> u grupi, retko pojedinačno askomata prečnika 180-420 × 180-450 vrat dužine 330-1100	29,5-36,0 × 5,3-6,8	9,47-10,7 × 2,6-4,1 dvoćelijske	<b>Medić-Pap, 2006</b>
<i>Na stablu biljke <i>Foeniculum vulgare</i>:</i> pojedinačno ili u grupi askomata prečnika 230-310 vrat dužine 330-520	24,0-35,0 × 6,5-10,5	8,2-10,1 × 2,2-2,9	<b>Santos et al., 2011</b>
<i>(nastavak na sledećoj strani)</i>			

Peritecije ( $\mu\text{m}$ )	Askusi ( $\mu\text{m}$ )	Askospore ( $\mu\text{m}$ )	Referenca
<b><i>Diaporthe phaseolorum var. meridionalis</i></b>			
<i>Na PDA podlozi:</i> pojedinačno ili u grupama askomata prečnika $257,0 \pm 44,0 \times 300,7 \pm 47,4$ vrat prečnika $103,6 \pm 14,3$ - $128,1 \pm 6,7$ , dužine $897 \pm 166$	$36,4 \pm 0,6 \times 6,8 \pm 0,2$	$9,6 \pm 0,2 \times 3,2 \pm 0,1$ dvočelijske	<b>Fernández &amp; Hanlin, 1996</b>
<i>Na APDA podlozi:</i> pojedinačno vrat prečnika $126,2 \pm 17,0$ , dužine $868 \pm 183$	dužine $36,7 \pm 4,7$	$10,2 \pm 1,0 \times 3,0 \pm 0,13$ dvočelijske	<b>Pioli et al., 1997</b>
<i>Na PDA podlozi:</i> pojedinačno askomata prečnika $200$ - $300 \times 250$ - $400$ vrat prečnika $85$ - $95$ , dužine $900$ - $1500$	$25,0$ - $37,5 \times 5,0$ - $7,5$	$10,0$ - $12,5 \times 2,5 \pm 4,0$ dvočelijske	<b>Asante &amp; Wolffhechel, 1998</b>
<i>Na WA + ovsene pahunjice podlozi;</i>		$9,5$ - $9,8 \times 3,1$ - $3,4$	<b>Li et al., 2004</b>
<i>Na PDA podlozi izolati iz biljke Aspalathus linearis:</i> pojedinačno askomata prečnika $500$ vrat prečnika $90$ - $150$ , dužine $800$ - $2000$	$52$ - $60 \times 7$ - $10$	$12,0$ - $16,0 \times 3,5$ dvočelijske	<b>Janse van Rensburg et al., 2006</b>

Prilog 2. Hronološki pregled morfoloških karakteristika anamornog stadijuma *Phomopsis*

Piknidi (µm)	α piknospore (µm)	β piknospore (µm)	Referenca
<b><i>Phomopsis phaseoli</i></b>			
<i>Na stablima pasulja:</i> konidiomata je loptasta	dužine 10-12 2 uljane kapi	nema	<b>Saccardo, 1884</b>
<i>Na starim stablima pasulja:</i> raspoređeni malje ili više u redove konidiomata prečnika 300-500	7,0-9,0 × 2,5-3,0 2-3 uljane kapi	nema	<b>Grove, 1917</b>
<i>Na mahunama lima pasulja:</i> konidiomata prečnika 142-276	6,4,0-8,0 × 2,4-3,6	nema	<b>Harter, 1917</b>
<b>Anamorfni stadijum gljive <i>Diaporthe phaseolorum</i> var. <i>caulivora</i></b>			
<i>Na KSP i Czapek podlozi:</i> konidiomata prečnika 170-230	6,2-10,0 × 2,5-3,8	nema	<b>Vidić, 1987</b>
<i>Na WA + sterilisana stabla soje i PDA podlozi;</i>	5,20 × 2,05	9,32 × 1,67	<b>Fernández &amp; Hanlin, 1996</b>
<b>Anamorfni stadijum gljive <i>Diaporthe phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i></b>			
<i>Na WA + sterilisana stabla soje i PDA podlozi;</i>	stvara	nema	<b>Fernández &amp; Hanlin, 1996</b>
<i>Na PDA podlozi;</i>	stvara	nema	<b>Vechiato et al., 2003</b>
<i>Na WA + ovsene pahunjice;</i>	stvara	nema	<b>Li et al., 2004</b>
<i>Na PDA podlozi:</i> vrat kratak, dužine do 200	3,75-12,5 × 1,25-2,5	nema	<b>Jaccoud-Filho &amp; Lee, 2004b</b>
<i>Na PDA podlozi;</i>	6-9 × 2-3	nema	<b>Janse van Rensburg et al., 2006</b>
<i>(nastavak na sledećoj strani)</i>			

Piknidi (µm)	α piknospore (µm)	β piknospore (µm)	Referenca
<b>Anamorfni stadijum gljive <i>Diaporthe phaseolorum</i> var. <i>sojae</i></b>			
Na mahunama lima pasulja: konidiomata prečnika 158-475 Na listovima i stablu lima pasulja: konidiomata prečnika 197,5-260,0	6,0-8,6 × 2,4-4,1 jednoćelijske, 2 uljane kapi	11,7-31,0 × 1,4-2,0 jednoćelijske, zakrivljene	<b>Harter, 1917</b>
Na stablima propalih kljanaca soje: rasute i uronjene u tkivo konidiomata prečnika 250	3,0-6,0 × 1,5-2,0	dužine 14-16	<b>Petch, 1922</b>
Na mahunama, stablu i listu soje: konidiomata prečnika 82-225 × 82-375 vrat jako kratak ili ga nema	6,27-7,15 × 2,18-2,31	duge, zakrivnjene	<b>Lehman, 1923</b>
Na paprici ( <i>Capsicum annum</i> ): konidiomata prečnika 200-300	7,2-9,2 × 2,2-3,2 jednoćelijske, 2 uljane kapi	Na PDA podlozi 14,6 × 1,5	<b>Tucker, 1935</b>
Na mahunama soje: konidiomata prečnika 177-313 × 190-490 vrat kratak ili ga nema Na stablu i listu: konidiomata prečnika 82-408 × 95-598 vrat kratak ili ga nema	4,5-9,8 × 1,1-3,9 jednoćelijske, 2, 3 ili 4 uljane kapi	9,0-21,0 × 0,8-1,8 jednoćelijske, zakrivljene	<b>Luttrell, 1947</b>
Na stablu lima pasulja: konidiomata veličine 122-326 × 136-490 vrat kratak ili ga nema	5,3-12,0 × 2,5-4,5	14,0-30,8 × 1,4	<b>Luttrell, 1947</b>
Na stablu i lisnim peteljka soje: konidiomata prečnika 98-385 × 112-542	4,9-9,8 × 1,8-3,2 jednoćelijske, 2 uljane kapi	14,1-35,1 × 1,2-1,7 jednoćelijske, zakrivljene	<b>Athow &amp; Caldwell, 1954</b>
Na PDA podlozi izolati iz biljke <i>L. corniculatus</i> :	7,5 × 3	16,6 × 1,6	<b>Anderegg, 1959</b> (navedeno u Kulik, 1984)
Na paprici: konidiomata prečnika 150-600	6-8 × 3	20-22	<b>Viégas, 1962</b>
Na PDA podlozi izolati iz biljke <i>L. corniculatus</i> : konidiomata prečnika 59-213 × 165-472	6,1-10,6 × 1,9-3,5 jednoćelijske	7,5-21,8 × 0,9-1,8 srpaste	<b>Whitehead, 1966</b>
<i>(nastavak na sledećoj strani)</i>			

Piknidi (µm)	α piknospore (µm)	β piknospore (µm)	Referenca
Na APDA podlozi: pojedinačno konidiomata prečnika 50-320 × 60-320	4,8-11,0 × 2,0-2,8	12,0-27,0 × 0,8-1,8	Kmetz, 1975 (navedeno u Kulik, 1984)
Na semenu soje na agaru: uronjeni u omotač semena konidiomata prečnika 140-300	4,5 × 1,5-3,0	17,2-30,0 × 0,75-1,5 ili ih nema	Mannerucci & Gambogi, 1978
Na PDA podlozi: vrat dužine do 200	5,6-10,3 × 1,5-3,4	obilno	Hobbs <i>et al.</i> , 1985
Na WA + stabla <i>Medicago sativa</i> ili stabla <i>Stokesia laevis</i> ;	6,0-9,0 × 1,5-3,0 jednoćelijske, 2 uljane kapi	12,0-30,0 × 0,75-1,5 zakrivljene	Uecker, 1989
Na WA + sterilisana stabla soje i PDA podlozi;	obilno	13,5 × 1,0	Fernández & Hanlin, 1996
Na PDA podlozi: pojedinačno ili u grupi ili imaju mali vrat dužine do 200 ili su bez vrata	6,0-11,25 × 1,25-3,75 jednoćelijske, 2 uljane kapi	12,5-32,6 × 1,25 jako zakrivljene na jednom kraju	Jaccoud-Filho & Lee, 2004a
Na APDA podlozi: vrat dužine 135 - 200	6,64-7,15 × 2,03-2,42 jednoćelijske, 2 uljane kapi	21,6-28,3 × 1,1-1,5 končaste, liče na zapete	Medić-Pap, 2006
Na stablu biljke <i>Foeniculum vulgare</i> : konidiomata prečnika 140-170 × 150-340	5,4-8,9 × 1,8-3,1 jednoćelijske, 2 uljane kapi	13,3-22,5 × 0,9-1,5	Santos <i>et al.</i> , 2011
<b><i>Phomopsis batatae</i></b>			
Na korenu slatkog krompira: u grupi Na stablu, lisnim peteljka i listu slatkog krompira: pojedinačni konidiomata prečnika 60-110 × 60-130	6-8 × 3-5 jednoćelijske, 2 uljane kapi	dužine 16-30 jednoćelijske	Harter & Field, 1913
(nastavak na sledećoj strani)			



Piknidi (µm)	α piknospore (µm)	β piknospore (µm)	Referenca
<b><i>Phomopsis longicolla</i></b>			
<i>Na PDA + sterilizovana stabla soje:</i> konidiomata prečnika 58-128 × 65-154	5,7-10,2 × 2,8-4,2 jednoćelijske, 2 uljane kapi	15,0-33,0 × 1,1-1,9 zakrivljene	<b>Athow &amp; Caldwell, 1954</b>
<i>Na PDA podlozi:</i> pojedinačno ili u grupi unilokularne ili multilokularne vrat dužine 200-500	5,6-10,3 × 1,5-3,4 jednoćelijske, 2 uljane kapi	retko u svežoj kulturi gljive	<b>Hobbs et al., 1985</b>
<i>Na PDA podlozi:</i> pojedinačno ili u grupi unilokularne ili multilokularne konidiomata prečnika 500 vrat dužine 210-422	5,86-8,61 × 2,48-2,78 jednoćelijske, 2 uljane kapi	nema	<b>Vidić et al., 1998</b>
<i>Zaraženo seme na APDA podlozi:</i> pojedinačno ili u grupi	4,5-11,0 × 1,5-3,5	7,5-35,0 × 0,8-1,8	<b>Walcott, 2010</b>
<i>Na PDA podlozi:</i> vrat dužine preko 200	4,16-11,37 × 1,14-4,36	nema	<b>Duvnjak, 2004</b>
<i>Na PDA podlozi:</i> pojedinačno ili u grupi unilokularne ili multilokularne vrat dužine preko 200	5,0-8,75 × 2,6-3,76 jednoćelijske, 2 uljane kapi	nema	<b>Jaccoud-Filho &amp; Lee, 2004a</b>
<i>Na APDA podlozi:</i> unilokularne ili multilokularne konidiomate prečnika 500 vrat dužine 225-440	6,04-7,15 × 2,17-2,75 jednoćelijske, 2 uljane kapi	nema	<b>Medić-Pap, 2006</b>
<i>Na APDA podlozi;</i>	4,05-7,57 × 1,48-3,25	formira, ali retko	<b>Cui et al., 2009</b>
<i>Na stablu biljke <i>Foeniculum vulgare</i>:</i> pojedinačno konidiomate prečnika 390-540 vrat dužine 290-790	5,9-8,1 × 1,8-2,4 jednoćelijske, 2 uljane kapi	nema	<b>Santos et al., 2011</b>

Prilog 3. Morfološke karakteristike patogena soje roda *Diaporthe/Phomopsis*

Naziv gljive	Micelija	Stroma	Piknidi	Piknospore		Peritecije
				$\alpha$	$\beta$	
<b><i>D. phaseolorum</i> var. <i>caulivora</i></b>	bela, zbijena, homotalusna; starenjem micelija menja boju u žuto-krem, braon ili crnu	crne boje; kružnog oblika; prečnik do 2 mm	retko	(+)	(-)	u grupi; dugi vratovi
<b><i>D. phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i></b>	bela, vunasta, homotalusna; starenjem micelija menja boju u mrko-žutu ili tamno braon	crne boje; nepravilnog oblika; prečnika 2-10 mm	pojedinačno; bez vrata	(+)	(-)	u grupi; dugi vratovi
<b><i>D. phaseolorum</i> var. <i>sojae</i></b>	bela, rastresita, homotalusna; starenjem micelija može da menja boju u različite nijanse sive ili braon boje	crne boje; nepravilnog oblika; prečnika 2-5 mm	pojedinačno ili u grupi; bez vrata	(+)	(+)	pojedinačno; dugi vratovi
<b><i>P. longicolla</i></b>	bela, gusta; starenjem - zelenkasto-žute površine	crne boje; izrazito razvijene; pločaste	pojedinačno ili u grupi; dugi vratovi	(+)	(-)	(-)

## BIOGRAFIJA

Kristina Petrović rođena je 05.09.1981. godine u Novom Sadu. Osnovnu i srednju školu završila je u rodnom gradu. Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Novom Sadu, smer Zaštita bilja, upisala je 2000. godine. Diplomski rad pod nazivom "Otpornost jarih genotipova pšenice prema obligatnim parazitima", odbranila je 2005. godine i diplomirala sa prosečnom ocenom 8,67. Iste godine upisala je postdiplomske studije na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu, smer Fitopatologija. Sve ispite predviđene planom i programom položila je sa prosečnom ocenom 10. Od 2006. godine je, kao stipendista Ministarstva za nauku i tehnološku razvoj, angažovana u Institutu za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu, a od 2008. godine zaposlena je kao istraživač pripravnik u Odeljenju za soju. Iste godine upisala je doktorke studije na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu, odsek Fitomedicina i sve ispite po planu i programu položila je sa prosečnom ocenom 10. Tokom 2010. i 2011. godine boravila je u *Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale* (CRA-PAV) u Rimu, Italija, na stručnom usavršavanju iz oblasti molekularne karakterizacije fitopatogenih gljiva. U zvanje istraživača saradnika izabrana je 2011. godine.

Autor i koautor je 16 naučnih i stručnih radova i učesnik na 3 projekta Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj. Govori engleski jezik.

## Izjava o autorstvu

Potpisana Kristina P. Petrović

Broj indeksa 08/23

### Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:


Morfološka, molekularna i patogena karakterizacija

vrsta *Diaporthe/Phomopsis* na soji u Srbiji

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

**Potpis doktoranta**

U Beogradu, 07. 06. 2012.



Kristina P. Petrović

## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Kristina P. Petrović

Broj indeksa 08/23

Studijski program Poljoprivredne nauke Modul: Fitomedicina

Naslov rada Morfološka, molekularna i patogena karakterizacija vrsta  
*Diaporthe/Phomopsis* na soji u Srbiji

Mentor dr Mirko Ivanović, redovni profesor

Potpisana Kristina P. Petrović

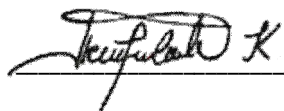
Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

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

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

**Potpis doktoranta**

U Beogradu, 07. 06. 2012.



## Izjava o korišćenju

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

Morfološka, molekularna i patogena karakterizacija

vrsta *Diaporthe/Phomopsis* na soji u Srbiji

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
- 3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade**
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

**Potpis doktoranta**

U Beogradu, 07. 06. 2012.

