



UNIVERZITET U NOVOM SADU  
POLJOPRIVREDNI FAKULTET



***Trichoderma harzianum* – bioagens u  
kontroli prouzrokovala ugljenaste truleži  
korena šećerne repe**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentori:

Prof. dr Vera Stojšin  
Prof. dr Dragana Budakov

Kandidat:

Aleksandra Stankov Petreš

Novi Sad, 2023. godine

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА<sup>1</sup>

Врста рада:	Докторска дисертација
Име и презиме аутора:	Александра Станков Петреш
Ментор (титула, име, презиме, звање, институција)	Др Вера Стојшин, редовни професор, Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет Др Драгана Будаков, ванредни професор, Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет
Наслов рада:	<i>Trichoderma harzianum</i> – биоагенс у контроли проузроковача угљенасте трулежи корена шећерне репе
Језик публикације (писмо):	Српски латиница
Физички опис рада:	Унети број: Страница 150 Поглавља 10 Референци 165 Табела 41 Слика 32 Графикона 6 Прилога 3
Научна област:	Биотехничке науке
Ужа научна област (научна дисциплина):	Фитопатологија
Кључне речи / предметна одредница:	<i>Macrophomina phaseolina</i> , <i>Trichoderma harzianum</i> , шећерна репа, биолошка контрола
Резиме на језику рада:	<p>Шећерна репа представља најважнију индустријску биљку за производњу шећера у умереном климатском појасу. Најзначајнији проузроковачи паразитних обољења корена шећерне репе су <i>Fusarium</i> spp., <i>Rhizoctonia solani</i>, док се последњих десет година <i>Macrophomina phaseolina</i> детектује као доминантни проузроковач трулежи корена, чије сузбијање представља веома велики изазов, јер не постоје ефикасни пестициди регистровани за ову намену.</p> <p>Циљеви овог рада су били да се утврди доминантни проузроковач трулежи корена шећерне репе, да се детектовањем разлика у патогеним, морфолошким и молекуларним карактеристикама прошири укупно знање о проузроковачу угљенасте трулежи, затим да се изолује биолошки агенс из земљишта и изврши његова молекуларна идентификација до нивоа врсте, као и да се у <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> испитивањима утврди потенцијал</p>

<sup>1</sup> Аутор докторске дисертације потписао је и приложио следеће Обрасце:

5б – Изјава о ауторству;

5в – Изјава о истоветности штампане и електронске верзије и о личним подацима;

5г – Изјава о коришћењу.

Ове Изјаве се чувају на факултету у штампаном и електронском облику и не кориче се са тезом.

	<p>биолошког агенса за даљу примену у сузбијању овог штетног обољења корена шећерне репе.</p> <p>Секвенцирањем умножених ITS региона потврђено је да изолати патогена прикупљених из узорака корена шећерне репе са различитих локалитета у Р. Србији припадају врсти <i>M. phaseolina</i>. Утврђено је да изолати имају најбржи пораст на КДА подлози, док је значајно мањи на МИН + КС<sub>2</sub>О<sub>3</sub>. На основу макроскопских морфолошких карактеристика патогена изолати су подељени у различите групе. На МИН + КС<sub>2</sub>О<sub>3</sub> подлози изолати <i>M. phaseolina</i> су испољили осетљивост на присуство хлора и подељени су у три групе. Утврђено је да постоје значајне разлике између изолат гајених на КДА подлози у димензијама микросклероција (од 112,50 x 105,00 µm до 167,50 x 147,50 µm). Оптимална рН вредност за пораст патогена је била рН 6. Оптималне температуре за раст и развој изолат <i>M. phaseolina</i> су 30 °C и 35 °C, док температуре испод 15 °C и изнад 40 °C представљају граничне вредности за раст изолат. Испитивање генетичког диверзитета изолат <i>M. phaseolina</i> помоћу SSR маркера утврђено је да се изолати нису груписали ни према патогеним као ни према морфолошким карактеристикама. Проучавањем карактеристика репродуктивних органа изолат биолошког агенса изолованог из узорака земљишта, утврђено је да припадају роду <i>Trichoderma</i>. Умножавањем ITS и TEF региона и њиховим секвенцирањем изолати су идентификовани као <i>Trichoderma harzianum</i>. Утврђено је да су сви тестирани изолати <i>T. harzianum</i> испољили антагонистички потенцијал и инхибирали пораст мицелије патогена у тесту двојне културе (процент инхибиције се кретао од 54,07 до 64,44%). Најјача инхибиција је забележена у третману са изолатом T2. Прегледом контакта мицелије антагониста и патогена утврђене су разлике у начину антагонистичког деловања изолат <i>T. harzianum</i> на патогена. Испарљива једињења која продукују изолати <i>T. harzianum</i> T2 и T12 инхибирају пораст колоније <i>M. phaseolina</i>. Утврђена је снажна инхибиција раста колонија тестираних изолат патогена применом биолошког агенса <i>Bacillus</i> sp. у <i>in vitro</i> огледу у свим тестираним концентрацијама. Најјача инхибиција забележена је код највиших концентрација (10 и 5%), док је при примени концентрација 2 и 1% такође забележен веома висок проценат инхибиције (67,8 - 75,7%). Испитивањем осетљивости изолат <i>M. phaseolina</i> на тиофанат-метил утврђено је да при концентрацијама од 1, 10 и 100 mg/l долази до потпуног престанка пораста изолат патогена. У <i>in vivo</i> експерименту је утврђено да седам дана након инокулације биљака шећерне репе долази до појаве карактеристичних симптома угљенасте трулежи. Примена изолат <i>T. harzianum</i> T2 и T12, појединачно или у комбинацији, значајно утиче на смањење индекса обољења биљака у поређењу са контролом. У случају биљака инокулисаних изолатом ŠR23/11 ефикасност примене хемијског третмана је била на истом нивоу значајности као и третман у ком је вршена примена комбинације два изолат <i>T. harzianum</i> (T2+T12), док је третман у ком је примењен изолат <i>T. harzianum</i> T2 испољио већу ефикасност у односу на примену хемијског третмана и забележен је значајно нижи индекс обољења. Препарати Trifender® Pro и Bacillomix® Original нису испољили задовољавајући ефекат у контроли проузроковача угљенасте трулежи у <i>in vivo</i> испитивању.</p>
Датум прихватања теме од стране надлежног већа:	17.07.2020.
Датум одбране: (Попуњава одговарајућа служба)	

<p>Чланови комисије: (титула, име, презиме, звање, институција)</p>	<p>Председник: Др Невена Нагл, научни саветник, Институт за ратарство и повртарство, Нови Сад</p> <hr/> <p>Ментор: Др Вера Стојшин, редовни професор, Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет</p> <hr/> <p>Ментор: Др Драгана Будаков, ванредни професор, Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет</p> <hr/> <p>Члан: Др Мила Граховац, ванредни професор, Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет</p> <hr/> <p>Члан: Др Живко Ђурчић, виши научни сарадник, Институт за ратарство и повртарство, Нови Сад</p> <hr/>
<p>Напомена:</p>	<p>УДК 582.661 (043.3)</p>

KEY WORD DOCUMENTATION<sup>2</sup>

Document type:	Doctoral dissertation
Author:	Aleksandra Stankov Petreš
Supervisor (title, first name, last name, position, institution)	Dr. Vera Stojšin, full professor, University of Novi Sad, Faculty of Agriculture Dr. Dragana Budakov, associate professor, University of Novi Sad, Faculty of Agriculture
Thesis title:	<i>Trichoderma harzianum</i> – bioagent in the control of the causal agent of sugarbeet charcoal root rot
Language of text (script):	Serbian language Latin script
Physical description:	Number of: Pages 150 Chapters 10 References 165 Tables 41 Illustrations 32 Graphs 6 Appendices 3
Scientific field:	Biotechnical sciences
Scientific subfield (scientific discipline):	Plant Pathology
Subject, Key words:	<i>Macrophomina phaseolina</i> , <i>Trichoderma harzianum</i> , sugar beet, biological control
Abstract in English language:	<p>Sugar beet is the most important industrial plant for sugar production in the temperate climate zone. The most important causal agents of sugar beet root rot are <i>Rhizoctonia solani</i>, <i>Fusarium</i> spp., while the causal agent of charcoal root rot <i>Macrophomina phaseolina</i> is the dominant pathogen. Control of this pathogen is a big challenge because there are no effective pesticides registered for this purpose.</p> <p>The goals of this work were to determine the dominant causal agent of sugar beet root rot, to expand overall knowledge about the causal agent of charcoal rot by detecting differences in pathogenic, morphological and molecular characteristics, to isolate the biological agent from the soil and conduct molecular identification, as well as to test the potential <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> for further use in the control of this important sugar beet pathogen.</p>

<sup>2</sup> The author of doctoral dissertation has signed the following Statements:

56 – Statement on the authority,

5B – Statement that the printed and e-version of doctoral dissertation are identical and about personal data,

5r – Statement on copyright licenses.

The paper and e-versions of Statements are held at the faculty and are not included into the printed thesis.

	<p>It was confirmed that pathogen isolates collected from sugar beet root samples from different localities in the Republic of Serbia belong to the species <i>M. phaseolina</i> by sequencing the amplified ITS regions. It was found that isolates have the fastest growth on the PDA medium, while it is significantly lower on MIN + KClO<sub>3</sub>. Based on the macroscopic morphological characteristics of the pathogen, the isolates were divided into different groups. On the MIN + KClO<sub>3</sub> medium, <i>M. phaseolina</i> isolates showed sensitivity to the presence of chlorine and were divided into three groups. It was found that there are significant differences between isolates grown on PDA media in the dimensions of microsclerotia (from 112.50 x 105.00 μm to 167.50 x 147.50 μm). The optimal pH value for the growth of the pathogen was pH 6. The optimal temperatures for the growth and development of <i>M. phaseolina</i> isolates are 30 and 35 °C, while temperatures below 15 °C and above 40 °C represent the limit values for isolates' growth. Examination of the genetic diversity of <i>M. phaseolina</i> isolates using SSR markers revealed that the isolates were not grouped either according to pathogenic or morphological characteristics. By studying the characteristics of the reproductive organs of the isolates of the biological agent isolated from soil samples, it was determined that they belong to the genus <i>Trichoderma</i>. By amplification of the ITS and TEF regions and their sequencing, the isolates were identified as <i>Trichoderma harzianum</i>. All tested isolates of <i>T. harzianum</i> showed antagonistic potential and inhibited the growth of pathogen mycelia in the dual culture test (inhibition percentage ranged from 54.07 to 64.44%). The strongest inhibition was recorded in the treatment with isolate T2. Differences in the mode of antagonistic action of <i>T. harzianum</i> isolates on the pathogen were determined by observing the contact line of the mycelia of the antagonist and the pathogen. Volatile compounds produced by isolates of <i>T. harzianum</i> T2 and T12 inhibit the growth of <i>M. phaseolina</i> colonies. Strong inhibition of the growth of the colonies of the tested pathogen isolates was determined by the use of the biological agent <i>Bacillus</i> sp. in an <i>in vitro</i> experiment in all tested concentrations. The strongest inhibition was recorded at the highest concentrations (10 and 5%), while a very high percentage of inhibition was also recorded at concentrations of 2 and 1% (67.8 - 75.7%). By examining the sensitivity of <i>M. phaseolina</i> isolates to thiophanate-methyl, it was determined that at concentrations of 1, 10 and 100 mg/l there is a complete cessation of growth of pathogen isolates. In <i>in vivo</i> experiment, it was determined that characteristic symptoms of charcoal rot appear seven days after inoculation. The use of T2 and T12 isolates of <i>T. harzianum</i>, individually or in combination, significantly reduces the plant disease index compared to the control. In the case of plants inoculated with isolate ŠR23/11, the effectiveness of chemical treatment was at the same level of significance as the treatment in which a combination of two isolates of <i>T. harzianum</i> (T2+T12) was applied, while the treatment in which the isolate <i>T. harzianum</i> T2 was applied expressed greater efficiency compared to the application of chemical treatment and a significantly lower disease index was recorded. Trifender® Pro and Bacillomix® Original did not show a satisfactory effect in the control of the causal agent of charcoal root rot <i>in vivo</i>.</p>
Accepted on Scientific Board on:	17.07.2020.
Defended: (Filled by the faculty service)	

<p>Thesis Defend Board: (title, first name, last name, position, institution)</p>	<p>President: Dr. Nevena Nagl, principal research fellow, Institute of field and vegetable crops, Novi Sad</p> <p>_____</p> <p>Mentor: Dr. Vera Stojšin, full professor, University of Novi Sad, Faculty of Agriculture</p> <p>_____</p> <p>Mentor: Dr. Dragana Budakov, associate professor, University of Novi Sad, Faculty of Agriculture</p> <p>_____</p> <p>Member: Dr. Mila Grahovac, associate professor, University of Novi Sad, Faculty of Agriculture</p> <p>_____</p> <p>Member: Dr. Živko Čurčić, senior research associate, Institute of field and vegetable crops, Novi Sad</p> <p>_____</p>
<p>Note:</p>	<p>UDC 582.661 (043.3)</p>

### *Zahvalnica*

*Želim posebno da se zahvalim mojim mentorima prof. dr Veri Stojšin i prof. dr Dragani Budakov koje su me uvele u naučnoistraživački rad, i rukovodile izradom doktorske disertacije, a posebno hvala na velikoj podršci i poverenju.*

*Najlepše hvala dr Neveni Nagl na prenesenom znanju, kao i na dragocenim savetima koji su značajno doprineli kvalitetu ove disertacije.*

*Veoma sam zahvalna prof. dr Mili Grahovac i dr Živku Ćurčiću, na neizmernoj pomoći i korisnim savetima tokom izvođenja oglada i pisanja disertacije.*

*Zahvaljujem se i svojim dragim kolegama Jeleni Vukotić, Tatjani Dudaš, Marti Loc, Zagorki Savić i Jeleni Kalajžić na saradnji, pomoći i lepom druženju tokom svih ovih godina.*

*Posebnu zahvalnost dugujem mojim roditeljima Zorici i Vitomiru, suprugu Mladenu i sinu Davidu na безусловnoj ljubavi, podršci, razumevanju i motivaciji da istrajem u svojim željama.*



# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE.....	3
2.1. Prouzrokovatelj ugljenaste truleži korena šećerne repe – <i>Macrophomina phaseolina</i> .....	3
2.1.1. Taksonomija vrste.....	3
2.1.2. Rasprostranjenost i ekonomski značaj.....	4
2.1.3. Morfologija patogena.....	4
2.1.4. Ciklus razvoja.....	5
2.1.5. Simptomi.....	6
2.2. Genetička istraživanja <i>M. phaseolina</i> .....	7
2.2.1. Mikrosatelitski molekularni markeri.....	8
2.3. Mogućnosti suzbijanja <i>M. phaseolina</i> .....	9
2.3.1. Agrotehničke mere zaštite.....	9
2.3.2. Hemijske mere zaštite.....	10
2.3.3. Biološke mere zaštite.....	11
2.3.3.1. Primena vrsta iz roda <i>Bacillus</i> .....	11
2.3.3.2. Primena vrsta iz roda <i>Trichoderma</i> .....	12
3. ZADACI I CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	15
4. RADNE HIPOTEZE.....	16
5. MATERIJAL I METODE.....	17
5.1. Izolacija patogena i dobijanje čistih kultura.....	17
5.2. Dobijanje čistih kultura monohifalnih izolata patogena i njihovo čuvanje.....	18
5.3. Provera patogenosti izolata <i>M. phaseolina</i> .....	19
5.4. Određivanje brzine porasta i morfološko - odgajivačkih karakteristika izolata <i>M. phaseolina</i> .....	21
5.4.1. Brzina porasta izolata <i>M. phaseolina</i> .....	21
5.4.2. Morfološke karakteristike izolata <i>M. phaseolina</i> .....	21
5.4.3. Uticaj pH vrednosti sredine i temperature na porast izolata <i>M. phaseolina</i> .....	23
5.5. Izolacija biološkog agensa i dobijanje čistih kultura.....	23
5.6. Molekularna identifikacija izolata.....	25
5.6.1. Ekstrakcija DNK patogena i biološkog agensa.....	25
5.6.2. Identifikacija izolata <i>M. phaseolina</i> i <i>Trichoderma</i> spp. molekularnim metodama...	27
5.6.2.1. Amplifikacija fragmenta ITS regiona <i>M. phaseolina</i> .....	27
5.6.2.2. Amplifikacija fragmenta ITS regiona <i>Trichoderma</i> spp.....	28

5.6.2.3. Amplifikacija fragmenta TEF-1 $\alpha$ gena <i>Trichoderma</i> spp.....	29
5.6.3. Utvrđivanje genetičke varijabilnosti izolata <i>M. phaseolina</i> pomoću SSR markera ...	29
5.6.4. Ekstrakcija i prečišćavanje PCR produkata .....	33
5.6.5. Sekvenciranje .....	34
5.7. Osetljivost izolata <i>M. phaseolina in vitro</i> .....	35
5.7.1. Osetljivost <i>M. phaseolina</i> prema tiofanat-metilu.....	35
5.7.2. Osetljivosti <i>M. phaseolina</i> prema <i>Bacillus</i> sp.....	36
5.7.3. Osetljivost <i>M. phaseolina</i> prema <i>Trichoderma</i> spp.....	36
5.7.3.1. Test dvojne kulture .....	36
5.7.3.2. Test isparljivih jedinjenja.....	37
5.8. Osetljivost izolata <i>M. phaseolina in vivo</i> .....	38
5.9. Analiza podataka.....	42
6. REZULTATI.....	43
6.1. Izolacija patogena i dobijanje čistih kultura .....	43
6.2. Provera patogenosti izolata <i>M. phaseolina</i> .....	46
6.3. Određivanje brzine porasta i morfološko - odgajivačkih karakteristika izolata <i>M. phaseolina</i> .....	49
6.3.1. Brzina porasta izolata <i>M. phaseolina</i> .....	49
6.3.2. Morfološke karakteristike izolata <i>M. phaseolina</i> .....	52
6.3.3. Odgajivačke karakteristike izolata <i>M. phaseolina</i> .....	58
6.3.3.1. Uticaj pH vrednosti i temperature na porast izolata <i>M. phaseolina</i> .....	58
6.4. Izolacija biološkog agensa i dobijanje čistih kultura .....	66
6.5. Amplifikacija ITS regiona ispitivanih izolata i identifikacija <i>M. phaseolina</i> .....	68
6.5.1. Analiza sekvenci ITS regiona izolata <i>M. phaseolina</i> .....	68
6.6. Amplifikacija ITS regiona ispitivanih izolata i identifikacija <i>Trichoderma</i> spp. ....	72
6.6.1. Analiza sekvenci ITS regiona izolata <i>Trichoderma</i> spp. ....	72
6.7. Amplifikacija TEF-1 $\alpha$ gena ispitivanih izolata i identifikacija <i>Trichoderma</i> spp. ....	74
6.7.1. Analiza sekvenci TEF-1 $\alpha$ gena izolata <i>Trichoderma</i> spp. ....	75
6.8. Utvrđivanje genetičke varijabilnosti izolata <i>M. phaseolina</i> pomoću SSR markera .....	78
6.9. Osetljivost izolata <i>M. phaseolina in vitro</i> .....	80
6.9.1. Osetljivost <i>M. phaseolina</i> prema tiofanat-metilu.....	80
6.9.2. Osetljivosti <i>M. phaseolina</i> prema <i>Bacillus</i> sp.....	82
6.9.3. Osetljivost <i>M. phaseolina</i> prema <i>Trichoderma harzianum</i> .....	84
6.9.3.1. Test dvojne kulture .....	84
6.9.3.2. Test isparljivih jedinjenja.....	87

---

6.10. Osetljivost izolata <i>M. phaseolina in vivo</i> .....	89
7. DISKUSIJA .....	95
7.1. Simptomi bolesti .....	95
7.2. Provera patogenosti izolata .....	95
7.3. Morfološko - odgajivačke karakteristike izolata <i>M. phaseolina</i> .....	96
7.4.1. Utvrđivanje genetičke varijabilnosti izolata <i>M. phaseolina</i> pomoću SSR markera ...	98
7.5. Osetljivost izolata <i>M. phaseolina in vitro</i> .....	99
7.5.1. Osetljivost <i>M. phaseolina</i> prema tiofanat-metilu .....	99
7.5.2. Osetljivosti <i>M. phaseolina</i> prema <i>Bacillus</i> sp .....	99
7.5.3. Osetljivost izolata <i>M. phaseolina</i> prema <i>Trichoderma harzianum</i> .....	100
7.6. Osetljivost izolata <i>M. phaseolina in vivo</i> .....	102
8. ZAKLJUČAK .....	105
9. LITERATURA .....	108
10. PRILOZI .....	126

## 1. UVOD

Šećerna repa (*Beta vulgaris*) predstavlja najznačajniju industrijsku biljku za proizvodnju šećera u umerenom klimatskom pojasu. Ova dvogodišnja biljna vrsta pripada porodici Chenopodiaceae, rodu *Beta*. U toku prve godine stvara se koren bogat hranljivim materijama i lisna rozeta, dok se tokom druge godine obrazuje cvetno stablo, cvet i plod. Prema podacima FAO (Food and Agriculture Organisation) tokom 2019. godine šećerna repa je uzgajana na površini od 4,6 miliona hektara u svetu pri čemu je vodeća zemlja u proizvodnji bila Rusija sa prinosom od preko 54 miliona tona. Takođe, značajni proizvođači ove biljne vrste su Francuska, Nemačka, SAD, Turska, Poljska, Kina itd. (FAOSTAT, 2019). Tokom 2021. godine u Republici Srbiji šećerna repa se gajila na 39.411 ha sa prosečnim prinosom od 51,97 t/ha (RZS, 2022).

Uticaj klimatskih promena na biljnu proizvodnju se može uočiti širom sveta, uključujući i naše podneblje (Olesen i sar., 2011). Iz pomenutog razloga, proizvodnja šećerne repe u našoj zemlji je suočena sa velikim izazovima. Najznačajniji prouzrokovaci parazitnih oboljenja korena šećerne repe su *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani*, dok se poslednjih deset godina *Macrophomina phaseolina*, prouzrokovac ugljenaste truleži korena šećerne repe, detektuje kao dominantni prouzrokovac truleži korena. Ekstremno topla i sušna leta su dovela do stvaranja povoljnih uslova za razvoj pomenute fitopatogene gljive koja ima tendenciju da postane veliki problem u proizvodnji ove ratarske vrste, pogotovo kada se uzgaja u uslovima suvog ratarenja (Stojšin i sar., 2011).

U literaturi je dostupno veoma malo informacija o merama koje se primenjuju za zaštitu useva šećerne repe od prouzrokovaca ugljenaste truleži korena. Primena fungicida u suzbijanju ovog oboljenja ne predstavlja efikasnu i ekonomski opravdanu meru. Sa druge strane, fungicidi mogu da naruše balans korisnih mikroorganizama u zemljištu, a njihove rezidue dovode do zagađenja životne sredine (Anis i sar., 2010; Kumari i sar., 2012). Biološki agensi kao što su vrste iz rodova *Trichoderma* i *Bacillus* se najčešće upotrebljavaju u biološkoj borbi protiv zemljišnih patogena (Sabate i sar., 2019; Torres i sar., 2016). Smatra se da do neke mere mogu da zamene primenu fungicida, a takođe igraju važnu ulogu u "eco-friendly" sistemima biljne proizvodnje

(Khaledi i Taheri 2016; Pastrana i sar., 2016). Antagonistička svojstva ovih vrsta su bazirana na kompeticiji za hranljive materije i prostor, kao i na sposobnosti ovih agenasa da parazitiraju neke vrste fitopatogenih gljiva (Benitez i sar., 2004). Postoje navodi da *Trichoderma* spp. uspešno suzbijaju veliki broj patogena kao što su: *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani* (Hjeljord i sar., 2000; Desai i sar., 2002; Pastrana i sar., 2016). Veliki potencijal ovih bioloških agenasa u kontroli *M. phaseolina* je utvrđen na biljkama soje (Taliei i sar., 2013; Vasebi i sar., 2013) dok prema dostupnoj literaturi još uvek nema informacija o sprovedenim istraživanjima na biljkama šećerne repe.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Prouzrokovatelj ugljenaste truleži korena šećerne repe – *Macrophomina phaseolina*

#### 2.1.1. Taksonomija vrste

*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidonich. (sin. *Macrophomina phaseoli* (Maubl.) Ashby; *Rhizoctonia bataticola* (Taub.) Butler.; *Sclerotinium bataticola* Taub.) – prouzrokovatelj ugljenaste truleži biljaka je zemljišna fitopatogena gljiva koja pripada razdelu *Ascomycota*. Ovu fitopatogenu gljivu katarakteriše stvaranje piknida i sklerocija u tkivu domaćina kao i na hranljivoj podlozi. Piknidijski stadijum je 1901. godine nazvan *Macrophomina phaseolina* od strane Tassi, a 1905. godine *Macrophomina phaseoli* od strane Maublanc. Tokom 1927. godine, Ashby zadržava ime *M. phaseolina*, dok se tokom 1981. godine u literaturi pojavljuje ime *Tiarosporrella phaseolina*, kako je Van der Aa označio vrstu. Drugi autori navode da postoji telemorfni stadijum nazvan *Orbilia obscura* (Ghosh i sar., 1964), međutim i pored pomenutih navoda do danas telemorfni stadijum ovog patogena nije određen. Stadijum sklerocija je po prvi put opisan od strane Halsteda pod nazivom *Rhizoctonia bataticola* (Taub), dok je prema Dhingra i Sinclair (1978) ista gljiva izolovana sa kravljeg graška (*Vigna unguiculata*) u Indiji 1912. godine i tada nazvana *Sclerotium bataticola*. Crous i sar. (2006) navodi da iako je telemorfni stadijum ove gljive nepoznat, ona se svrstava u familiju *Botryosphaeriaceae*.

Trenutno nema podvrsta ili fizioloških rasa zasnovanih na morfološkim ili genomskim karakteristikama. Međutim tokom proteklih godina izolovane su dve nove vrste *Macrophomina pseudophaseolina* i *Macrophomina euphorbiicola*. *M. pseudophaseolina* je prvi put detektovana u Senegalu (Sarr i sar., 2014), a izolovana je sa 10 biljnih vrsta uključujući kikiriki i kravljeg grašak (Farr i Rossman, 2021). Kouadri i sar. (2021) navode da su izolovali ovu vrstu sa sočiva, dok je vrsta *M. euphorbiicola* prvo detektovana na biljkama ricinusa u Brazilu (Machado i sar., 2019).

### 2.1.2. Rasprostranjenost i ekonomski značaj

*M. phaseolina* je široko rasprostranjena u celom svetu, a posebno u područjima sa tropskom i suptropskom klimom (Wrather i sar., 2001). Ova gljiva je polifagna i parazitira preko 500 biljnih vrsta, uključujući brojne ekonomski važne vrste kao što su šećerna repa, kukuruz, suncokret, soja i dr. (Marić, 1974; Khan, 2007; Salik, 2007; Balaž i sar., 2010). Bolest je prisutna i u našoj zemlji, a posebno se pojavljuje u toku sušnih godina. Na šećernoj repi u Srbiji je opisana početkom šezdesetih godina prošlog veka u području severnog i centralnog Banata i od tada se javlja u jačem ili slabijem intenzitetu. Godine koje su bile zapamćene po velikom intenzitetu truleži korena šećerne repe u Vojvodini su bile 1967, 1971 1992, 1995, 2003, 2009 i 2017 (Marić, 1974; Stojšin i sar., 2012; Stojšin i sar., 2018). Najveće štete u toku vegetacije nastaju u periodu ekstremno visokih temperatura, kada su biljke izložene uslovima stresa zbog suše (Stojšin i sar., 1999). Pored šećerne repe značajne štete su zabeležene na biljkama soje i suncokreta. Tokom 1961. godine prinos suncokreta je smanjen do 25%, a takođe su slične iste štete zabeležene u usevu soje (Aćimović, 1962; Aćimović, 1988). U SAD *M. phaseolina* je svrstana u grupu najznačajnijih patogena soje, gde je zbog pojave ovog oboljenja tokom 2003. godine prinos ove biljne vrste znatno smanjen (Yang i Navi, 2005). Wrather i Koenning (2006) navode velike ekonomske gubitke u periodu 2003-2005. godine u usevu soje. Uzimajući u obzir pojavu sve toplijih i sušnijih leta ova fitopatogena gljiva ima tendenciju da postane veoma ozbiljan problem u biljnoj proizvodnji što je direktna posledica klimatskih promena, pa se zbog toga u literaturi često sreće pod nazivom „patogen globalnog zagrevanja“ (Mahdizadeh i sar., 2011).

### 2.1.3. Morfologija patogena

Prouzrokovala ugljenaste truleži karakterišu hife sa tankim zidovima i poprečnim septama. Ogranci iz glavne hife se uglavnom formiraju pod pravim uglom na roditeljskoj hifi sa suženjem na mestu nastanka. Piknidi se veoma retko mogu zapaziti, u prirodnim uslovima su krupniji od mikrosklerocija, tamno braon do crne boje, okruglog do nepravilnog oblika (Lakhran i sar., 2018). Prema istraživanju Waseer i sar. (1990) najpogodnija podloga za rast patogena je KDA (krompir-dekstrozni agar) podloga. Boja kolonija varira od svetlosive do tamne, dok se vazдушna micelija razvija samo kod nekih izolata gljive (Hartman i sar., 1999). Na pomenutoj podlozi stvaranje

mikrosklerocija je obilno, one mogu biti okrugle do nepravilnog oblika veličine od 50 do 150  $\mu\text{m}$ , crne su boje i bogate uljima (Dhingra i Sinclair, 1978). Sastoje se od 50-200 grupisanih ćelija (Short i Wyllie, 1978). Produkcija piknida je moguća jedino pri specifičnim uslovima, ali njihova uloga u epidemiologiji patogena nije u potpunosti razjašnjena (Mihail i Taylor, 1995; Gaetant i sar., 2006). Piknidi su crne boje, loptastog oblika veličine od 100 do 200  $\mu\text{m}$ , dok se u njima se obrazuju jednoćelijske piknospore elipsoidnog oblika veličine 20-24 x 7-9  $\mu\text{m}$  (Dhingra i Sinclair, 1978).

#### **2.1.4. Ciklus razvoja**

Patogen se održava pretežno u zemljištu, u zaraženim ostacima biljaka u vidu micelije i mikrosklerocija. Na hranljivoj podlozi piknidi se mogu formirati samo u specijalnim uslovima inkubacije, dok se u prirodnim uslovima u samom tkivu domaćina ova pojava veoma retko dešava, pa je samim tim i njihova uloga manje značajna. Nedostatak vode i povećana temperatura zemljišta su uslovi koji favorizuju razvoj ovog oboljenja (Stojšin i sar., 2011). Mikrosklerocije u zemljištu, inficiranom semenu ili biljnom tkivu služe kao primarni inokulum. Eksudati korenovog sistema mladih biljaka indukuju klijanje mikrosklerocija (Ghosh i sar., 2018). Do prodiranja patogena u koren dolazi tako što gljiva formira apresorije kojima se vezuje i pričvršćuje na epidermalne ćelije biljke i tako vrši infekciju, drugi način je kroz same prirodne otvore na biljnom tkivu dok patogen najčešće prodire preko povreda i oštećenja na biljnom tkivu. Hife gljive prodiru u vaskularni sistem korena i formiraju mikrosklerocije koje dovode do začepjenja sprovodnih sudova u biljkama. Kod inficiranih biljaka dolazi do pojave karakterističnih simptoma u vidu nekroze tkiva i sušenja biljaka. Nakon uginuća biljaka (Slika 1), kolonizacija biljnog tkiva se nastavlja kao i formiranje mikrosklerocija sve do momenta potpunog isušivanja tkiva. Mikrosklerocije se oslobađaju u zemljište u kom zadržavaju vitalnost duži niz godina, zavisno od uslova sredine u kojoj se nalaze (Stojšin i sar., 1999; Mayek-Perez i sar., 2002).





Slika 1. Kompletna nekroza šećerne repe u polju (Original)

### 2.1.5. Simptomi

Početni simptomi ugljenaste truleži biljaka šećerne repe se primećuju u polju u vidu uvenuća i poleganja nadzemne mase biljaka, dok se pri vađenju zaraženog korena može jasno uočiti nekroza biljnog tkiva sivo mrke do crne boje sa karakterističnim plavičastim odsjajem na površini. Patološke promene mogu nastati na repu, bočnom delu i glavi korena. Unutrašnjost tkiva postaje suđeraste konzistencije, bleđožute do tamnije žute boje da bi na kraju dobila tamnu boju. Na preseku korena uočava se obolelo tkivo karakteristične žute do braon boje (Slika 2). Takođe, primećeno je i stvaranje beličaste micelije na površini korena u poodmaklom razvoju bolesti. Takav koren je najčešće smežuran i u potpunosti nekrotiran. Ispod epidermisa na poprečnom preseku korena mogu se uočiti mnogobrojna crna telašca koja predstavljaju mikrosklerocije patogena (Stojšin, 2003).



Slika 2. Simptom ugljenaste truleži na uzdužnom preseku korena šećerne repe (Original)

## 2.2. Genetička istraživanja *M. phaseolina*

Genetički diverzitet izolata *M. phaseolina* je široko ispitivan primenom molekularnih markera. Molekularni markeri predstavljaju moćan alat za procenu genetičke varijabilnosti i određivanje genetskih odnosa unutar i između vrsta. Shodno tome za ispitivanje diverziteta ove vrste su korišćene različite vrste molekularnih metoda (Chakravarthi i Naravaneni, 2006), kao što su nasumično umnožena polimorfna DNK (RAPD) i mikrosateliti (SSR). Obe vrste DNK markera su se pokazale kao veoma korisne u otkrivanju varijabilnosti ove fitopatogene gljive s obzirom da se restrikciona analiza ITS regiona nije pokazala kao pogodna za otkrivanje genetičke varijabilnosti izolata *M. phaseolina* (Su i sar., 2001). Iako polna reprodukcija kod *M. phaseolina* nije prisutna, rezultati različitih istraživanja pokazuju visok stepen genetičke varijabilnosti između izolata ove fitopatogene gljive. Almeida i sar. (2003) ovu činjenicu objašnjavaju time da je moguće da dolazi do fuzije ćelija različitih hifa i da se formiraju heterokarioni koji doprinose pojavi uočene varijabilnosti.

### 2.2.1. Mikrosatelitski molekularni markeri

Mikrosateliti (simple sequence repeats - SSRs) predstavljaju jednostavne ponavljajuće sekvence u DNK lancu. Mikrosateliti se sastoje od 1-13 baznih parova koji mogu biti ponovljeni i do 100 puta u genomu (Debrauwere i sar., 1997; Chambers i MacAvoy, 2000). Mikrosateliti spadaju u jedne od najvarijabilnijih DNK sekvenci u genomu i široko su zastupljeni duž celog genoma eukariota (Ellegren, 2004). Osobine mikrosatelita kao što su: visok nivo prisustva u genomima, polimorfnost, visoka reproducibilnost, mali troškovi nakon izolacije, kao i laka upotreba čine ovaj tip molekularnih markera poželjnim u mnogim istraživanjima. Pokazali su se korisni u konstrukciji genetičkih mapa, pozicioniranju pojedinih gena, utvrđivanju očinstva, identifikaciji individua, forenzici, ispitivanju demografskih procesa, konzervacionoj biologiji, studijama evolucije čoveka, kao i dijagnostici različitih bolesti. U populacionoj genetici predstavljaju jedne od najpopularnijih i najinformativnijih molekularnih markera (Ellegren, 2004; Fan i Chu, 2007; Bhargava i Fuentes, 2010).

Brojne studije ukazuju na efikasnost primene mikrosatelitskih markera u ispitivanju genetičke varijabilnosti izolata *M. phaseolina* (Jana i sar., 2005; Sánchez i sar., 2017). Najčešće korišćeni pokazatelji genetičke varijabilnosti u istraživanjima baziranim na polimorfizmu molekularnih markera su: broj alela po lokusu, i broj efektivnih alela, očekivana heterozigotnost (Nei, 1973) i Shannonov indeks (Shannon i Weaver, 1949). Shodno tome, ova metoda je našla primenu u proučavanju genetičke varijabilnosti različitih biljnih patogenih gljiva uključujući *Ascochita rabiei*, *Ceratocystis fimbriata*, *M. phaseolina*, *Puccinia graminis*, *Sclerotinia subarctica* i *S. sclerotiorum* (Bayraktar i sar., 2007; Szabo, 2007; Jana i sar., 2005; Winton i sar., 2007; Marulanda i sar., 2014).

Jana i sar. (2005) su među prvima primenili ovu metodu kako bi izvršili karakterizaciju izolata prouzrokovala ugljenaste truleži soje i pamuka. Njihovi rezultati su pokazali da upotreba penta-, tetra- i tri- nukleotidnih prajmera otvara nove mogućnosti u proceni genetičke varijabilnosti izolata *M. phaseolina* i čini ih veoma korisnim za dalja epidemiološka istraživanja. Primenom mikrosatelitskih markera u identifikaciji patogena omogućeno je bolje razumevanje veze između izolata poreklom sa različitih domaćina (Powell i sar., 1996; Yamamoto i sar., 2001). Takođe, Ariasa i sar. (2011) su radili na izolaciji specifičnih mikrosatelita iz izolata *M. phaseolina*.

Ova studija je obezbedila 147 novih mikrosatelitskih markera koji su značajno pospešili i unapredili dalja molekularna ispitivanja, a isto tako i dali priliku za detaljnija ispitivanja odnosa i procesa koji se dešavaju između patogena i biljke domaćina. U SAD prvi korak u primeni mikrosatelitskih markera u proučavanju genetičke varijabilnosti izolata poreklom sa različitih lokaliteta i izolovanih sa različitih biljaka su načinili Baird i sar. (2010). Njihovi rezultati ukazuju na to da se razvijeni molekularni markeri mogu koristiti u budućim populacionim i genetičkim studijama kako roda *Macrophomina* tako i drugih rodova unutar familije *Botryosphaeriaceae*.

## 2.3. Mogućnosti suzbijanja *M. phaseolina*

Suzbijanje prouzrokovača ugljenaste truleži korena šećerne repe predstavlja veliki izazov tokom proizvodnje. Pregledom literature može se primetiti da je dostupno veoma malo informacija o merama koje se primenjuju za zaštitu useva šećerne repe od ove fitopatogene gljive, dok adekvatne mere zaštite useva predstavljaju glavni preduslov za dobijanje kvalitetnih poljoprivrednih proizvoda. Uzimajući u obzir prirodu samog patogena, a samim tim i velike poteškoće u njegovom suzbijanju, neophodno je primeniti integralni pristup u zaštiti useva, kako bi se što efikasnije upravljalo ovom fitopatogenom gljivom.

### 2.3.1. Agrotehničke mere zaštite

Pravilna primena agrotehničkih mera predstavlja polaznu tačku u kontroli biljnih patogena. Plodored predstavlja jednu od najznačajnijih i osnovnih agrotehničkih mera koja se sprovodi u cilju smanjenja količine inokuluma u zemljištu. Značajno je napomenuti da je rotaciju potrebno vršiti među usevima koji nisu domaćini prouzrokovača ugljenaste truleži. Francl i sar. (1988) u svojim istraživanjima dolaze do zaključka da je gustina inokuluma u zemljištu bila manja na onim parcelama gde je soja bila ređe u plodoredu. Rothrock i Hargrove (1988) navode da mehanička obrada zemljišta utiče na gustinu populacije patogena u sloju zemljišta do 15 cm, oni su u svojim istraživanjima došli do saznanja da su mehanički obrađivane parcele imale manju koncentraciju inokuluma od parcela koje nisu mehanički obrađivane. Takođe, održavanjem optimalne vlažnosti zemljišta može se značajno smanjiti infekcija biljaka. Naime, vlažnost zemljišta iznad 60% smanjuje pojavu bolesti (Kendig i sar., 2000; Jordaan i sar., 2019). Chamorro i sar. (2015) navode

da je solarizacija dala pozitivne efekte u redukciji populacije mikrosklerocija u zemljištu. Oni su sprovedli brojna istraživanja u usevu jagode i došli do saznanja da je intenzitet pojave ugljenaste truleži na tretiranim parcelama bio na znatno nižem nivou. Solarizacija predstavlja metodu za suzbijanje patogena u zemljištu koja je zastupljena u mnogim državama, međutim ovaj metod dezinfekcije zemljišta je efikasan u smanjenju populacije patogena samo u gornjem sloju zemljišta, stoga je potrebno primeniti i druge mere borbe kako bi se smanjila koncentracija inokuluma i u dubljim slojevima zemljišta. Isto tako, sterilizacija zemljišta vodenom parom je jedna od preventivnih mera koja se koristi za smanjenje koncentracije inokuluma u zemljištu, međutim nedostatak ove metode je u tome što nije pogodno za korišćenje na većem prostoru kao i visoka cena investicije. Pored navedenih mera, izbalansirano đubrenje i optimalan broj biljaka u usevu doprinose boljoj vitalnosti biljaka, a samim tim povećavaju imunitet i odbrambeni mehanizam prema bolestima. S druge strane, đubrenje azotom favorizuje razvoj infekcije, dok đubrenje fosforom smanjuje pojavu oboljenja (Spagnoletti i sar., 2020).

### 2.3.2. Hemijske mere zaštite

Hemijske mere kontrole *M. phaseolina* su teške i izazovne, s obzirom na to da ni jedan fungicid nije registrovan za suzbijanje ovog patogena. U literaturi postoje navodi o efikasnosti sistemskih i nesistemskih fungicida kao što su: karbendazim, difenokonazol, benomil, azoksistrobin i tiofanat-metil u *in vitro* i *in vivo* ispitivanjima na različitim biljnim vrstama (Cohen i sar., 2012; Tonin i sar., 2013; Parmar i sar., 2017; Lokesh i sar., 2020). Pawar i sar. (2015) i Athira (2017) navode da se upotreba pesticida i biofungicida u soji pokazala kao efikasna mera protiv patogena ako se primenjuje pre setve direktno na zemljište, ili ako se vrši tretman semena. Iako je dokazano da su pesticidi efikasni u borbi protiv ovog patogena, njihova primena ne predstavlja opravdanu meru kako sa strane ekonomskog aspekta, tako i sa aspekta zaštite životne sredine. Njihov negativni uticaj na korisne mikroorganizme u zemljištu dovodi do narušavanja normalnog funkcionisanja ekosistema. Zatim, prekomerna i neopravdana upotreba fungicida može da dovede do pojave rezistentnosti patogena. Takođe, mnoge komponente ovih preparata imaju tendenciju da opstanu u zemljištu tokom dužeg vremenskog perioda i da na taj način utiču loše kako na životnu sredinu tako i na ljudsko zdravlje (Hai i sar., 2012).

### 2.3.3. Biološke mere zaštite

U današnje vreme, sve su intenzivnija proučavanja mogućnosti primene antagonističkih sojeva gljiva i bakterija u suzbijanju prouzrokovaca biljnih oboljenja kako bi se smanjila upotreba sintetičkih fungicida (Reznikov i sar., 2016; Swamy i sar., 2018). Ovaj način zaštite useva može imati veoma važnu ulogu u „eco-friendly“ poljoprivrednim sistemima i u poslednje vreme sve više dobija na popularnosti. Biološko suzbijanje *M. phaseolina* uglavnom se zasniva na primeni antagonističkih sojeva gljiva i bakterija iz rodova *Trichoderma* i *Bacillus* (Pastrana i sar., 2016; Rangel-Montoya i sar., 2022).

#### 2.3.3.1. Primena vrsta iz roda *Bacillus*

*Bacillus* predstavlja najrasprostranjeniji rod bakterija u rizosferi (Villarreal-Delgado i sar., 2018). Vrste ovog roda poseduju veliku sposobnost prilagođavanja i preživljavanja jer su u stanju da formiraju spore koje zadržavaju vitalnost i u nepovoljnim uslovima spoljašnje sredine (Rodgers, 1989). Smatra se da je ova osobina veoma poželjna kada je u pitanju odabir sojeva koji će se koristiti za testiranja i potencijalnu primenu, kao i formulisanje bioloških preparata na bazi bakterija iz ovog roda. Zone intenzivnog rasta korena predstavljaju najkritičnije tačke putem kojih zemljišni patogeni lako prodiru u biljku i vrše infekciju. Dokazano je da *Bacillus subtilis* formira film na površini korena koji sprečava naseljavanje patogena kao i njegovo prodiranje u biljku. Mehanizam delovanja može biti direktno suzbijanje patogena, putem kompeticije za životni prostor i hranljive materije zahvaljujući sposobnosti da brzo kolonizuju rizosferu i površinu korena, kao i indukovanjem sistemske otpornosti biljaka putem produkcije različitih metabolita kao što su antibiotci i druga isparljiva organska jedinjenja. Pored toga, ovaj rod rizosfernih bakterija predstavlja takozvane promotere biljnog rasta (PGPR) koji su poznati po svom pozitivnom delovanju na rast biljaka i prinos useva. Takođe, *Bacillus* svoje dejstvo ispoljava kroz sintezu sekundarnih metabolita, kao i biljnih hormona kao što su citokinini, giberelini i indol – sirćetna kiselina. Sa druge strane razlaganjem organskih i neorganskih jedinjenja fosfora, kalijuma i cinka povećavaju dostupnost ovih elemenata biljkama (Hajnal Jafari i sar., 2020). Nadalje, putem produkcije lipopeptida i raznih hidrolitičkih enzima vrše razgradnju ćelijskog zida fitopatogene gljive (Khan i sar., 2021).

Rezultati velikog broja istraživanja ukazuju na to da bakterije iz roda *Bacillus* deluju antagonistički protiv *M. phaseolina* kako u *in vitro* tako i u *in vivo* ispitivanjima (Rangel-Montoya i sar., 2022; Hashem i sar., 2017; El-Bendary i sar., 2016). Torres i sar. (2016) navode da su vrste *B. subtilis* i *B. amyloliquefaciens* ispoljile svoje antifungalno dejstvo kroz različite načine antagonističkog delovanja kao što su kompeticija i antibioza. U laboratorijskim istraživanjima koja su sprovedi uočena je smanjena produkcija mikrosklerocija patogena kao i porast micelije na hranljivoj podlozi. Takođe, do sličnih zapažanja u svojim istraživanjima su došli Hussain i Khan (2020) kada je u pitanju vrsta *B. siamensis*. Rangel-Montoya i sar. (2022) ispitivali su efikasnost sojeva *Bacillus amyloliquefaciens* u suzbijanju *M. phaseolina*. Oni su utvrdili su da su ispitivani sojevi ispoljili antagonističko delovanje na razvoj micelije i mikrosklerocija, a takođe je ustanovljen nepravilan porast kolonije patogena na KDA podlozi. Takođe, rezultati ispitivanja efikasnosti *B. subtilis* na semenu soje i biljkama u stakleniku (Simonetti i sar., 2015) su dokazali da i u *in vitro* i *in vivo* eksperimentima *B. subtilis* deluje antifungalno na prouzrokovala ugljenaste truleži soje.

### **2.3.3.2. Primena vrsta iz roda *Trichoderma***

Vrste gljiva iz roda *Trichoderma* su askomicete široko prisutne u zemljištima različitih klimatskih zona. Najčešće se mogu detektovati u rizosferi korenovog sistema i imaju veliki potencijal u biološkoj borbi protiv različitih fitopatogenih gljiva. Njihovo biofungicidno delovanje se zasniva na antagonističkim odnosima između mikroorganizama, kao što su: kompeticija, parazitizam i amensalizam. Pored pomenutog delovanja komercijalni izolati ovog roda u poljoprivrednoj proizvodnji su našli primenu u promociji biljnog rasta (PGPF – plant growth promoting fungi) (Harman, 2006; Hajnal Jafari i sar., 2020). *Trichoderma* spp. ima veoma visoku sposobnost adaptacije na različite uslove spoljašnje sredine, dok ih je njihova veoma izražena kompetitivna priroda učinila veoma uspešnim kolonizatorima staništa na kojima se razvijaju (Howell, 2007; Harman i sar., 2004). Karakteristike ovog roda koje doprinose takvim osobinama su rast u širokim rasponima pH vrednosti i temperature, brz rast hifa, visok stepen reprodukcije konidija, male potrebe za vodom i hranljivim materijama. Ove vrste ispoljavaju biofungicidnu aktivnost kroz amensalistički odnos prema patogenu, zahvaljujući sposobnost da proizvode različite sekundarne metabolite koji imaju antagonističko delovanje na druge patogene u zemljištu

i predstavlja osnovu ovog načina delovanja. Materije kao što su antibiotici, kao i različita isparljiva jedinjenja iz grupe alkohola, ketona i seskviterpena usporavaju, ili potpuno zaustavljaju rast patogenih mikroorganizama. Međutim, smatra se da najznačajniji antagonistički način delovanja predstavlja mikoparazitizam. Nakon što prepozna patogena, hife *Trichoderma* spp. obrastaju hife fitopatogene gljive, a sam kontakt se ostvaruje putem izraštaja koji liče na papile i pričvršćuju se za hifu domaćina kog parazitira. Nakon toga, dolazi do sekrecije enzima koji razlažu ćelijski zid patogena nakon čega gljiva prodire u hife i otpočinje hranjenje unutrašnjim sadržajem (Bailey i sar., 2008; Hajnal Jafari i sar., 2020). S druge strane, kada su vrste iz roda *Trichoderma* u interakciji sa biljkom, dolazi do produkcije jedinjenja koja doprinose podizanju imunog odgovora kod biljke i veće otpornosti na fitopatogene gljive. Takođe, jedinjenja koja proizvodi gljiva stimulišu aktivaciju odbrambenog sistema biljke, tako što indukuju povećanje proizvodnje enzima koji imaju odbrambenu ulogu (Nawrocka i Malolepsza, 2013). Neki od tih enzima su hitinaze, glukanaze i enzimi povezani sa biosintezom fitoaleksina. Pored toga dokazano je da vrste roda *Trichoderma* deluju povoljno i na rast i razvoj korenovog sistema, što samim tim povećava otpornost biljke prema suši (Benitez i sar., 2004; Vinale i sar., 2008). Shodno tome interakcije između *Trichoderma* spp. i biljaka su uvek povezane sa poboljšanjem prinosa i biomase biljaka (Harman i sar., 2004).

Postoje navodi da ovaj rod poseduje antagonistički efekat na najmanje 18 rodova i 29 vrsta fitopatogenih gljiva, a neke od njih su sledeće: *Fusarium oxysporum*, *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* i *M. phaseolina* (Wu i sar., 2017; Benitez i sar., 2004; Mihajlović i sar., 2016; Taliei i sar., 2013). Rezultati ispitivanja u *in vitro* testovima ukazuju na to da pojedine vrste gljiva iz roda *Trichoderma* kao sto su: *T. harzianum*, *T. viride*, *T. asperellum* poseduju veoma izražen antagonistički potencijal i znatno inhibiraju porast micelije *M. phaseolina* (Khaledi i Taheri 2016; Pastrana i sar., 2016). Sreedevi i sar. (2011) navode da izolati *T. harzianum* i *T. viride* inhibiraju porast micelije patogena do 64,4% u testu dvojne kulture, a takođe sličan procenat inhibicije micelije patogena beleže i u testu isparljivih i neisparljivih jedinjenja koje produkuju ove vrste. Do sličnih rezultata su došli Gajera i sar. (2012), koji su takođe beležili inhibiciju porasta micelije patogena u testu dvojne kulture sa izolatima *T. koningi* i *T. harzianum*. Pored pomenutih ispitivanja u laboratorijskim uslovima, rezultati *in vivo* eksperimenata ukazuju na veoma pozitivne efekte u kontroli ovog patogena, a veliki broj autora navodi da se *Trichoderma* spp. uspešno koristi u suzbijanju prouzrokovaca ugljenaste truleži biljaka u usevima kao što su soja, kikiriki i jagoda



(Sreedevi i sar., 2011; Pastrana i sar., 2016). Takođe, veliki broj istraživanja vrši se u smeru ispitivanja uticaja tretmana semena vrstama iz roda *Trichoderma* na smanjenje pojave prouzrokovala ugljenaste truleži u različitim usevima. Jedno od takvih istraživanja su sproveli Khaledi i Taheri (2016), gde su utvrdili da je tretiranje semena soje vrstama *T. viride* i *T. harzianum* dalo bolje rezultate u smanjenju pojave oboljenja tokom vegetacije od varijanti gde je vršeno tretiranje zemljišta. Takođe, slične rezultate navode i Anis i sar. (2010) koji zaključuju da tretiranjem semena suncokreta vrstom *T. viride* dolazi do smanjenja intenziteta pojave truleži u usevu tokom vegetacije. Gupta i Chauhan (2005) navode da se u Indiji preporučuje tretman semena soje sa komercijalnim preparatima na bazi *T. viride* i *T. harzianum*. Slično gore pomenutom, druga grupa istraživača tvrdi da se uklanjanjem žetvenih ostataka i primenom *Trichoderma* spp. može uticati na smanjenje populacija patogena u zemljištu (Baird i sar., 2003).

### 3. ZADACI I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Prikupljanje biljaka sa karakterističnim simptomima ugljenaste truleži korena šećerne repe;
2. Izolacija patogena na hranljivu podlogu i formiranje kolekcije monohifalnih izolata *M. phaseolina*;
3. Provera patogenosti monohifalnih izolata na biljkama šećerne repe u fazi razvoja 4 prava lista;
4. Utvrđivanje morfoloških i odgajivačkih karakteristika izolata *M. phaseolina*;
5. Molekularna identifikacija vrste *M. phaseolina* sekvenciranjem ITS regiona;
6. Ispitivanje genetičkog diverziteta izolata *M. phaseolina* pomoću SSR prajmera;
7. Prikupljanje uzoraka zemljišta iz rizosfere korena šećerne repe i soje u cilju izolacije *Trichoderma* spp.;
8. Formiranje kolekcije monosporijalnih izolata *Trichoderma* spp.;
9. Molekularna identifikacija *Trichoderma* spp. do nivoa vrste sekvenciranjem ITS regiona i gena za translacioni elongacioni faktor (TEF-1 $\alpha$ );
10. Ispitivanje antagonističkog uticaja izolata *Trichoderma* spp. na *M. phaseolina* u *in vitro* uslovima;
11. Ispitivanje mogućnosti suzbijanja patogena primenom bioagenasa na bazi *Trichoderma* spp. u oglelima *in vivo*.

Prikazani zadaci i ciljevi istraživanja omogućavaju detaljnu karakterizaciju izolata *M. phaseolina*, prouzrokovala ugljenaste truleži korena šećerne repe. S obzirom na nepostojanje direktnih i efikasnih mera zaštite šećerne repe od *M. phaseolina*, iznalaženje mogućnosti primene gljiva iz roda *Trichoderma* kao agenasa biološke zaštite je od velikog značaja za savremenu proizvodnju šećerne repe.

## 4. RADNE HIPOTEZE

Polazeći od saznanja iz literature, kao i na osnovu navedenih zadataka i ciljeva ovog istraživanja postavljene su radne hipoteze:

1. Prikupljeni izolati sa korena šećerne repe sa simptomima ugljenaste truleži korena će na osnovu morfoloških, odgajivačkih, patogenih i molekularnih karakteristika biti identifikovani kao pripadnici vrste *M. phaseolina*.
2. Pretpostavka je da postoje genetske razlike između izolata ove vrste koje će se utvrditi upotrebom većeg broja prajmera i varijanti PCR metoda, na osnovu čega bi se dobio uvid u genetičku varijabilnost populacije koja je prisutna u našim agroekološkim uslovima.
3. Pretpostavlja se da antagonistički mikroorganizmi iz roda *Trichoderma*, izolovani iz rizosfere šećerne repe i soje ispoljavaju antifungalno delovanje na *M. phaseolina*.
4. Ispitivanjem antifungalne aktivnosti pomenutih vrsta za suzbijanje prouzrokovača ugljenaste truleži korena šećerne repe u *in vitro* i *in vivo* ogledima utvrdiće se potencijal *Trichoderma* spp. za sprečavanje pojave truleži tokom proizvodnje šećerne repe, dok će se na osnovu dobijenih rezultata, ponuditi ekološki prihvatljiva rešenja za suzbijanje ovog patogena.

## 5. MATERIJAL I METODE

Eksperimentalna istraživanja izvedena su na Departmanu za fitomedicinu i zaštitu životne sredine na Univerzitetu u Novom Sadu, Poljoprivrednog fakulteta i Institutu za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu, Laboratorija za biotehnologiju.

### 5.1. Izolacija patogena i dobijanje čistih kultura

Biljke šećerne repe sa karakterističnim simptomima ugljenaste truleži korena prikupljene su krajem vegetacije ili tokom žetve (period septembar – novembar) sa različitih lokaliteta u AP Vojvodini. Koreni šećerne repe sivo mrke do crne boje (Slika 3) za koje se, na osnovu simptoma moglo pretpostaviti da su inficirani fitopatogenom gljivom *M. phaseolina*, su obeleženi, upakovani i transportovani u laboratoriju na Departman za fitomedicinu i zaštitu životne sredine, Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu, gde su dalje ispitivani.



Slika 3. Karakteristične sivo mrke zone na korenu šećerne repe (Original)

Iz zaraženih biljnih delova izvršena je izolacija patogena po metodi Dhingra i Sinclair (1995). Koren šećerne repe je opran tekućom vodom, dezinfikovano 70 % alkoholom i obrisano vatrom, a zatim je sterilnim nožem presečen po sredini područja sa nekrozom kako bi se jasno uočio prelaz zdravog u obolelo tkivo. Fragmenti tkiva veličine 2 x 2 mm su isecani sterilnim skalpelom, a zatim u aseptičnim uslovima zasejani na sterilnu KDA podlogu (krompir dekstrozni agar). Uzorci su inkubirani u termostatu na temperaturi od 25 °C 3 - 4 dana, odnosno do pojave karakterističnih kolonija gljiva. Isečki sa oboda kolonije koje su po makroskopskim odlikama odgovarali vrsti *M. phaseolina* su presejani u Petri kutije sa sterilnom KDA podlogom u cilju dobijanja čistih kultura.

Nakon inkubacionog perioda od 5 dana, pregledom kolonija formiranih na hranljivoj podlozi, utvrđena su karakteristična makroskopska i mikroskopska morfološka svojstva na osnovu kojih je ustanovljeno koji od izolata odgovaraju vrsti *M. phaseolina*, a za ovo istraživanje je odabrano 43 karakteristična izolata poreklom sa šećerne repe.

## **5.2. Dobijanje čistih kultura monohifalnih izolata patogena i njihovo čuvanje**

U cilju dobijanja monohifalnih izolata, iz čistih kultura starosti 5 dana uzet je kružni isečak prečnika 3 mm i postavljen u centar Petri kutije u kojoj je razlivena sterilna slabo hranljiva podloga, vodeni agar (VA). Nakon inkubacije u termostatu na temperaturi 25 °C u trajanju od 24 do 48 h, direktnim mikroskopiranjem u sterilnim uslovima su pomoću sterilne entomološke igle isecani vrhovi hifa svakog izolata i preneti na sterilnu KDA podlogu. Dobijeni monohifalni izolati su nakon sedam dana inkubacije isečeni sterilnom kopljastom iglom, preneti u 1,5 ml sterilne mikrotube, čuvani na 4 °C i presejavani jednom u 6 meseci radi očuvanja vitalnosti. Izolati su obeležavani kombinacijom slova i brojeva, gde su slova inicijali biljne vrste (šećerna repa), dok brojevi označavaju izolate prema hronološkom redosledu po kojem su izolovani u datoj godini i deo su kolekcije izolata Laboratorije za fitopatologiju Departmana za fitomedcinu i zaštitu životne sredine.

### 5.3. Provera patogenosti izolata *M. phaseolina*

Provera patogenosti je izvršena kod svih 46 izolata *M. phaseolina* metodom veštačke inokulacije, na biljkama šećerne repe u fazi 4 prava lista. Priprema inokuluma je rađena po metodi Omar i sar. (2007). Po 200 g semena sirka je raspoređeno u 46 staklenih tegli zapremine 750 ml, zatim je u svaku teglu dodato po 150 ml vode, promešano i ostavljeno da stoji 24 h. Nakon toga, seme sirka u teglama je sterilisano u autoklavu na 120 °C pri 1,2 bara u trajanju od 25 minuta, a nakon hlađenja, pristupilo se inokulaciji tako što su na površinu semena postavljani fragmenti podloge sa 5 dana starom micelijom gljive. Seme je inkubirano u termostatu na temperaturi od 30 °C u trajanju od 3 nedelje, odnosno dok micelija nije u potpunosti obrasla seme i dok se nisu formirale sklerocije u čitavom supstratu. Tokom inkubacije tegle su povremeno protresane da bi se sprečilo stvaranje kompaktne mase od semena sirka i micelije gljive. Nakon kolonizacije gljive, inokulisan sirak je pomešan sa sterilnim peskom, svaki izolat pojedinačno, u zapreminskom odnosu 3:1. Ogled je izveden u po 4 ponavljanja gde svako ponavljanje čine 4 biljke u fazi 4 prava lista. Kao kontrolna varijanta biljke su presađene u sterilan pesak. Sve saksije su zalivane svakodnevno sa 100 ml sterilne vode i držane u kontrolisanim uslovima u termostatu na 30 °C sa smenom svetle (16 h) i tamne faze (8 h). Ogled je svakodnevno praćen, a vađenje biljaka i ocena patogenosti je izvršena po ispoljavanju simptoma na 50 % veštački inokulisanih biljaka u okviru jednog tretmana. Skala ocene i opis simptoma su prikazani u Tabeli 1 i na Slici 4.



Slika 4. Skala ocene simptoma *M. phaseolina* na korenu mladih biljaka šećerne repe (od 0 do 4)  
(Original)

Tabela 1. Skala ocene i opis simptoma *M. phaseolina* na korenu biljaka šećerne repe

Opis simptoma	Ocena
Zdrava biljka	0
Pojava individualnih lezija na korenu	1
Spajanje lezija na korenu	2
Prstenasta nekroza korena	3
Potpuna nekroza korena	4

## 5.4. Određivanje brzine porasta i morfološko - odgajivačkih karakteristika izolata *M. phaseolina*

### 5.4.1. Brzina porasta izolata *M. phaseolina*

Praćenje brzine porasta izolata ispitane su na KDA i MIN + KClO<sub>3</sub> podlozi. Sastav podloga koje su korišćene prikazane su u Prilogu 1. Sve podloge su sterilisane 20 minuta u autoklavu na temperaturi od 121 °C i pritisku od 1,2 bara. Nakon hlađenja podloga do temperature od 40 °C, dodat je streptomycin sulfat u količini od 1,5 mg/L podloge. U Petri kutije prečnika 85 mm razliveno je po 15 ml odgovarajuće podloge. Na podloge su nakon hlađenja zasejani fragmenti KDA podloge sa micelijom *M. phaseolina* prečnika 3 mm starosti pet dana. Ogled je postavljen u tri ponavljanja. Jedna Petri kutija, zasejana sa jednim fragmentom predstavljala je jedno ponavljanje. Ovako zasejane Petri kutije su zatvarane parafilm trakom, kako ne bi došlo do kontaminacije. Prečnik kolonija je izmeren nakon tri i pet dana inkubacije u termostatu na 25 °C.

### 5.4.2. Morfološke karakteristike izolata *M. phaseolina*

Proučavanje morfoloških odlika obuhvatilo je proučavanje makroskopskih i mikroskopskih karakteristika patogena.

Makroskopske morfološke karakteristike svih dobijenih izolata proučavane su nakon inkubacije od 5 dana na KDA podlozi. Posmatrane su karakteristične osobine prema navodima Beas-Fernandez i sar. (2006), a to su oblik kolonije, intenzitet formiranja micelije, intenzitet formiranja mikrosklerocija (Tabela 2).

Tabela 2. Ocena makroskopskih morfoloških karakteristika kolonija *M. phaseolina* na KDA podlozi

Oblik kolonije	Oznaka	Intenzitet formiranja micelije	Oznaka	Intenzitet formiranja mikrosklerocija	Oznaka
Radijalni	A	Nizak	+	Nizak	*



<b>Režnjeviti</b>	B	Srednji	++	Srednji	**
		Visok	+++	Visok	***
		Veoma visok	++++	Veoma visok	****

U cilju ispitivanja osetljivosti izolata prema hloru korišćena MIN + KClO<sub>3</sub> hranljiva podloga (Prilog 1). Jedna od klasifikacija izolata *M. phaseolina* se zasniva na morfologiji kolonija formiranih na podlogama obogaćenim hlorom (Su i sar., 2001). Mnoge gljive mogu da koriste nitrate kao izvore azota (Rayatpanath i sar., 2009). Hlorati, koji su analogni nitratima, se često koriste za proučavanja mogućnosti asimilacije nitrata kod bakterija, algi, gljiva i viših biljaka (Pearson i sar., 1987). U metabolizmu azota, nitrat reduktaza vrši funkciju redukcije nitrata do nitrita, a zatim do amonijaka (Rayatpanath i sar., 2009). Nitrat reduktaza u metabolizmu gljive ima sposobnost da redukuje hlorate do hlorita. Kao posledica toga, dolazi do nakupljanja hlorita u ćelijama gljive i do inhibicije porasta micelije. Shodno tome, oni izolati koji imaju funkcionalnu nitrat reduktazu su osetljivi prema hloru, dok su oni koji nisu u mogućnosti da metabolišu nitrate tolerantni prema hloru (Pearson i sar., 1987). U odnosu na osetljivost prema hloru, izolati *M. phaseolina* su podeljeni u tri fenotipske grupe (Tabela 3).

Tabela 3. Fenotip kolonije *M. phaseolina* na MIN + KClO<sub>3</sub> podlozi

Fenotip kolonije	Oznaka
Gust (izolati koji nisu osetljivi prema hloru i koji imaju izgled kolonije kao na podlozi bez hlora)	A
Ograničen (izolati koji su osetljivi prema hloru i čiji je porast ograničen samo oko fragmenta sa micelijom gljive)	B
Paperjast (izolati koji su osetljivi prema hloru i koji imaju neujednačen i proređen porast micelije)	C

Od mikroskopskih morfoloških osobina izolata ispitana je veličina mikrosklerocija nakon inkubacije 5 dana na KDA podlozi. Dužina i širina mikrosklerocija mereni su kod 50 slučajno odabranih mikrosklerocija od svakog izolata direktnim pregledom pod mikroskopom. Iskazane su minimalne i maksimalne vrednosti (Beas-Fernandez i sar., 2006). Takođe, ispitana je i sposobnost

formiranja piknida i piknospora izolata gajenih na KEA (kikiriki ekstrakt agar) hranljivoj podlozi (Prilog 1) kao i njihove dimenzije (Ma i sar., 2010).

Merenja su vršena na binokularnom mikroskopu marke KRÜSS MBL 2000 upotrebom objektiva 10x i okulara 4x, gde jedan podeok skale objektiva mikrometra iznosi 10 µm. Koeficijent tj. vrednost jednog podeoka za odabrani objektiv se izračunava na osnovu sledeće formule:

$k = A \times 10 \mu\text{m} / B$ , gde je;

A – broj podeoka objektiv mikrometra,

B – broj podeoka okular mikrometra

### **5.4.3. Uticaj pH vrednosti sredine i temperature na porast izolata *M. phaseolina***

Za ispitivanje uticaja pH vrednosti sredine i temperature na porast kolonija izolata *M. phaseolina* korišćena je KDA podloga. Željeni pH opseg je podešen nakon sterilizacije podloge dodavanjem 1 % rastvora hlorovodonične kiseline (HCl), odnosno rastvora kalijum hidroksida (KOH). Ispitan je uticaj sledećih pH vrednosti podloge 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 i 9. Nakon razlivanja KDA podloge u Petri kutije zasejani su fragmenti micelije prečnika 3 mm i starosti pet dana nakon čega su inkubirane u termostatu na 25 °C. Uticaj različitih temperatura ispitan je tako što su, nakon zasejavanja ispitivanih izolata *M. phaseolina* na KDA podlogu, Petri kutije inkubirane na temperaturama od 15, 20, 25, 30, 35 i 40 °C u termostatu. Oba ogleđa su postavljena u tri ponavljanja. Porast kolonija izolata je praćen svakodnevno sve dok jedan od ispitivanih izolata nije u potpunosti prekrrio podlogu micelijom. Nakon toga izvršeno je merenje radijalnog porasta kolonije u dva pravca pod pravim uglom. Vrednosti koje su dobijene nakon merenja podeljene su sa brojem dana inkubacije kako bi dobili dnevni porast kolonije (mm/dan).

## **5.5. Izolacija biološkog agensa i dobijanje čistih kultura**

Za potrebe izolacije *Trichoderma* spp. uzorci zemljišta su sakupljeni tokom 2018. godine sa različitih parcela na lokalitetu Rimski Šančevi iz rizosfere korena šećerne repe i soje. Uzorci su čuvani na 4 °C do momenta izolacije, koja je izvršena po metodi Kumar i sar. (2011). U 90 ml

sterilne destilovane vode je rastvoreno 10 g usitnjenog i osušenog zemljišta. Kolbe su zatim postavljene na rotacionu mešalicu u trajanju od 20 minuta. Pripremljena je serija razređenja od svakog uzorka od  $10^{-1}$  do  $10^{-5}$ . Zasejavanje je izvršeno u aseptičnim uslovima nanošenjem 100  $\mu$ l supernatanta pomoću pipete na površinu selektivne podloge za izolaciju *Trichoderma* spp. (Elad i sar., 1980) (Prilog 1), a zatim je vršen razmaz suspenzije po površini hranljive podloge pomoću L-petlje. Petri kutije su inkubirane na 28 °C tokom 5 dana. Kolonije koje su prema morfološkim karakteristikama odgovarale ovom rodu presejane su na KDA hranljivu podlogu, dok je nakon mikroskopske potvrde na prisustvo spora koje odgovaraju rodu *Trichoderma*, formirana kolekcija izolata (Tabela 4) koja je korišćena u daljim ispitivanjima. Izolati su monosporijalno prečišćeni na isti način kako je objašnjeno kod *M. phaseolina* i čuvani u frižideru na kosim KDA podlogama u epruvetama na 4 °C kao deo kolekcije izolata Laboratorije za biološka istraživanja i pesticide, Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu. Izolati su radi očuvanja vitalnosti presejavani jednom u šest meseci.

Tabela 4. Spisak izolata *Trichoderma* spp.

Redni broj	Šifra izolata	Lokalitet	Mesto uzorkovanja
1.	T1	Rimski Šančevi	Rizosfera šećerne repe
2.	T2	Rimski Šančevi	Rizosfera šećerne repe
3.	T3	Rimski Šančevi	Rizosfera šećerne repe
4.	T4	Rimski Šančevi	Rizosfera šećerne repe
5.	T5	Rimski Šančevi	Rizosfera šećerne repe
6.	T6	Rimski Šančevi	Rizosfera šećerne repe
7.	T7	Rimski Šančevi	Rizosfera šećerne repe
8.	T8	Rimski Šančevi	Rizosfera šećerne repe
9.	T9	Rimski Šančevi	Rizosfera šećerne repe
10.	T10	Rimski Šančevi	Rizosfera šećerne repe
11.	T11	Rimski Šančevi	Rizosfera soje
12.	T12	Rimski Šančevi	Rizosfera soje
13.	T13	Rimski Šančevi	Rizosfera soje

## **5.6. Molekularna identifikacija izolata**

### **5.6.1. Ekstrakcija DNK patogena i biološkog agensa**

Za potrebe ekstrahovanja DNK, svi izolati su gajeni u Petri kutijama prečnika 85 mm na PDA hranljivoj podlozi na temperaturi od 28 °C tokom pet dana. Sa površine KDA podloge, sastrugano je od 300 do 900 mg micelije gljive. DNK ekstrakcija je rađena po protokolu Somma (2004). Kvalitet izolovane DNK je potvrđen pomoću lančane reakcije polimeraze (PCR) sa univerzalnim prajmerima U1 i U2 (Tabela 5), specifičnim za 18S rRNK, deo male ribozomalne subjedinice, primenom odgovarajućeg programa za amplifikaciju (Tabela 6).



Slika 5. Ekstrakcija DNK (Original)

Tabela 5. Sekvence oligonukleotidnih prajmera U1 i U2

Lokus	Prajmer	Sekvenca	Referenca
18s	U1	5'-TCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTA-3'	Allmann i sar.
rRNA	U2	5'-AATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTT-3'	(1993)

Tabela 6. Program amplifikacije sa univerzalnim prajmerima

Faza	Temperatura (°C)	Vreme (s)	Broj ciklusa
Početna denaturacija	95	120	
Denaturacija	95	25	} 35
Vezivanje prajmera	60	30	
Ekstenzija	68	40	
Krajnja ekstenzija	68	300	

PCR reakcije su izvedene u ukupnoj zapremini od 25 µl koja je sadržala 2 µl izolovane DNK, 2,5 µl dNTP, 2,5 µl MgCl<sub>2</sub>, 0,3 µl Taq polimeraze (Thermo Fisher Scientific), 1 µl svakog prajmera i 15,7 µl dH<sub>2</sub>O. Lančana reakcija polimeraze izvedena je u PCR aparatu Biometra – Thermocycler. PCR produkti svih amplifikacija, su razdvojeni na 1% agaroznom gelu sa dodatkom 0,005 % etidijum bromida, dok je vizualizacija umnoženih fragmenata urađena pod UV svetlom. Dužina fragmenata utvrđena je poređenjem sa 50 bp DNK lestvicama za izolate *Trichoderma* spp. i 100 bp DNK lestvicama za izolate *M. phaseolina* (*GeneRuler*<sup>TM</sup> 50 i 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific).

## 5.6.2. Identifikacija izolata *M. phaseolina* i *Trichoderma* spp. molekularnim metodama

### 5.6.2.1. Amplifikacija fragmenta ITS regiona *M. phaseolina*

Izolovana DNK je korišćena kao matrica za amplifikaciju fragmenta ITS regiona prajmerima ITS1 i ITS4 (Tabela 7), primenom odgovarajućeg programa amplifikacije (Tabela 8).

Tabela 7. Sekvence oligonukleotidnih prajmera ITS1 i ITS4

Lokus	Prajmer	Sekvenca	Referenca
5,8s	ITS1	5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'	White i sar., 1990
rRNK	ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	

Tabela 8. Program amplifikacije ITS fragmenata

Faza	Temperatura (°C)	Vreme (s)	Broj ciklusa
Početna denaturacija	94	300	} 40
Denaturacija	94	30	
Vezivanje prajmera	60	60	
Ekstenzija	72	45	
Krajnja ekstenzija	72	300	

### 5.6.2.2. Amplifikacija fragmenta ITS regiona *Trichoderma* spp.

Izolovana DNK je korišćena kao matrica za amplifikaciju fragmenta ITS regiona prajmerima ITS1b i ITS2 – R (Tabela 9), primenom odgovarajućeg programa amplifikacije (Tabela 10).

Tabela 9. Sekvence oligonukleotidnih prajmera ITS1b i ITS2 – R

Lokus	Prajmer	Sekvenca	Referenca
5,8s	ITS1b	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	White i sar., 1990
rRNK	ITS2 – R	5'-TGTGTTCTTCATCGATG-3'	

Tabela 10. Program amplifikacije ITS fragmenata

Faza	Temperatura (°C)	Vreme (s)	Broj ciklusa
Početna denaturacija	94	300	} 35
Denaturacija	94	60	
Vezivanje prajmera	61	60	
Ekstenzija	72	60	
Krajnja ekstenzija	72	120	

### 5.6.2.3. Amplifikacija fragmenta TEF-1 $\alpha$ gena *Trichoderma* spp.

Izolovana DNK je korišćena kao matrica za amplifikaciju fragmenta TEF-1 $\alpha$  gena prajmerima EF1-728 i EF1-986 (Tabela 11), primenom odgovarajućeg programa amplifikacije (Tabela 12).

Tabela 11. Sekvence oligonukleotidnih prajmera EF1-728 i EF1-986

Lokus	Prajmer	Sekvenca	Referenca
TEF-1 $\alpha$	EF1-728	5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3'	Carbone i Kohn (1999)
	EF1-986	5'-TACTTGAAGGAACCCTTACC-3'	

Tabela 12. Program amplifikacije TEF-1 $\alpha$  gena

Faza	Temperatura (°C)	Vreme (s)	Broj ciklusa
Početna denaturacija	97	60	} 36
Denaturacija	96	20	
Vezivanje prajmera	55	20	
Ekstenzija	72	20	
Krajnja ekstenzija	72	120	

### 5.6.3. Utvrđivanje genetičke varijabilnosti izolata *M. phaseolina* pomoću SSR markera

Za ispijanje genetičke varijabilnosti unutar populacije izolata *M. phaseolina* korišćeni su mikrosatelitski molekularni markeri odnosno SSR (simple sequence repeats) koji detektuju polimorfizam jednostavnih ponavljajućih sekvenci DNK. Izolati su ispitani primenom 12 SSR parova prajmera Tabela 13.



Tabela 13. Prajmeri korišćeni u istraživanju

Oznaka prajmera	Sekvence prajmera	PCR program
<b>MP04</b>	5'-GTGCGAGAAAAATCCGTAAAC-3' 5'-CCACACAATTACGAAACCTCA-3'	SSR57TD
<b>MP11</b>	5'-AGCCCATGAAGTGGAAAGCTC-3' 5'-GAAAGAGGTAACCCGCGTTGT-3'	SSR60
<b>MP32</b>	5'-TAGTGCTGAAGCCAGAAGTC-3' 5'-CCCACAGAAAGAAGCTTAAC-3'	SSR56
<b>MP27</b>	5'-TGACAGGCGTCTGATTG -3' 5'-CGAGAGGGTTGGTTGGTTTA -3'	SSR52
<b>MP05</b>	5'- AGTCAAAGTAGAACAAG-3' 5'- GACGGGCGCATACATCTC-3'	SSR47
<b>StvMPR532a</b>	5'- CGTGCAGAAAAATCCGTAAAC-3' 5'-CCACACAATTACGAAACCTCATCTC -3'	SSR60MF
<b>MP474</b>	5'- CGGAGACCCAAATCTCTCTCT-3' 5'- ATATCGGCGGACATCTTTTT-3'	SSR54
<b>MP475</b>	5'- ATATCGGCGGACATCTTTTT-3' 5'-AAGCTCGGAGACCCAAATCT -3'	SSR55TD
<b>MP431</b>	5'-GTGCAGGAGAGGGGTAAGTG -3' 5'-TTCGTCACGTCCTTTTCGAT -3'	SSR55
<b>MP468</b>	5'-CGTCTGCTTCACCATCACTG -3' 5'- GAAATCCAGGGCAATGAAGA-3'	SSR56TD
<b>MP449</b>	5'-TTGTGTCTTTTGCCTGGTGT -3' 5'-CATCAAACCACAGCAATGTGTA -3'	SSR56TD
<b>MP445</b>	5'-GCTGGGCTGTGAGTCTCTCT -3' 5'-TCTCGGGTCTTTCTCCTCAA -3'	SSR58TD

Za PCR reakciju je korišćeno 23  $\mu\text{l}$  reakcione smeše i 2  $\mu\text{l}$  DNK. Reakciona smeša za analizu jednog uzorka je sadržala sledeće komponente:

1. 10 x PCR pufer ( <i>Fermentas</i> )	2,5 $\mu\text{l}$
2. dNTPs (2 mM)	2,5 $\mu\text{l}$
3. Sens prajmer (10 pmol/ $\mu\text{l}$ )	1,0 $\mu\text{l}$
4. Antisens prajmer (10 pmol/ $\mu\text{l}$ )	1,0 $\mu\text{l}$
5. Taq polimeraza ( <i>Fermentas</i> , 5 U/ $\mu\text{l}$ )	0,3 $\mu\text{l}$
6. Voda	15,7 $\mu\text{l}$

Uslovi amplifikacije su se razlikovali u zavisnosti od odabranih prajmera, tako da se u istraživanjima koristilo deset PCR programa (Tabela 14).

Tabela 14. Uslovi amplifikacije PCR programa

Program	Uslovi amplifikacije
<b>SSR 57TD</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>početna denaturacija 2 min na 94 °C</li> <li>12 ciklusa: 94 °C 30 s, 56,6 °C 30 s, sa snižavanjem temperature za 0,8 °C u svakom narednom ciklusu, 72 °C 50 s</li> <li>31 ciklus: denaturacija 94 °C 30 s, vezivanje prajmera 47 °C 30 s</li> <li>ekstenzija 72 °C 50 s, zatim krajnja ekstenzija 72 °C 300 s</li> </ul>
<b>SSR 60</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>početna denaturacija 2 min na 94 °C</li> <li>43 ciklusa: denaturacija 94 °C 30 s, vezivanje prajmera 60 °C 40 s <ul style="list-style-type: none"> <li>ekstenzija 72 °C 50 s</li> <li>krajnja ekstenzija 72 °C 300 s</li> </ul> </li> </ul>
<b>SSR 56</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>početna denaturacija 3 min na 94 °C</li> <li>43 ciklusa: denaturacija 94 °C 30 s, vezivanje prajmera 55,5 °C 40 s <ul style="list-style-type: none"> <li>ekstenzija 72 °C 50 s</li> <li>krajnja ekstenzija 72 °C 300 s</li> </ul> </li> </ul>
<b>SSR 52</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>početna denaturacija 3 min na 94 °C</li> <li>43 ciklusa: denaturacija 94 °C 30 s, vezivanje prajmera 52 °C 40 s <ul style="list-style-type: none"> <li>ekstenzija 72 °C 50 s</li> </ul> </li> </ul>

---

	<ul style="list-style-type: none"><li>• krajnja ekstenzija 72 °C 300 s</li></ul>
<b>SSR 47</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• početna denaturacija 2 min na 94 °C</li><li>• 43 ciklusa: denaturacija 94 °C 30 s, vezivanje prajmera 48 °C 60 s<ul style="list-style-type: none"><li>• ekstenzija 72 °C 50 s</li></ul></li><li>• krajnja ekstenzija 72 °C 300 s</li></ul>
<b>SSR 60MF</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• početna denaturacija 2 ciklusa 1 min na 95 °C, i 60 °C</li><li>• 27 ciklusa: denaturacija 95 °C 30 s, vezivanje prajmera 60 °C 30 s<ul style="list-style-type: none"><li>• ekstenzija 68 °C</li></ul></li><li>• krajnja ekstenzija 68 °C 240 s</li></ul>
<b>SSR 54</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• početna denaturacija 3 min na 94 °C</li><li>• 43 ciklusa: denaturacija 94 °C 30 s, vezivanje prajmera 53,8 °C 40 s<ul style="list-style-type: none"><li>• ekstenzija 72 °C 50 s,</li></ul></li><li>• krajnja ekstenzija 72 °C 300 s</li></ul>
<b>SSR 55</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• početna denaturacija 3 min na 94 °C</li><li>• 43 ciklusa: denaturacija 94 °C 30 s, vezivanje prajmera 54,8 °C 40 s<ul style="list-style-type: none"><li>• ekstenzija 72 °C 50 s</li></ul></li><li>• krajnja ekstenzija 72 °C 300 s</li></ul>
<b>SSR 56TD</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• početna denaturacija 2 min na 94 °C</li><li>• 11 ciklusa: 94 °C 30 s, 55,8 °C 30 s, sa snižavanjem temperature za 0,8 °C u svakom narednom ciklusu, 72 °C 50 s</li><li>• 31 ciklus: denaturacija 94 °C 30 s, vezivanje prajmera 47 °C 30 s<ul style="list-style-type: none"><li>• ekstenzija 72 °C 50 s</li></ul></li><li>• krajnja ekstenzija 72 °C 300 s</li></ul>
<b>SSR 58TD</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• početna denaturacija 2 min na 94 °C</li><li>• 13 ciklusa: 94 °C 30 s, 57,4 °C 30 s, sa snižavanjem temperature za 0,8 °C u svakom narednom ciklusu, 72 °C 50 s</li><li>• 30 ciklusa: denaturacija 94 °C 30 s, vezivanje prajmera 47 °C 30 s<ul style="list-style-type: none"><li>• ekstenzija 72 °C 50 s</li></ul></li><li>• krajnja ekstenzija 72 °C 300 s</li></ul>

---

Umnožavanje DNK svim navedenim pramerima se odvijalo u PCR aparatima *Thermocycler* (*Biometra*, Nemačka). Razdvajanje dobijenih PCR produkata vršeno je na agaroznim, Metaphor agaroznim i poliakrilamidnim gelovima, različite koncentracije. Agarozni gelovi su pravljani sa TAE puferom i agarozom (Agarose, SPI, Duchefa Biochemie). U gel je dodavan etidijum bromid (EtBr) radi vizuelizacije fragmenata. Elektroforeza je izvođena 2-2,5 časa pri naponu od 130 V. Gelovi sa Metaphor agarozom visoke rezolucije (*Lonza*) su pravljani sa TAE puferom. Takođe je dodavan etidijum bromid (EtBr). Elektroforeza je izvođena 2-2,5 časa pri naponu od 130 V. Poliakrilamidni gelovi različite koncentracije pravljani su dodavanjem određene količine akrilamid/bisakrilamida odnosa 19:1, 30% koncentracije u TAE puferu. Potom je dodato 750 µl 10% amonijum persulfata i 150 µl TEMED. Elektroforeza je izvođena sat vremena pri naponu od 110 V i tri sata pri naponu od 120 V, na temperaturi od 4 °C. Gelovi su fotografisani pod UV svetlom. Za određivanje veličine dobijenih PCR produkata korišćena je DNK lestvica *GeneRuler*<sup>TM</sup> 100bp ladder Plus (*Fermentas*).

#### 5.6.4. Ekstrakcija i prečišćavanje PCR produkata

Ekstrakcija dobijenih produkata amplifikacije sa agaroznih gelova je rađena pomoću kita QIAEX II (QIAGEN) prateći protokol proizvođača:

- Iseci DNK fragment sa agaroznog gela i staviti u pripremljenu epruvetu od 1,5 ml. Ukloniti što je više moguće nepotrebne agaroze.
- Izmeriti težinu isečene agaroze. Dodati 3x volumena pufer QX1 jednom volumenu gela sa DNK fragmentom veličine 100 - 4000 bp.
- Resuspendovati QIAEX II na vorteksu 30 s. Dodati 10 µl suspenzije QIAEX II
- Inkubirati na 50 °C 10 min, da bi se agarozna rastvorila i da bi se DNK vezala za partikule QIAEX II. Mešati na vorteksu svaka 2 min da bi se QIAEX II održao u suspenziji. Proveriti da li je boja rastvora žuta. Ako je boja narandžasta ili ljubičasta dodati 10 µl 3M Na-acetata pH 5.0. Boja bi trebalo da pređe u žutu. Inkubacija se u tom slučaju produžuje najmanje još 5 min.

- Centrifugirati 30 s, a zatim ukloniti supernatant.
- Isprati talog sa 500  $\mu$ l pufera QX1. Resuspendovati talog na vorteksu. Centrifugirati uzorak 30 s, zatim pažljivo ukloniti sve tragove supernatanta pipetom. Ovaj korak uklanja zaostalu agarozu.
- Isprati talog dva puta sa 500  $\mu$ l pufera PE. Resuspendovati talog na vorteksu. Centrifugirati uzorak 30 s, zatim pažljivo ukloniti sve tragove supernatanta pipetom. Ovi koraci uklanjaju kontaminaciju solima.
- Sušiti talog 10-15 min na sobnoj temperaturi dok talog ne postane beo. Ako se koristilo 30  $\mu$ l QIAEX II suspenzije, talog se suši oko 30 min. Ne sušiti vakuumom.
- Za eluciju DNK dodati 20  $\mu$ l vode i resuspendovati talog na vorteksu. Inkubirati na sobnoj temperaturi, 5 min.
- Centrifugirati 30 s. Pažljivo preneti supernatant u novu epruvetu. Supernatant sada sadrži čisti DNK fragment.
- Opciono: Ponoviti korake 9 i 10 i kombinovati eluate. Dodatna elucija će povećati prinos dobijenog DNK fragmenta oko 10-15%.

### 5.6.5. Sekvenciranje

Produkti amplifikacije prajmerima ITS i TEF su poslani na sekvenciranje u Macrogen Inc. (Amsterdam, Holandija), koje je rađeno na aparatu ABI 3730 x 1 DNA Analyzer (Applied Biosystems). Sekvence su po završenoj analizi deponovane u NCBI bazu GeneBank i nalaze se u Prilogu 2 doktorata.

## 5.7. Osetljivost izolata *M. phaseolina* in vitro

Testirana je osetljivosti dva izolata *M. phaseolina* kod kojih je utvrđena značajna razlika u nivou patogenosti gde je izolat ŠR23/11 ispoljio viši nivo patogenost u odnosu na izolat ŠR55(3)/09. U ispitivanje su uključena dva komercijalna preparata Funomil® 700 WG, Bacillomix® Original, kao i 13 izolata iz roda *Trichoderma* koji su kao potencijalni bioagensi ispitivani u ovom radu.

### 5.7.1. Osetljivost *M. phaseolina* prema tiofanat-metilu

Osetljivost odabranih izolata *M. phaseolina* na Funomil® 700 WG (Agromarket, Srbija) čija je aktivna materija tiofanat-metil je ispitana primenom metode inkorporacije fungicida u KDA hranljivu podlogu (Leroux i Gredt, 1972; Locher i Lorentz, 1991). U ispitivanje je uključeno šest koncentracija fungicida (0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; i 100 mg/l). Serije rastvora fungicida odgovarajućih koncentracija dobijene su rastvaranjem fungicida u sterilnoj destilovanoj vodi. Razređenja fungicida su zatim, uz neprestano mešanje na magnetnoj mešalici, dodavana u aseptičnim uslovima u rastopljenu KDA podlogu prethodno ohlađenu do 55 °C, pri čemu je odnos fungicida i podloge bio 1:9. Kao kontrola korišćena je KDA podloga u koju je umesto razređenja fungicida dodata ista količina sterilne destilovane vode. Ovako pripremljena podloga je razlivena u Petri kutije i nakon hlađenja je zasejana ispitivanim izolatima *M. phaseolina* ŠR55(3)/09 i ŠR23/11 tako što su fragmenti podloge sa micelijom prečnika 3 mm starom 5 dana na površinu hranljive podloge u koju je inkorporiran fungicid. Svaku varijantu su činila četiri ponavljanja. Zasejane Petri kutije inkubirane su pri temperaturi od 28 °C u mraku. Porast micelije posmatran je svakodnevno, a kada je kolonija izolata u kontrolnoj varijanti u potpunosti ispunila Petri kutiju vršeno je merenje prečnika kolonije u dva pravca. Procenat inhibicije je izračunat po formuli koju je opisao Edington (1971):

$$\text{Inhibicija (\%)} = A1 - A2 / A1 \times 100$$

A1 – prečnik kolonije (mm) *M. phaseolina* u kontroli,

A2 – prečnik kolonije (mm) *M. phaseolina* u tretmanu.

### **5.7.2. Osetljivosti *M. phaseolina* prema *Bacillus* sp.**

Za ispitivanje je korišćen *Bacillus* sp., koji je komercijalno dostupan kao mikrobiološko đubrivo pod nazivom Bacillomix® Original (Bacillomix Co., Srbija). Metodom inkorporacije komercijalne suspenzije mikrobiološkog đubriva u KDA hranljivu podlogu dobijene su sledeće ispitivane koncentracije: 1; 2; 5 i 10%. Inkorporacija preparata u podlogu urađena je na način da je uz neprestano mešanje na magnetnoj mešalici KDA podloga prohlađena do 55 °C, a tokom mešanja podloge uneta je odgovarajuća količina mikrobiološkog đubriva (različita količina za svaku varijantu) kako bi se dobila podloga sa odgovarajućim procentom mikrobiološkog đubriva. Kao kontrola korišćena je KDA podloga bez dodatog mikrobiološkog đubriva. Podloga je zatim u sterilnim uslovima razlivena u Petri kutije, a nakon hlađenja su zasejani fragmenti micelije patogena prečnika 3 mm starosti 5 dana na površinu hranljive podloge u koju je inkorporiran biološki preparat. Sva ispitivanja izvršena su u četiri ponavljanja. Zasejane Petri kutije inkubirane su pri temperaturi od 28 °C u mraku. Porast micelije posmatran je tokom pet dana nakon čega je izvršeno merenje prečnika kolonije. Procenat inhibicije je izračunat po gore navedenoj formuli.

### **5.7.3. Osetljivost *M. phaseolina* prema *Trichoderma* spp.**

#### **5.7.3.1. Test dvojne kulture**

Test dvojne kulture (TDK) u Petri kutiji je izveden kako bi se ispitao antagonistički uticaj izolata *Trichoderma* spp. na izolate *M. phaseolina*. U Petri kutije razliveno je 15 ml sterilne KDA podloge. Diskovi micelije prečnika 3 mm koji su uzeti sa 5 dana starih kolonija *M. phaseolina* i *Trichoderma* spp. izolata postavljeni su na međusobnu udaljenost od 80 mm, dok je u kontrolnom tretmanu nasuprot patogena postavljen prazan disk KDA podloge. Svaka varijanta je izvedena u četiri ponavljanja. Petri kutije su postavljene na inkubaciju na 28 °C. Porast kolonija je posmatran tokom pet dana nakon čega je izvršeno merenje prečnika kolonije.

Takođe, antifungalna aktivnost je određena kroz različite klase antagonističkog delovanja koristeći skalu za ocenu koju su opisali Bell i sar. (1982), dok je procenat inhibicije izračunat pomoću formule po Edingtonu (1971).

Tabela 15. Antifungalna aktivnost *Trichoderma* spp. određena prema skali ocene klase antagonističkog delovanja Bell i sar. (1982)

Klasa antagonističkog delovanja	Opis
I	<i>Trichoderma</i> spp. potpuno prerasta patogena i prekriva čitavu površinu hranljive podloge
II	<i>Trichoderma</i> spp. prerasta dve trećine površine hranljive podloge
III	<i>Trichoderma</i> spp. i patogen kolonizuju približno istu površinu hranljive podloge, i ni jedna vrsta ne dominira nad drugom
IV	Patogen kolonizuje najmanje dve trećine hranljive podloge i odoleva napadu <i>Trichoderma</i> spp.
V	Patogen potpuno prerasta <i>Trichoderma</i> spp. i prekriva čitavu površinu hranljive podloge

### 5.7.3.2. Test isparljivih jedinjenja

Test isparljivih jedinjenja (TIJ) izolata *Trichoderma* spp. i njihovog uticaja na izolate *M. phaseolina* je rađen po metodi Sreedevi i sar. (2011). Izolati *Trichoderma* spp. su zasejani na KDA podlogu, a zatim su inkubirani na 28 °C tokom 48 h. Nakon inkubacije poklopac svake Petri kutije je zamenjen sa dnom Petri kutije na koje su zasejani izolati *M. phaseolina*. U kontroli korišćena su dna Petri kutija sa KDA podlogom na kojoj nije zasejan bioagens dok je nasuprot njega postavljeno dno na koje su zasejani izolati *M. phaseolina*. Ovako uparene Petri kutije su pričvršćene parafilmom. Svaka varijanta je izvedena u četiri ponavljanja. Petri kutije su postavljene u termostat na inkubaciju na 28 °C. Praćenje radijalnog porasta patogena je vršeno



svakodnevno i poređeno sa kontrolom. Procenat inhibicije je izračunat pomoću formule po Eddington i sar. (1971).

## 5.8. Osetljivost izolata *M. phaseolina in vivo*

Dva izolata *Trichoderma* spp. (T2 i T12), koji su ispoljili najjače antagonističko dejstvo protiv patogena u *in vitro* ogleđima, odabrani su za dalje ispitivanje u ogleđu *in vivo*. Njihova efikasnost je upoređena sa dva komercijalno dostupna biopesticida i jednim sintetičkim fungicidom (Tabela 15). Ovi komercijalni (bio)fungicidi su registrovani u Republici Srbiji, ali ne za suzbijanje truleži korena šećerne repe, već protiv drugih patogena u različitim usevima.

Tabela 15. Agensi i preparati testirani u ogleđu *in vivo*

Oznaka tretmana	Opis tretmana	Fungicid / bioagens / testirani izolat	Koncentracija
<b>CT2</b>	Suspenzija spora <i>Trichoderma</i> spp.	Izolat T2	1x10 <sup>8</sup> CFU/ml
<b>CT12</b>	Suspenzija spora <i>Trichoderma</i> spp.	Izolat T12	1x10 <sup>8</sup> CFU/ml
<b>CT2+T12</b>	Suspenzija spora <i>Trichoderma</i> spp.	Izolat T2 + T12	1x10 <sup>8</sup> CFU/ml
<b>TRICH</b>	<i>Trichoderma asperellum</i>	Trifender <sup>®</sup> Pro	1.1 x 10 <sup>8</sup> CFU/g
<b>BAC</b>	<i>Bacillus</i> sp.	Bacillomix <sup>®</sup> Original	8 x 10 <sup>8</sup> CFU/ml
<b>TM</b>	Tiofanat-metil	Funomil <sup>®</sup> 700 WG	700 g/kg
<b>UIC</b>	Netretirana kontrola	/	/

Priprema inokuluma (Slika 6) je izvršena prema metodi Omar i sar. (2007). Po 200 g semena sirka je raspoređeno u staklene tegle, zatim je u svaku teglu dodato po 150 ml vode, promešano i ostavljeno da stoji 24 časa. Nakon toga, seme sirka je sterilisano na 120 °C pri 1,2 bara u autoklavu u trajanju od 20 minuta, nakon hlađenja, pristupilo se inokulaciji tako što su se na površinu semena postavili isečci micelije patogena starosti 5 dana. Seme je inkubirano u klima komori na temperaturu od 30 °C u trajanju od 3 nedelje.



Slika 6. Inokulisano seme sirka gljivom *Macrophomina phaseolina* (Original)

U cilju pripreme inokuluma *Trichoderma* spp. izolati T2 i T12 su uzgajani na sterilnom semenu sirka u teglama. Sirak kao supstrat na kom se razvijala gljiva je pripremljen na isti način kao što je prethodno opisano. Inokulacija je izvršena postavljanjem isečaka micelije testiranih izolata, dok je inkubacija vršena u termostatu na temperaturi od 28 °C tokom 10 dana. Nakon inkubacije, pristupilo se sakupljanju spora koje su kolonizovale seme sirka. U svaku teglu je dodato 100 ml sterilnog 0,5 % rastvora Tween® 80. Tegle su zatim postavljene na rotacionu mešalicu u trajanju od 20 min sve dok seme sa sporama gljive ne postane rastresito. Celokupan sadržaj iz tegle je zatim preko sterilne gaze i levka ispiran i sipan u kolbe sve dok nije postignuta koncentracija konidija od  $1 \times 10^8$  CFU/ml (Slika 7). Konačna koncentracija suspenzije konidija je proverena pod mikroskopom pomoću hemocitometra.



Slika 7. Priprema suspenzije spora *Trichoderma* spp. (Original)

Kako bi testirali biološku efikasnost *Trichoderma* spp. *in vitro* izveden je ogled u kontrolisanim uslovima klima komore. Testirani tretmani su prikazani u Tabeli 15. Za sadnju biljaka korišćene su saksije dimenzija 7 x 7 cm, napunjene sterilnim peskom i inokulumom patogena u zapreminskom odnosu 3:1. Nakon toga u svaku saksiju je posađeno 4 biljke šećerne repe u fazi razvoja 4 prava lista (BBCH 14). Jednu ispitivanu varijantu je činilo 4 saksije sa po 4 biljke, što je ukupno predstavljalo 16 ponavljanja. Rastvori ispitivanih preparata primenjeni su zalivanjem u količini od po 100 ml po saksiji. Komercijalni preparati su primenjeni prema preporuci proizvođača: Funomil® 700 WG u koncentraciji 0,05%, Bacillomix® Original u koncentraciji 10% i Trifender® Pro 2 kg/ha. Kontrolnu varijantu su predstavljale biljke šećerne repe koje su inokulisane patogenom, a zalivane sa 100 ml sterilne vode. Saksije su održavane u kontrolisanim uslovima pri temperaturi od 30 °C, sa smenom svetle (16 h) i tamne faze (8 h). Biljke su svakodnevno zalivane vodom, a ujedno je i praćen razvoj simptoma. Vađenje biljaka i ocena ogleda je izvršena nakon što je preko 50% biljaka iz kontrole ispoljilo simptome truleži. Intenzitet oboljenja je procenjen korišćenjem skale ocene i opisa simptoma prikazanih u Tabeli 2. Indeks oboljenja je izračunat po Townsend-Heuberger formuli (Townsend i Heuberger, 1943).

$$\text{Indeks oboljenja (\%)} = \sum \frac{n \times v}{i \times N} \times 100$$

n – broj biljaka svake klase ocena

v – ocena infekcije

i – najvisa ocena prema skali ocenjivanja (4)

N – ukupan broj biljaka u tretmanu

## 5.9. Analiza podataka

Statistička obrada podataka urađena je pomoću programskog paketa Statistica 13.5 primenom analize varijanse (ANOVA) i post hoc testova (Duncan MRT, Fisher's LSD) u intervalu poverenja 95%.

Dobijene sekvence ITS regiona izolata *M. phaseolina* kao i sekvence ITS regiona i TEF1- $\alpha$  gena izolata *Trichoderma* spp. su primenom BLAST algoritma upoređivane sa odgovarajućim sekvencama u NCBI bazi GenBank. Smatrano je da je identitet sekvenci potvrđen kada su poklapanja između zadate sekvence i sekvence iz baze podataka bile  $\geq 91\%$ . Takođe, za identifikaciju dobijenih sekvenci *Trichoderma* spp., pored analize sa sekvencama u NCBI GenBank, korišćena je i TrichOkey baza podataka za identifikaciju vrsta iz roda *Trichoderma*. U cilju određivanja parametara genetičke varijabilnosti izolata *M. phaseolina* korišćen je programski paket GenAlEx 6.502. Izračunat je prosečan broj alela po lokusu ( $N_a$ ), efektivni broj alela ( $N_e$ ), uočena ( $H_o$ ) i očekivana heterozigotnost ( $H_e$ ), Shannon indeks genetičkog diverziteta ( $I$ ) kao i indeks fiksacije ( $F$ ), dok je u proceni distribucije genetičke varijabilnosti između i unutar populacija, kao i grupa populacija, upotrebljena analiza molekularne varijanse (AMOVA). Prilikom primene ove analize izvršena je podela izolata u tri grupe prema lokalitetu: Srem, Banat, Bačka.

## 6. REZULTATI

### 6.1. Izolacija patogena i dobijanje čistih kultura

Prikupljanje obolelih biljaka sa karakterističnim simptomima ugljenaste truleži korena vršeno je u periodu od 2009. do 2013. godine na različitim lokalitetima AP Vojvodine. Svi uzorkovani koreni su posedovali karakteristične simptome truleži u vidu sivo mrkih pega na spoljašnjem delu korena koje su se vremenom širile i zauzimale sve veću površinu, a takođe napredovanjem zaraze na nekim uzorcima je došlo i do pojave beličasto sive micelije na površini. Na preseku korena jasno je uočena trulež žute do braon boje, veoma često bez jasnog prelaza između obolelog i zdravog tkiva (Slika 8). Iz uzorkovanog korena dobijen je veliki broj izolata fitopatogenih gljiva, među kojima je najveću zastupljenost imala vrsta *M. phaseolina* što je utvrđeno na osnovu ispitanih makroskopskih i mikroskopskih morfoloških osobina kolonija formiranih u Petri kutiji. Od 43 odabrana izolata pripremljeni su monohifalni izolati koji su korišćeni u daljim ispitivanjima. Kolekciji izolata priključen je po jedan izolat *M. phaseolina* poreklom sa suncokreta, soje i kukuruza koji su deo kolekcije fitopatogenih gljiva Instituta za ratarstvo i povrtarstvo Novi Sad. Podaci o lokalitetu, domaćinu i šiframa izolata koji su korišćeni u istraživanju su prikazani u Tabeli 16.





Slika 8. Simptom ugljenaste truleži na uzdužnom preseku korena šećerne repe (Original)

Tabela 16. Spisak izolata *M. phaseolina*

Redni broj izolata	Šifra izolata	Biljka domaćin	Lokalitet
1.	ŠR42(1)/09	Šećerna repa	Jaša Tomić
2.	ŠR45(4)/09	Šećerna repa	Pančevo
3.	ŠR62(4)/09	Šećerna repa	Ečka
4.	ŠR55(3)/09	Šećerna repa	Lepušnica
5.	ŠR5/09	Šećerna repa	Vojka
6.	ŠR14/09	Šećerna repa	Orlovat
7.	ŠR10/09	Šećerna repa	Boljevci, Jakovo
8.	ŠR3/09	Šećerna repa	Sremska Mitrovica
9.	MPHKU	Kukuruz	Rimski Šančevi
10.	ŠR9M/10	Šećerna repa	Ečka
11.	ŠR1/11	Šećerna repa	Beška

<b>Redni broj izolata</b>	<b>Šifra izolata</b>	<b>Biljka domaćin</b>	<b>Lokalitet</b>
12.	ŠR39(2)/09	Šećerna repa	Banatski Karlovci
13.	ŠR23/11	Šećerna repa	Rimski Šančevi
14.	ŠR65(2)/09	Šećerna repa	Ugrinovci
15.	ŠR49(5)/09	Šećerna repa	Zlatica
16.	ŠR62(5)/09	Šećerna repa	Ečka
17.	ŠR31(2)/09	Šećerna repa	Uzdin
18.	ŠR24M/10	Šećerna repa	Indija
19.	ŠR15/11	Šećerna repa	Beška
20.	ŠR34/12	Šećerna repa	Novi Karlovci
21.	ŠR38/12	Šećerna repa	Kukujevci
22.	ŠR30/12	Šećerna repa	Ečka
23.	ŠR45/12	Šećerna repa	Zrenjanin
24.	ŠR36/12	Šećerna repa	Kovačica
25.	ŠR85/12	Šećerna repa	Rimski Šančevi
26.	ŠR 97/12	Šećerna repa	Čurug
27.	ŠR5/12	Šećerna repa	Kula
28.	ŠR51/12	Šećerna repa	Sirig
29.	ŠR40/12	Šećerna repa	Zemun
30.	ŠR32/12	Šećerna repa	Stara Pazova
31.	ŠR52/12	Šećerna repa	Vajska
32.	ŠR75/13	Šećerna repa	Stara Pazova
33.	MPSU	Suncokret	Rimski Šančevi
34.	ŠR52/13	Šećerna repa	Kikinda
35.	MPSO	Soja	Rimski Šančevi
36.	ŠR32/13	Šećerna repa	Banatsko Novo Selo
37.	ŠR104/13	Šećerna repa	Indija
38.	ŠR95/13	Šećerna repa	Novo Miloševo
39.	ŠR80/13	Šećerna repa	Stara Pazova
40.	ŠR16/13	Šećerna repa	Ečka
41.	ŠR82/13	Šećerna repa	Čortanovci
42.	ŠR84/13	Šećerna repa	Beška
43.	ŠR70/13	Šećerna repa	Šimanovci
44.	ŠR45/13	Šećerna repa	Pančevo
45.	ŠR110/13	Šećerna repa	Indija
46.	ŠR71/13	Šećerna repa	Donji Petrovac



## 6.2. Provera patogenosti izolata *M. phaseolina*

Provera patogenosti dobijenih izolata *M. phaseolina* izvršena je na mladim biljkama šećerne repe u fazi razvoja 4 prava lista (BBCH 14). Utvrđeno je da su svi izolati nakon 7 dana inkubacije u klima komori na 30 °C prouzrokovali uvenuće biljaka, hlorozu listova, nekrozu korena i konačno potpuno propadanje biljaka, dok u kontrolnoj varijanti nije došlo do pojave simptoma ugljenaste truleži korena (Slika 9). Nakon vađenja biljaka i ocene intenziteta oboljenja prema skali iz Tabele 1, urađena je analiza varijanse čiji rezultati ukazuju na to da postoje značajne razlike u nivou patogenosti između različitih izolata patogena ( $p < 0,05$ ) (Tabela 17).

Tabela 17. Jednofaktorijalna analiza varijanse intenziteta truleži na veštački inokulisanim biljkama šećerne repe

Izvori varijacije	Suma kvadrata (SS)	Stepeni slobode (Df)	Sredina kvadrata (MS)	F - odnos (F)	Nivo značajnosti (p)
<b>Izolat</b>	104,413	45	2,320	7,361	0,00*

\*Statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ )



Slika 9. Trulež korena inokuliranih biljaka šećerne repe (A) i zdrav koren u kontrolnoj varijanti (B) (Original)

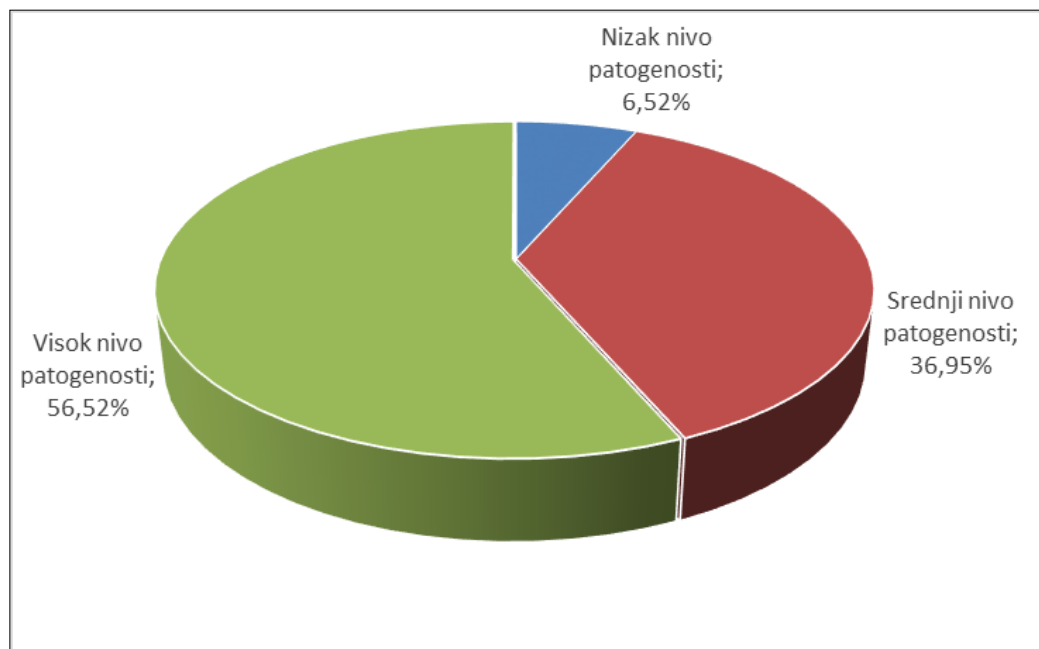
Prema nivou patogenosti koju su ispoljili, izolati su podjeljeni u tri grupe (Grafik 1). Nizak nivo patogenosti zabeležen je kod 3 izolata (6% ispitivanih izolata) ŠR51/12, MPHKU i ŠR39(2)/09. Srednji nivo patogenosti je zabeležen kod 17 (37%) izolata. Visok nivo patogenosti je utvrđen kod najvećeg broja izolata, njih 26 (57%) je ispoljilo ovu osobinu, dok je unutar grupe zabeležena značajna razlika između izolata ŠR84/13, ŠR16/13, ŠR15/11, ŠR1/11, ŠR75/13, ŠR62(4)/09, ŠR82/13, ŠR34/12, ŠR5/09 koji su iskazali najviši nivo patogenosti i izolata ŠR3/09, ŠR55(3)/09, ŠR24M/10, ŠR45(4)/09 kod kojih je patogenost bila na nižem nivou statističke značajnosti (Tabela 18).

Tabela 18. Patogenost izolata *M. phaseolina*

Izolat	Intenzitet oboljenja	Rang	Izolat	Intenzitet oboljenja	Rang
ŠR51/12	1,00	a	ŠR45(4)/09	3,00	efgh
MPHCU	1,50	ab	ŠR23/11	3,25	fghi
ŠR39(2)/09	1,75	abc	ŠR49(5)/09	3,25	fghi

ŠR40/12	2,00	bcd	ŠR110/13	3,25	fghi
ŠR95/13	2,00	bcd	ŠR62(5)/09	3,25	fghi
ŠR36/12	2,25	bcde	ŠR45/13	3,25	fghi
ŠR71/13	2,25	bcde	ŠR65(2)/09	3,25	fghi
ŠR97/12	2,25	bcde	ŠR14/09	3,50	ghi
ŠR32/12	2,50	cdef	MPSU	3,50	ghi
ŠR70/13	2,50	cdef	ŠR31(2)/09	3,50	ghi
ŠR45/12	2,50	cdef	ŠR85/12	3,75	hi
ŠR38/12	2,50	cdef	ŠR52/12	3,75	hi
ŠR10/09	2,50	cdef	ŠR5/12	3,75	hi
ŠR52/13	2,50	cdef	ŠR80/13	3,75	hi
ŠR104/13	2,50	cdef	ŠR84/13	4,00	i
MPSO	2,50	cdef	ŠR16/13	4,00	i
ŠR42(1)/09	2,75	defg	ŠR15/11	4,00	i
ŠR30/12	2,75	defg	ŠR1/11	4,00	i
ŠR9M/10	2,75	defg	ŠR75/13	4,00	i
ŠR55(3)/09	2,75	defg	ŠR62(4)/09	4,00	i
ŠR3/09	3,00	efgh	ŠR82/13	4,00	i
ŠR32/13	3,00	efgh	ŠR34/12	4,00	i
ŠR24M/10	3,00	efgh	ŠR5/09	4,00	i

\*Vrednosti obeležene istim slovom su na istom nivou značajnosti u intervalu poverenja 95%



Grafik 1. Udeo izolata *M. phaseolina* prema nivou patogenosti na mladim biljkama šećerne repe.

### 6.3. Određivanje brzine porasta i morfološko - odgajivačkih karakteristika izolata *M. phaseolina*

#### 6.3.1. Brzina porasta izolata *M. phaseolina*

Uticaj hranljivih podloga na brzinu porasta kolonija *M. phaseolina* je ispitan na KDA i MIN + KClO<sub>3</sub> podlogama. Prečnik kolonija je izmeren nakon tri i pet dana inkubacije u termostatu na 25 °C. Rezultati jednofaktorijalne analize varijanse nakon 3 dana inkubacije ukazuju da postoje značajne razlike u brzini porasta kolonija izolata na obe ispitivane podloge ( $p < 0,05$ ) (Tabela 19). Nakon pet dana inkubacije uočeno je postojanje značajnih razlika u brzini rasta kolonija između izolata na MIN + KClO<sub>3</sub> podlozi, dok u slučaju izolata gajenih na KDA podlozi nisu zabeležene značajne razlike, odnosno svi izolati su dostigli maksimum porasta, te su ispunili površinu Petri kutije (Tabela 20).

Tabela 19. Jednofaktorijalna analiza varijanse prečnika kolonije izolata *M. phaseolina* gajene na KDA i MIN + KClO<sub>3</sub> podlozi nakon tri dana

Izvori varijacije	Suma kvadrata (SS)	Stepeni slobode (Df)	Sredina kvadrata (MS)	F - odnos (F)	Nivo značajnosti (p)
Izolati na KDA	21618,7	45	480,4	447,2	0,00*
Izolati na MIN + KClO <sub>3</sub>	35662,61	45	792,50	217,86	0,00*

\*Statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ )

Tabela 20. Jednofaktorijalna analiza varijanse prečnika kolonije izolata *M. phaseolina* gajene na MIN + KClO<sub>3</sub> podlozi nakon pet dana

Izvori varijacije	Suma kvadrata (SS)	Stepeni slobode (Df)	Sredina kvadrata (MS)	F - odnos (F)	Nivo značajnosti (p)
Izolati na MIN + KClO <sub>3</sub>	121418,4	45	2698,2	154,57	0,00*

\*Statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ )

Na osnovu post hoc Duncan MRT testa može se uočiti izdvajanje izolata u grupe prema brzini porasta kolonije kako na KDA, tako i na MIN + KClO<sub>3</sub> podlozi nakon tri dana inkubacije (Tabela 21). Najbrži porast kod svih izolata je registrovan na KDA podlozi, dok je značajno manji na MIN + KClO<sub>3</sub>. Najsporiji porast kolonije na KDA podlozi su imali izolati ŠR45(4)/09, MPHKU, ŠR49(5)/09, ŠR51/12, ŠR42(1)/09, ŠR85/12, ŠR31(2)/09, dok je najbrži porast zabeležen kod sledećih izolata ŠR3/09, ŠR52/13, ŠR40/12, ŠR55(3)/09, ŠR45/12, ŠR32/13, ŠR30/12, ŠR23/11, ŠR34/12. Nakon pet dana inkubacije svi izolati su ispunili površinu hranljive KDA podloge u Petri kutiji. Nakon tri dana razvoja na MIN + KClO<sub>3</sub> podlozi porast kolonije kod svih izolata je bio u proseku značajno manji nego na KDA podlozi. Izolati koji uopšte nisu ostvarili rast na MIN + KClO<sub>3</sub> podlozi su ŠR23/11, MPHSO, MPHKU, a najveći rast su ostvarili ŠR5/09, ŠR14/09, ŠR55(3)/09. Nakon pet dana kod izolata ŠR23/11, MPHSO, MPHKU je porast kolonije ostao nepromenjen, dok je kod sledećih izolata zabeležen najveći rast kolonije u Petri kutiji ŠR15/11, ŠR38/12, ŠR14/09, ŠR65(2)/09, ŠR49(5)/09, ŠR55(3)/09, ŠR75/13.

Tabela 21. Uticaj hranljive podloge na porast kolonije izolata *M. phaseolina* nakon tri i nakon pet dana inkubacionog perioda

Izolat	3. dan				5. dan			
	KDA		MIN + KCIO3		KDA		MIN + KCIO3	
	Prečnik kolonije (mm)	Rang	Prečnik kolonije (mm)	Rang	Prečnik kolonije (mm)	Rang	Prečnik kolonije (mm)	Rang
MPHKU	39,00±1,83	b	0,00±0,00	a	85,00±0,00	a	0,00±0,00	a
MPHSO	71,25±0,50	ij	0,00±0,00	a	85,00±0,00	a	0,00±0,00	a
MPHSU	72,50±1,91	jk	21,00±1,15	mn	85,00±0,00	a	47,50±2,89	i
ŠR16/13	74,50±0,58	l	20,00±0,00	ljm	85,00±0,00	a	56,00±1,15	j
ŠR97/12	73,75±1,50	kl	29,00±1,15	o	85,00±0,00	a	72,50±2,89	lljm
ŠR1/11	74,00±1,15	kl	23,75±1,50	nnj	85,00±0,00	a	70,00±0,00	kljlm
ŠR10/09	64,50±1,00	g	20,00±0,82	ljm	85,00±0,00	a	56,00±1,15	j
ŠR104/13	64,25±0,96	g	16,50±1,73	l	85,00±0,00	a	45,00±5,77	hi
ŠR110/13	65,00±0,00	gh	12,00±0,00	ghi	85,00±0,00	a	35,00±0,00	fg
ŠR14/09	70,75±0,96	i	50,00±1,63	st	85,00±0,00	a	80,00±0,00	n
ŠR15/11	75,00±0,00	l	40,00±0,00	p	85,00±0,00	a	80,00±0,00	n
ŠR23/11	85,00±0,00	n	0,00±0,00	a	85,00±0,00	a	0,00±0,00	a
ŠR24M/10	70,00±0,00	i	6,25±2,06	bcd	85,00±0,00	a	25,00±5,77	de
ŠR3/09	76,75±1,50	lj	29,75±2,63	o	85,00±0,00	a	70,50±5,20	kljlm
ŠR30/12	84,00±1,15	n	3,75±1,50	b	85,00±0,00	a	22,50±2,89	d
ŠR31(2)/09	59,25±1,50	f	16,25±4,11	kl	85,00±0,00	a	42,50±14,43	hi
ŠR32/12	73,75±1,50	kl	8,75±1,50	def	85,00±0,00	a	30,00±5,77	ef
ŠR32/13	80,00±0,00	m	31,50±4,04	o	85,00±0,00	a	75,00±5,77	ljmn
ŠR34/12	85,00±0,00	n	24,75±3,20	nj	85,00±0,00	a	69,00±4,62	klj
ŠR36/12	64,25±0,96	g	25,00±0,00	nj	85,00±0,00	a	75,00±0,00	ljmn
ŠR38/12	70,00±0,00	i	39,50±1,00	p	85,00±0,00	a	80,00±0,00	n
ŠR39(2)/09	75,00±0,00	l	17,75±0,50	llj	85,00±0,00	a	65,00±0,00	k
ŠR40/12	80,00±0,00	m	20,00±5,77	ljm	85,00±0,00	a	67,50±8,66	kl
ŠR42(1)/09	53,75±2,50	e	5,75±0,96	bcd	85,00±0,00	a	20,00±0,00	cd
ŠR45(4)/09	35,75±0,96	a	7,25±0,50	cde	85,00±0,00	a	23,50±1,73	d
ŠR45/12	80,00±0,00	m	24,25±0,96	nj	85,00±0,00	a	71,50±1,73	kljlm
ŠR45/13	65,00±0,00	gh	11,00±1,83	fgh	85,00±0,00	a	25,00±5,77	de
ŠR49(5)/09	45,50±1,00	c	38,25±1,26	p	85,00±0,00	a	80,00±0,00	n
ŠR5/09	74,50±1,00	l	48,25±2,36	s	85,00±0,00	a	76,00±1,15	mn
ŠR5/12	66,25±0,96	h	8,00±0,00	cde	85,00±0,00	a	20,00±0,00	cd
ŠR51/12	50,00±2,31	d	12,50±2,89	ghij	85,00±0,00	a	47,50±8,66	i
ŠR52/12	70,00±0,00	i	5,00±0,00	bc	85,00±0,00	a	10,00±0,00	b
ŠR52/13	79,75±0,50	m	30,25±2,63	o	85,00±0,00	a	65,00±5,77	k
ŠR55(3)/09	80,00±0,00	m	52,50±2,89	t	85,00±0,00	a	80,00±0,00	n
ŠR62(4)/09	7500±0,00	l	9,75±2,36	efg	85,00±0,00	a	25,00±5,77	de
ŠR62(5)/09	74,00±1,15	kl	30,25±0,50	o	85,00±0,00	a	72,50±2,89	lljm
ŠR65(2)/09	71,00±1,15	ij	43,25±2,36	r	85,00±0,00	a	80,00±0,00	n
ŠR70/13	71,00±1,15	ij	13,50±1,73	hijk	85,00±0,00	a	32,50±2,89	f
ŠR71/13	64,00±1,15	g	23,00±0,00	nnj	85,00±0,00	a	70,00±0,00	kljlm
ŠR75/13	74,00±1,15	kl	40,75±0,96	pr	85,00±0,00	a	80,00±0,00	n
ŠR80/13	64,25±0,96	g	6,75±1,50	bcd	85,00±0,00	a	22,50±8,66	d
ŠR82/13	75,00±0,00	l	30,00±0,00	o	85,00±0,00	a	75,00±0,00	ljmn
ŠR84/13	74,00±1,15	kl	17,50±2,89	llj	85,00±0,00	a	35,00±5,77	fg
ŠR85/12	55,00±0,00	e	4,00±0,00	b	85,00±0,00	a	15,00±0,00	bc
ŠR95/13	74,25±0,96	l	15,00±0,00	jkl	85,00±0,00	a	41,50±1,73	hi
ŠR9M/10	<b>66,25±0,96</b>	<b>h</b>	<b>14,75±0,50</b>	<b>ijkl</b>	<b>85,00±0,00</b>	<b>a</b>	<b>40,00±0,00</b>	<b>gh</b>

\*Vrednosti obeležene istim slovom su na istom nivou značajnosti u intervalu poverenja 95%; (±) – standardna

devijaci

### 6.3.2. Morfološke karakteristike izolata *M. phaseolina*

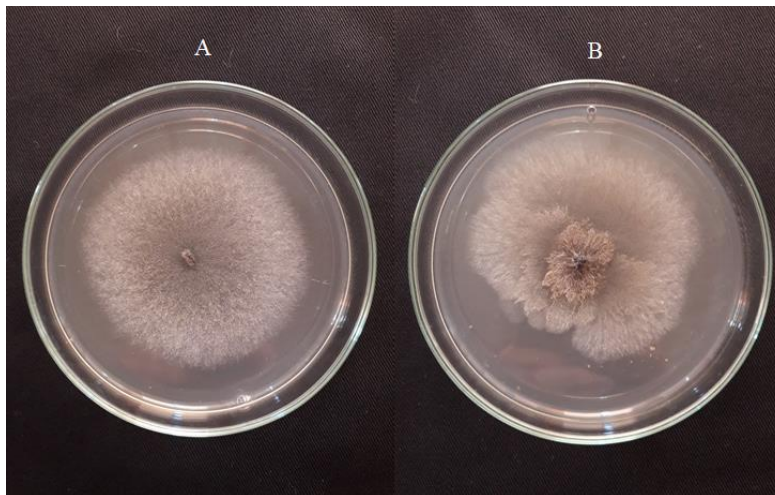
Na osnovu ispitanih makroskopskih morfoloških karakteristika patogena nakon pet dana inkubacije izolata na KDA i MIN + KClO<sub>3</sub> podlozi, izolati su podeljeni u različite grupe u zavisnosti od posmatranih osobina (Tabela 22).

Najveći broj izolata (91%, odnosno 42 izolata) na KDA podlozi je obrazovao kolonije radijalnog oblika, dok su 4 (9%) izolata formirala kolonije režnjevito oblika. Prema intenzitetu formiranja vazdušne micelije izolati su se podelili u četiri grupe: (i) grupa od 23 (50%) izolata predstavlja one koji su ispoljili nizak intenzitet formiranja vazdušne micelije; (ii) grupu 17 izolata (37%) predstavlja izolate kod kojih je zabeležen srednji intenzitet formiranja vazdušne micelije; (iii) grupu predstavlja 5 (11%) izolata gde je zabeležen visoki intenzitet formiranja vazdušne micelije i (iv) grupu predstavlja samo izolat ŠR23/11 (2%) koji je ispoljio veoma visok intenzitet formiranja vazdušne micelije. Kada je reč o intenzitetu formiranja mikrosklerocija, izolati su takođe raspoređeni u četiri grupe: (i) grupa od 23 (50%) izolata koji su ispoljili visok intenzitet formiranja mikrosklerocija; (ii) grupa od 16 (35%) izolata kod kojih je zabeležen srednji intenzitet formiranja mikrosklerocija; (iii) grupu 5 (11%) izolata kod kojih je zabeležen srednji intenzitet formiranja mikrosklerocija, i (iv) grupa koju čine svega 2 (4%) izolata kod kojih je zabeležen nizak intenzitet formiranja mikrosklerocija.

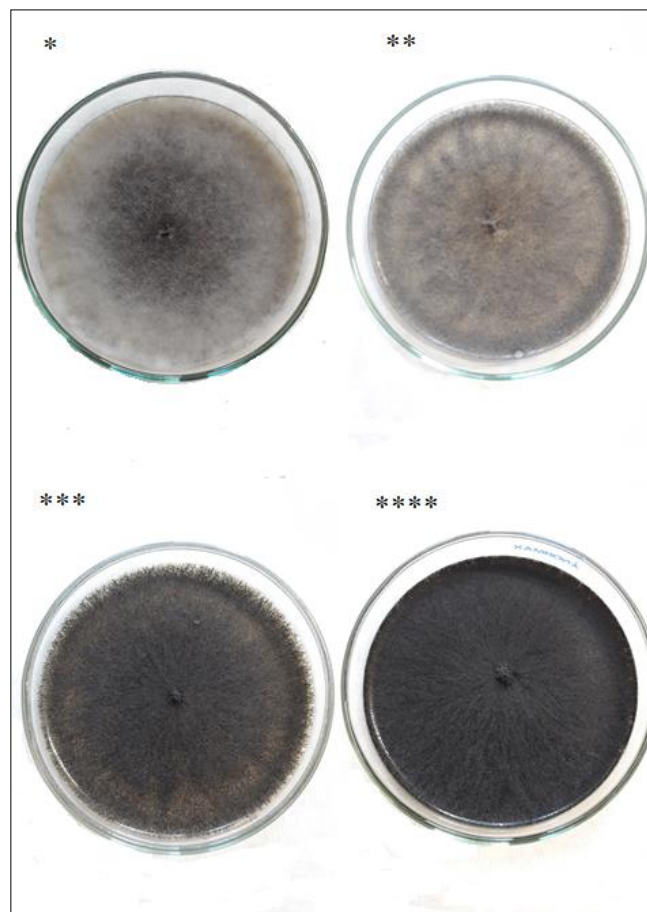
Tabela 22. Makroskopske osobine izolata *M. phaseolina* na KDA podlozi

Oblik kolonije	Broj izolata	%	Intenzitet formiranja vazdušne micelije			Intenzitet formiranja mikrosklerocija		
			+	++	+++	+	++	+++
A	42	91	+	23	50	*	2	4
B	4	9	++	17	37	**	16	35
			+++	5	11	***	23	50
			++++	1	2	****	5	11

\*A radijalni, B režnjeviti; + nizak, ++srednji, +++ visok, ++++ veoma visok; \* nizak, \*\* srednji, \*\*\* visok, \*\*\*\* veoma visok



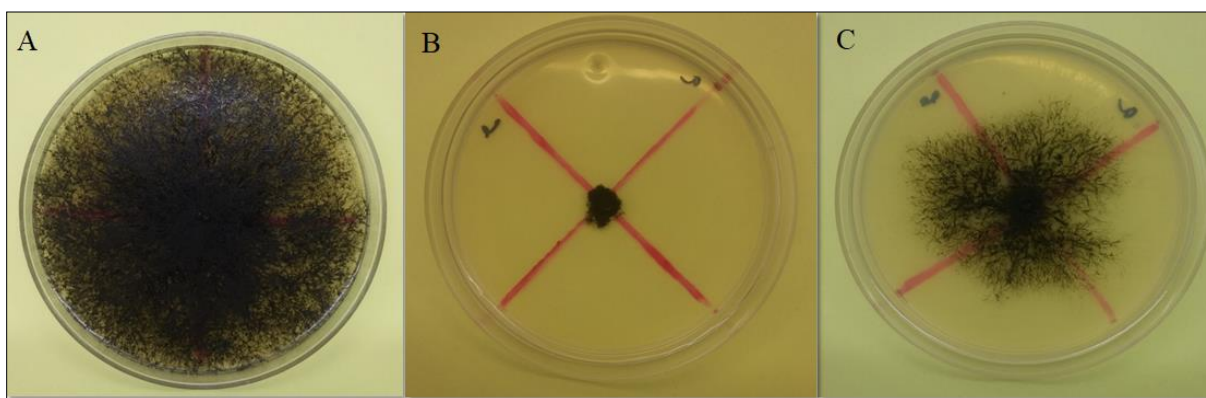
Slika 10. Oblik kolonije izolata *M. phaseolina* radijalni (A) i režnjeviti (B) (Original)



Slika 11. Intenzitet formiranja mikrosklerocija *M. phaseolina* (\* nizak, \*\* srednji, \*\*\* visok, \*\*\*\* veoma visok) (Original)



Nakon pet dana inkubacije na MIN + KClO<sub>3</sub> podlozi izolati *M. phaseolina* su podeljeni u tri grupe u zavisnosti od toga da li su ispoljili osetljivost na prisustvo hlora u podlozi (Tabela 23). Izolati koji nisu ostvarili porast kolonije tj. imaju ograničen porast i izolati koji imaju paperjast porast na hranljivoj podlozi su osetljivi na prisustvo hlora, dok su izolati koji imaju normalan porast kolonije otporni na prisustvo hlora u podlozi. U prvoj grupi izolata koji imaju normalan porast i nisu ispoljili osetljivost prema hlору je svega 4 (9%) izolata: ŠR55(9)/09, ŠR38/12, ŠR75/13, ŠR32/13. U drugoj grupi se nalazi 15 izolata, odnosno 32% od ukupnog broja izolata i imaju ograničen porast i ispoljili su izuzetnu osetljivost prema hlору koji je blokirao razvoj u potpunosti, ili je ograničio porast kolonije u zoni oko zasejanog fragmenta gljive. Treću grupu čini 27 izolata, odnosno 59% koji su takođe ispoljili osetljivost prema hlору i imali su paperjast porast (Slika 12).



Slika 12. Fenotip kolonije izolata *M. phaseolina* na MIN + KClO<sub>3</sub> podlozi, gust (A), ograničen (B), paperjast (C) (Orig.)

Tabela 23. Fenotip kolonije izolata *M. phaseolina* na MIN + KClO<sub>3</sub> podlozi

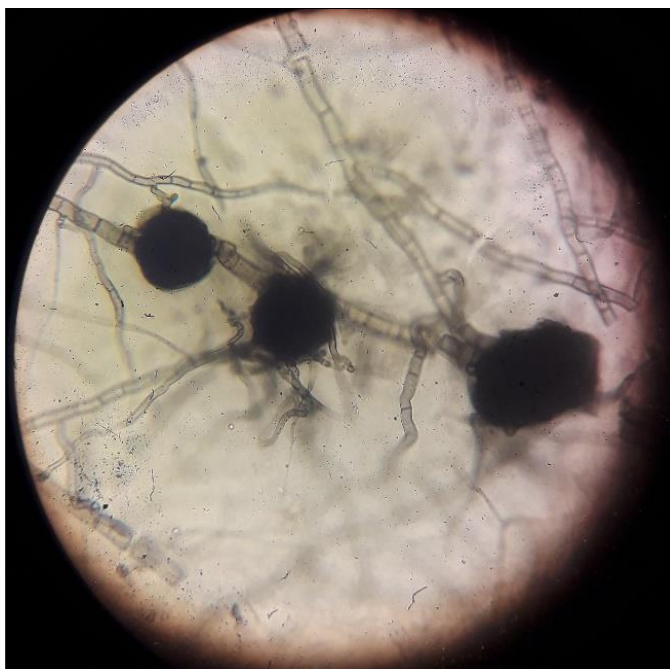
Fenotip kolonije	Izolati	Broj izolata	Procenat (%)
<b>Gust (A)</b>	ŠR32/13; ŠR75/13; ŠR38/12; ŠR55(3)/09	4	9
<b>Ograničen (B)</b>	ŠR42(1)/09; ŠR45(4)/09; ŠR62(4)/09; MPHKU; ŠR23/11; ŠR24M/10; ŠR30/12; ŠR85/12; ŠR5/12; ŠR32/12; MPHSU; ŠR80/13; ŠR84/13; ŠR70/13; ŠR45/13	15	32
<b>Paperjast (C)</b>	ŠR5/09; ŠR14/09; ŠR10/09; ŠR3/09; ŠR9M/10; ŠR1/11; ŠR39(2)/09; ŠR65(2)/09; ŠR49(5)/09; ŠR62(5)/09; ŠR31(2)/09; ŠR15/11; ŠR34/12;	27	59

---

ŠR45/12; ŠR36/12; ŠR 97/12; ŠR51/12; ŠR40/12;  
ŠR52/12; ŠR52/13; MPHSO; ŠR104/13; ŠR95/13; ŠR  
16/13; ŠR82/13

---

Proučavanjem mikroskopskih morfoloških svojstava tj. veličine mikrosklerocija na KDA podlozi utvrđeno je da postoje značajne statističke razlike između izolata (Tabela 24). Veličina mikrosklerocija (Slika 13) se kretala od 112,50 x 105,00  $\mu\text{m}$  do 167,50 x 147,50  $\mu\text{m}$ . Najmanja veličina mikrosklerocija je zabeležena kod izolata ŠR5/12, ŠR30/12, ŠR62(4)/09, ŠR84/13, ŠR82/13, MPHSO, ŠR104/13, ŠR75/13, ŠR32/12, ŠR95/13, ŠR70/13 dok su najveće dimenzije mikrosklerocija zabeležene kod ŠR1/11, ŠR10/09, ŠR62(5)/09, ŠR110/13, ŠR9M/10, ŠR3/09, ŠR49(5)/09, MPHSU. Formiranje piknida na ovoj hranljivoj podlozi nije zabeleženo.



Slika 13. Mikrosklerocije i hife *M. phaseolina* (Original)

Tabela 24. Veličina mikrosklerocija *M. phaseolina* na KDA podlozi nakon sedam dana inkubacije

Izolot	Visina ( $\mu\text{m}$ )	Rang	Širina ( $\mu\text{m}$ )	Rang
MPHKU	150,00±16,66	fghijk	132,50±16,87	fghijk
MPHSO	120,00±19,72	abc	102,50±18,44	ab
MPHSU	167,50±23,71	k	147,50±24,86	kllj
ŠR1/11	160,00±26,87	jk	152,50±24,86	llj
ŠR10/09	160,00±31,62	jk	157,50±26,48	lj
ŠR104/13	120,00±15,81	abc	107,50±12,07	abc
ŠR110/13	160,00±26,87	jk	132,50±20,58	fghijk
ŠR14/09	150,00±28,86	fghijk	132,50±20,58	fghijk
ŠR15/11	137,50±31,73	bcdefghi	115,00±25	bcdef
ŠR16/13	155,00±30,73	hijk	135,00±31,62	ghijkl
ŠR23/11	155,00±22,97	hijk	135,00±17,48	ghijkl
ŠR24M/10	132,50±20,58	abcdefg	135,00±12,90	ghijkl
ŠR3/09	160,00±26,87	jk	145,00±25,81	jkllj
ŠR30/12	112,50±27,00	a	107,50±26,48	abc
ŠR31(2)/09	127,50±18,44	abcde	120,00±15,81	bcdefgh
ŠR32/12	120,00±15,81	abc	110,00±12,90	abcd
ŠR32/13	140,00±21,00	cdefghi	117,50±20,41	bcdefg
ŠR34/12	152,50±29,93	ghijk	125,00±19,72	cdefghi
ŠR36/12	145,00±10,54	defghi	145,00±17,48	jkllj
ŠR38/12	135,00±21,08	bcdefgh	135,00±17,67	ghijkl
ŠR39(2)/09	155,00±22,97	hijk	137,50±31,29	hijkl
ŠR40/12	152,50±29,93	ghijk	132,50±21,08	fghijk
ŠR42(1)/09	152,50±18,44	ghijk	115,00±16,87	bcdef
ŠR45(4)/09	140,00±24,15	cdefghi	117,50±22,97	bcdefg
ŠR45/12	137,50±24,29	bcdefghi	145,00±20,58	jkllj
ŠR45/13	130,00±30,73	abcdef	132,50±27,00	fghijk
ŠR49(5)/09	167,50±33,43	k	137,50±26,87	hijkl
ŠR5/09	150,00±35,35	fghijk	140,00±19,72	ijkllj
ŠR5/12	112,50±17,67	a	105,00±19,72	ab
ŠR51/12	157,50±28,98	ijk	135,00±17,48	ghijkl
ŠR52/12	147,50±27,51	efghijk	127,50±18,44	defghij
ŠR52/13	125,00±16,66	abcd	130,00±19,72	efghijk
ŠR55(3)/09	145,00±28,38	defghi	127,50±24,86	defghij
ŠR62(4)/09	117,50±23,71	ab	95,00±22,97	a
ŠR62(5)/09	160,00±31,62	jk	153,75±26,38	llj

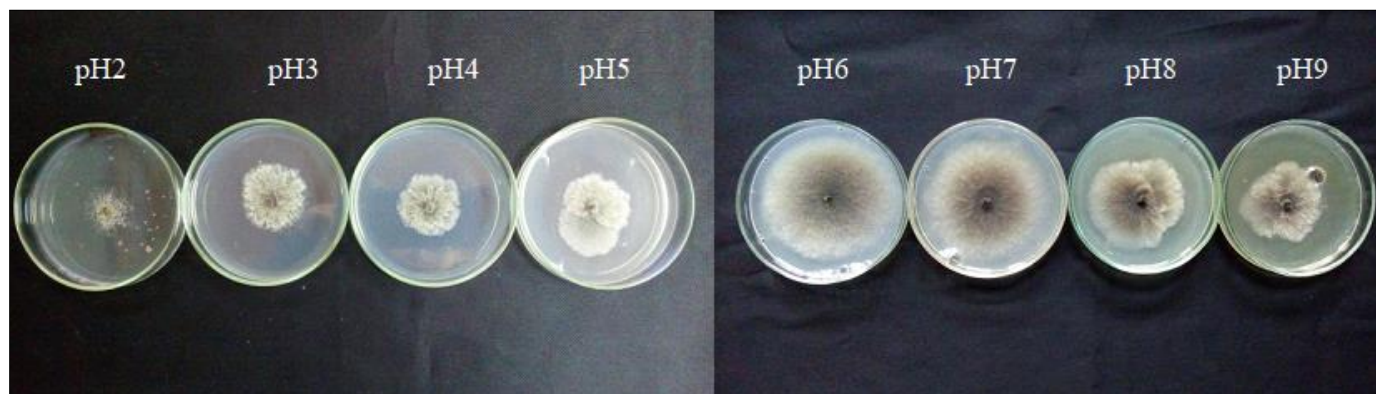
<b>Izolat</b>	<b>Visina (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Rang</b>	<b>Širina (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Rang</b>
ŠR65(2)/09	147,50±24,86	efghijk	127,50±24,86	defghij
ŠR70/13	120,00±30,73	abc	95,00±17,51	a
ŠR71/13	137,50±21,24	bcdefghi	130,00±19,72	efghijk
ŠR75/13	120,00±19,72	abc	120,00±15,81	bcdefgh
ŠR80/13	127,50±18,44	abcde	120,00±15,81	bcdefgh
ŠR82/13	117,50±12,07	ab	117,50±16,87	bcdefg
ŠR84/13	117,50±20,58	ab	110,00±17,48	abcd
ŠR85/12	132,50±28,98	bcdefg	120,00±34,96	bcdefgh
ŠR95/13	120,00±15,81	abc	112,50±13,17	abcde
ŠR97/12	145,00±19,72	defghi	132,50±16,87	fghijk
ŠR9M/10	160,00±26,87	jk	145,00±25,81	jklj

\*Vrednosti obeležene istim slovom su na istom nivou značajnosti u intervalu poverenja 95%; ( $\pm$ ) – standardna devijacija

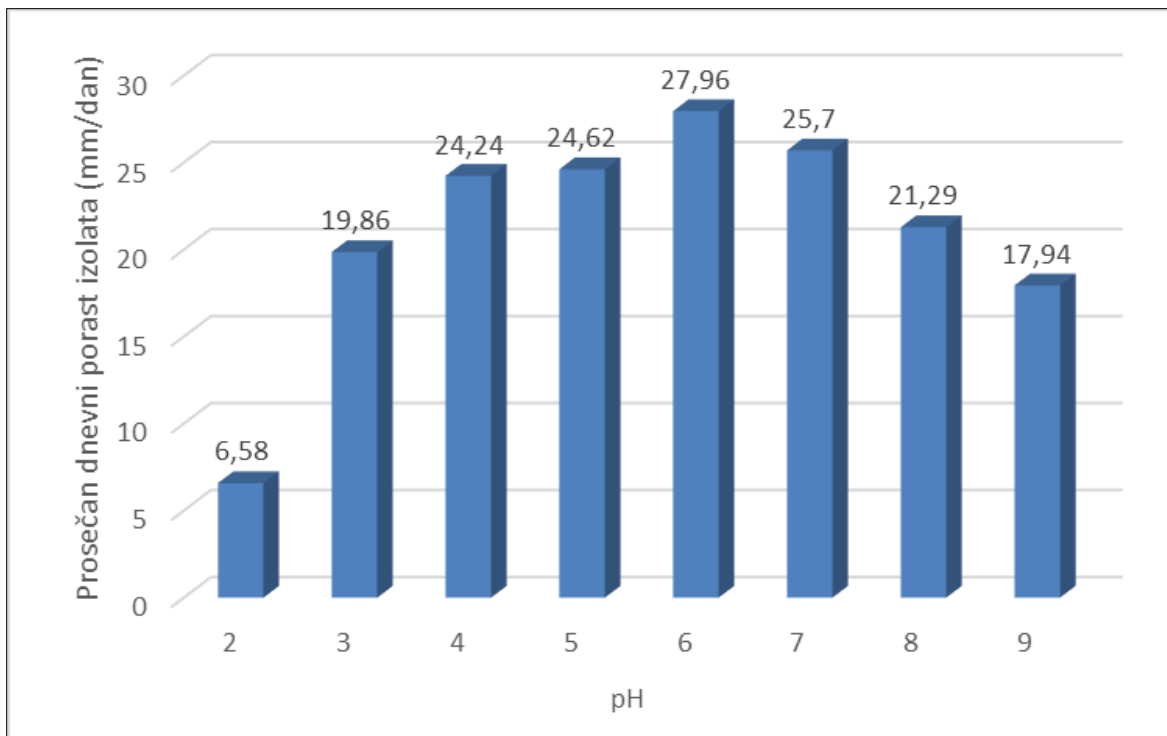
### 6.3.3. Odgajivačke karakteristike izolata *M. phaseolina*

#### 6.3.3.1. Uticaj pH vrednosti i temperature na porast izolata *M. phaseolina*

Dnevni porast micelije 46 izolata praćen je na različitim pH vrednostima KDA podloge od pH 2 do pH 9 (Slika 14). Uočena je značajna razlika u brzini dnevnog porasta kolonija (Tabela 25) na svim pH vrednostima kod svih ispitivanih izolata ( $p < 0,05$ ). Najveći prosečan dnevni porast micelije je zabeležen na pH 6 koji je iznosio 27,96 mm/dan. Takođe na pH 4, 5, 7 i 8 izolati su ispoljili optimalan porast, a uočene su i značajne statističke razlike između izolata. Najmanji porast kolonije registrovan je na pH 2, dok je kod izolata MPHKU, MPHSU, ŠR32/12 došlo do potpunog prekida rasta micelije (Grafik 2). Osim razlika u brzini porasta kolonije ispoljena je i razlika u morfološkim osobinama na podlogama različite pH vrednosti u slučaju izolata ŠR51/12. Naime, pomenuti izolat je na podlogama pH vrednosti 4, 5, 8 i 9 ŠR51/12 je formirao koloniju režnjevito oboda dok je na drugim pH vrednostima obod kolonije bio ravan.



Slika 14. Porast kolonije izolata ŠR51/12 pri različitim pH vrednostima KDA hranljive podloge nakon 3 dana inkubacije (Original)



Grafik 2. Prosečan dnevni porast izolata *M. phaseolina* na različitim pH vrednostima KDA podloge

Tabela 25. Uticaj različite pH vrednosti KDA hranjive podloge na dnevni porast kolonije izolata

*M. phaseolina* nakon tri dana

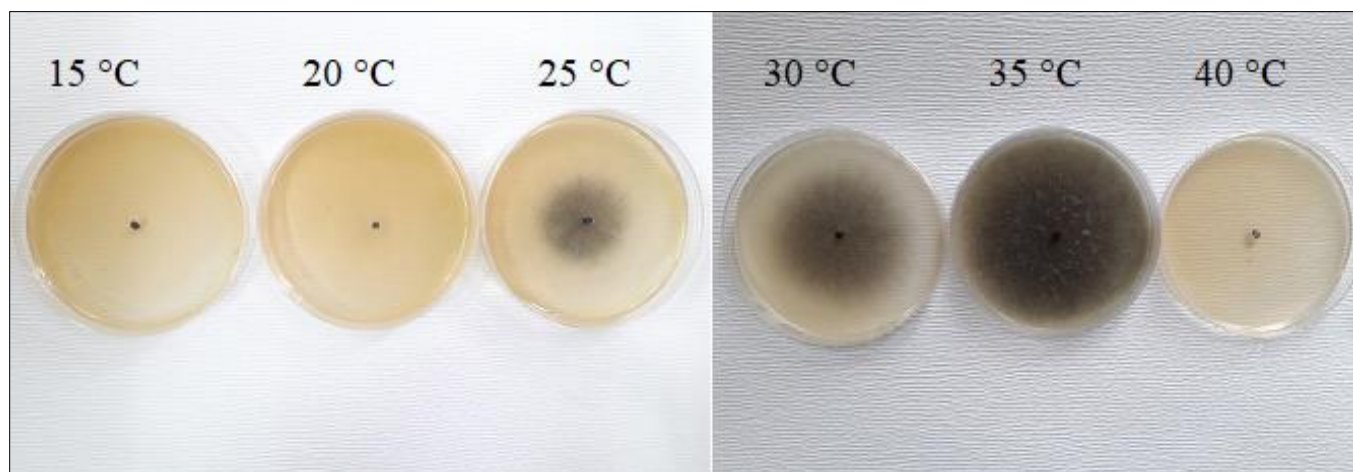
Izolati	pH 2		pH 3		pH 4		pH 5		pH 6		pH 7		pH 8		pH 9	
	Dnevni porast kolonije (mm/dan)	Rang	Dnevni porast kolonije (mm/dan)	Rang	Dnevni porast kolonije (mm/dan)	Rang	Dnevni porast kolonije (mm/dan)	Rang	Dnevni porast kolonije (mm/dan)	Rang	Dnevni porast kolonije (mm/dan)	Rang	Dnevni porast kolonije (mm/dan)	Rang	Dnevni porast kolonije (mm/dan)	Rang
MPHKU	0,00±0,00	a	6,66±0,00	a	10,00±0,00	a	16,66±0,00	b	20,00±0,00	b	16,66±0,00	a	11,00±0,00	a	10,00±0,00	a
MPHSO	8,67±0,38	ljm	20,00±0,00	ij	25,00±0,00	j	24,66±0,38	h	26,33±0,38	h	21,66±0,00	d	18,00±0,38	cd	12,50±0,96	c
MPHSU	0,00±0,00	a	23,33±0,00	nj	26,66±0,00	l	23,33±0,00	g	26,66±0,00	g	23,33±0,00	e	20,00±0,00	efg	20,00±0,00	jk
ŠR1/11	4,00±0,00	c	21,33±0,38	mn	23,33±0,00	h	22,33±0,00	f	23,33±0,00	f	20,00±0,00	c	17,50±0,96	c	15,00±0,00	e
ŠR10/09	5,00±0,00	e	20,66±0,00	kl	26,66±0,00	l	27,33±0,00	k	30,00±0,00	k	28,33±0,00	l	24,16±0,96	l	21,66±0,00	lj
ŠR104/13	4,00±0,00	c	17,33±0,00	f	21,66±0,00	f	21,66±0,00	e	28,33±0,00	e	23,33±0,00	h	20,00±0,00	fg	16,66±0,00	fg
ŠR110/13	4,50±0,38	d	20,33±0,38	jk	25,83±0,96	k	25,00±0,00	h	28,33±0,00	h	25,00±0,00	g	20,00±0,00	efg	18,00±0,38	hi
ŠR14/09	8,33±0,00	lij	20,00±0,00	ij	28,33±0,00	m	25,00±0,00	h	30,00±0,00	h	27,83±0,57	k	21,66±0,00	hij	18,66±0,38	i
ŠR15/11	8,00±0,38	jk	21,66±0,00	n	26,66±0,00	l	25,00±0,00	h	30,00±0,00	h	26,66±0,00	ij	23,66±0,38	lijm	20,83±0,96	l
ŠR16/13	5,67±0,00	f	18,33±0,00	g	23,33±0,00	h	26,66±0,00	j	28,33±0,00	j	26,66±0,00	h	20,00±0,00	f	16,66±0,00	fg
ŠR23/11	3,33±0,00	b	20,00±0,00	ij	30,00±0,00	n	30,00±0,00	lj	30,00±0,00	lj	28,33±0,00	l	22,50±0,96	jk	17,50±0,96	h
ŠR24M/10	3,33±0,00	b	17,16±0,57	ef	21,66±0,00	f	24,66±0,38	h	23,33±0,00	h	23,83±0,57	c	19,16±0,19	eg	15,00±0,00	e
ŠR3/09	11,67±0,00	r	24,66±0,38	op	28,33±0,00	m	28,33±0,00	l	30,00±0,00	l	25,5±0,57	j	23,00±0,38	kl	18,33±0,00	i
ŠR30/12	10,00±0,00	nj	28,33±0,00	r	30,00±0,00	n	30,00±0,00	lj	30,00±0,00	lj	30,00±0,00	j	30,00±0,00	p	26,66±0,00	m
ŠR31(2)/09	3,33±0,00	b	16,66±0,00	e	18,33±0,00	d	20,00±0,00	c	25,00±0,00	c	26,33±0,38	e	21,66±1,92	hij	19,33±0,00	j
ŠR32/12	0,00±0,00	a	10,66±0,00	b	15,00±0,00	c	16,66±0,00	b	19,16±0,96	b	18,83±0,19	a	15,66±0,76	b	11,16±0,57	b
ŠR32/13	10,00±0,00	njo	16,66±0,00	e	25,00±0,00	j	25,00±0,00	h	29,66±0,38	h	27,00±0,38	j	19,16±0,96	eg	16,66±0,00	fg
ŠR34/12	10,33±0,38	o	21,66±0,00	n	26,66±0,00	l	28,33±0,00	l	30,00±0,00	l	30,00±0,00	j	26,66±0,00	nj	20,41±0,83	kl
ŠR36/12	6,66±0,00	hi	20,00±0,00	ij	24,66±0,38	j	23,33±0,00	g	25,00±0,00	g	20,00±0,00	e	18,33±0,00	c	18,33±0,00	d
ŠR38/12	9±0,38	m	24,16±0,96	o	25,00±0,00	j	30,00±0,00	lj	30,00±0,00	lj	28,33±0,00	l	21,66±0,00	hij	21,66±0,00	lj
ŠR39(2)/09	10,66±0,00	p	20,00±0,00	ij	30,00±0,00	n	28,66±0,38	l	30,00±0,00	l	28,33±0,00	j	23,33±0,00	lij	11,66±0,00	b
ŠR40/12	5±0,00	e	20,00±0,00	ij	24,66±0,38	j	25,00±0,00	h	29,00±0,00	h	25,83±0,96	i	25,66±0,00	h	21,66±0,00	lj
ŠR42(1)/09	8,33±0,00	lij	17,16±0,00	ef	20,00±0,00	e	21,00±0,00	d	30,00±0,00	d	30,00±0,00	j	23,33±0,00	lij	13,33±0,00	d
ŠR45(4)/09	8,33±0,00	lij	23,33±0,00	nj	26,66±0,00	l	23,33±0,00	g	30,00±0,00	g	28,33±0,00	j	21,66±0,00	hij	18,33±0,00	i

Izolat	pH 2		pH 3		pH 4		pH 5		pH 6		pH 7		pH 8		pH 9	
	Dnevni porast kolonije (mm/dan)	Rang	Dnevni porast kolonije (mm/dan)	Rang	Dnevni porast kolonije (mm/dan)	Rang	Dnevni porast kolonije (mm/dan)	Rang	Dnevni porast kolonije (mm/dan)	Rang	Dnevni porast kolonije (mm/dan)	Rang	Dnevni porast kolonije (mm/dan)	Rang	Dnevni porast kolonije (mm/dan)	Rang
ŠR45/12	5±0,00	e	21,66±0,00	n	25,00±0,00	j	25,00±0,00	h	30,00±0,00	j	30,00±0,00	m	20,00±0,00	efg	18,33±0,00	i
ŠR45/13	8,33±0,00	ljlj	20,00±0,00	ij	23,00±0,38	h	25,83±0,96	i	27,5±0,96	g	29,16±0,96	lj	23,00±0,38	kl	21,5±2,13	lj
ŠR49(S)/09	3,33±0,00	b	20,00±0,00	ij	23,33±0,00	h	25,00±0,00	h	30,00±0,00	j	28,33±0,00	l	21,66±0,00	hi	18,33±0,00	i
ŠR5/09	5±0,00	e	15,00±0,00	d	25,00±0,00	j	26,66±0,00	j	30,00±0,00	j	26,33±0,38	i	21,66±0,00	hij	18,33±0,00	i
ŠR5/12	6,66±0,00	hi	21,33±0,38	mm	23,33±0,00	h	23,33±0,00	g	30,00±0,00	j	26,33±0,38	i	21,66±0,00	hij	18,33±0,00	i
ŠR5/12	8,83±0,57	m	13,33±0,00	c	11,66±0,00	b	13,5±1,73	a	25,00±0,00	e	23,58±0,50	ef	18,33±1,92	d	12,50±0,96	c
ŠR52/12	3,33±0,00	b	20,00±0,00	ij	21,66±0,00	f	21,66±0,00	e	30,00±0,00	j	28,33±0,00	l	23,83±0,57	ljm	20,00±0,00	jk
ŠR52/13	7,33±0,00	i	19,5±0,57	hi	21,33±0,38	f	21,66±0,00	e	30,00±0,00	j	26,66±0,00	ij	21,00±0,00	h	20,00±0,00	k
ŠR55(S)/09	10±0,00	njjo	21,66±0,00	n	27,16±0,00	lj	25,00±0,00	h	28,33±0,0	h	23,33±0,00	e	21,66±0,00	hi	18,33±0,00	i
ŠR62(4)/09	6,66±0,00	g	20,00±0,00	ij	21,66±0,00	f	26,66±0,00	j	23,83±0,57	d	25,00±0,00	g	20,00±0,00	f	18,00±0,38	hi
ŠR62(S)/09	7,5±0,96	i	21,33±0,38	mm	26,66±0,00	l	25,00±0,00	h	30,00±0,00	j	28,33±0,00	l	25,00±0,00	n	18,33±0,00	i
ŠR65(C)/09	4±0,00	c	20,33±1,53	jk	24,16±0,96	i	25,00±0,00	h	30,00±0,00	j	26,66±0,00	ij	21,00±0,00	h	20,00±0,00	jk
ŠR70/13	8±0,38	jl	19,16±0,96	h	25,00±0,00	j	25,00±0,00	h	30,00±0,00	j	25,00±0,00	g	22,33±0,00	ijk	18,33±0,00	i
ŠR71/13	6,66±0,00	hi	20,83±0,96	kljlj	26,66±0,00	l	26,66±0,00	j	26,66±0,00	f	26,66±0,00	ij	20,00±0,00	efg	17,33±0,00	gh
ŠR75/13	9,33±0,00	n	23,33±0,00	njl	28,33±0,00	m	28,33±0,00	l	28,33±0,00	h	26,66±0,00	ij	20,00±0,00	f	18,33±0,00	i
ŠR80/13	5±0,00	e	21,66±0,00	n	22,16±0,19	g	21,33±0,38	de	28,33±0,00	h	23,33±0,00	e	21,66±0,00	hi	18,33±0,00	i
ŠR82/13	8,33±0,00	ljlj	18,33±0,00	g	27,16±0,57	lj	25,00±0,00	h	27,16±0,57	g	25,00±0,00	g	21,00±0,00	h	18,00±0,38	hi
ŠR84/13	8,33±0,00	ljlj	25,00±0,00	p	30,00±0,00	n	30,00±0,00	lj	30,00±0,00	j	30,00±0,00	m	28,33±0,00	o	28,33±0,00	n
ŠR85/12	7,66±0,00	ik	20,00±0,00	ij	23,33±0,00	h	21,66±0,00	e	25,00±0,00	e	23,33±0,00	e	18,33±0,00	d	15,00±0,00	e
ŠR95/13	7±0,38	h	16,66±0,00	e	20,00±0,00	e	25,00±0,00	h	28,33±0,00	h	25,00±0,00	g	21,66±0,00	hi	14,66±0,38	e
ŠR97/12	11,66±0,00	r	21,00±0,00	ljm	30,00±0,00	n	28,33±0,00	l	26,66±0,00	f	25,00±0,00	g	19,33±0,00	efg	18,00±0,00	hi
ŠR9M/10	6,66±0,00	hi	23,33±0,00	njl	25,00±0,00	j	24,66±0,38	h	28,33±0,00	h	20,00±0,00	c	20,00±0,00	efg	16,66±0,00	f
Prosečan dnevni porast (mm/dan)	6,58		19,86		24,24		24,62		27,96		25,70		21,29		17,94	

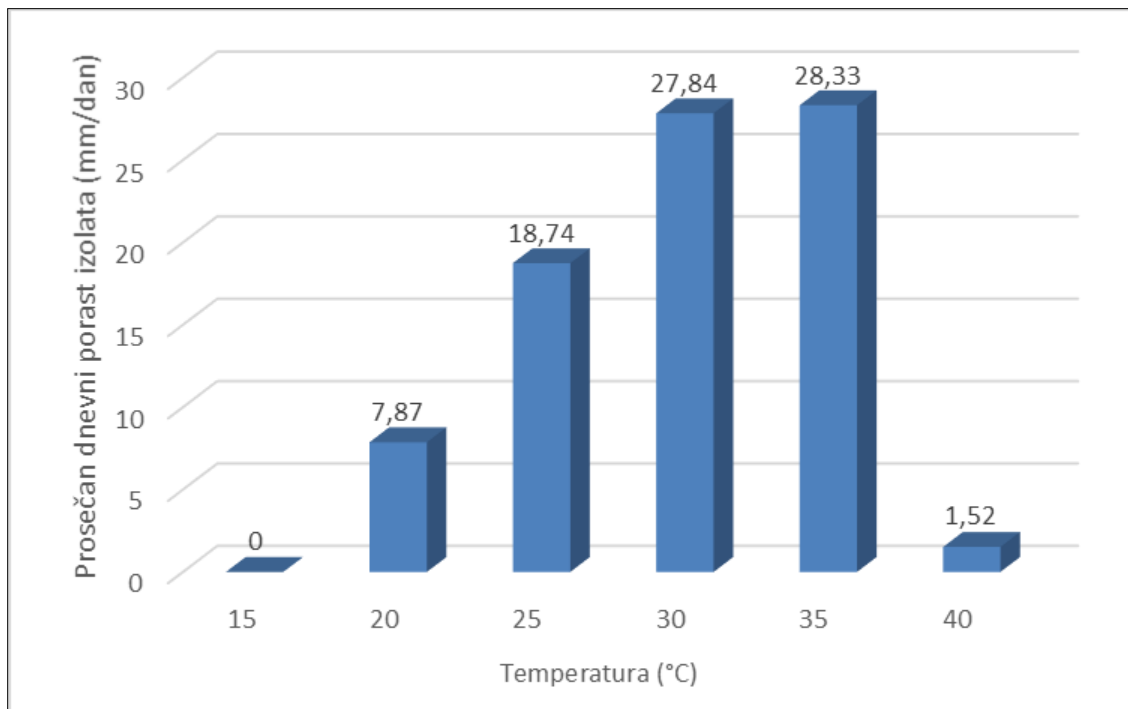
\*Vrednosti obeležene istim slovom su na istom nivou značajnosti u intervalu poverenja 95%; (±) – standardna devijacija



Uticaj različitih temperatura na dnevni porast kolonije 46 izolata praćen je na KDA hranljivoj podlozi tokom 3 dana (Slika 15). Rezultati analize varijanse ukazuju na to da između ispitivanih izolata postoji statistički značajna razlika u brzini porasta micelije patogena na temperaturama 20, 25, 30 i 40 °C ( $p < 0,05$ ). Maksimalni prosečan dnevni porast koji je iznosio od 28,33 do 27,84 mm/dan zabeležen je na temperaturama 30 i 35 °C koje ujedno predstavljaju optimalne temperature za rast i razvoj izolata *M. phaseolina*. Sa druge strane na temperaturi 15 °C nije zabeležen porast micelije patogena, dok je pri temperaturi od 40 °C prosečan dnevni porast kolonije izolata iznosio je svega 1,52 mm/dan (Tabela 26). Shodno tome temperature od 15 i 40 °C predstavljaju granične vrednosti za rast i razvoj izolata ove fitopatogene gljive (Grafik 3).



Slika 15. Porast kolonije izolata ŠR75/13 na KDA hranljivoj podlozi pri različitim temperaturama nakon 3 dana inkubacije (Original)



Grafik 3. Prosečan dnevni porast izolata *M. phaseolina* na različitim temperaturama

Tabela 26. Uticaj različite temperature na dnevni porast kolonije izolata *M. phaseolina* nakon tri dana

T	15 °C		20°		25°		30°		35°		40°	
Izolat	Dnevni porast kolonije (mm/dan)	Rang	Dnevni porast kolonije (mm/dan)	Rang	Dnevni porast kolonije (mm/dan)	Rang	Dnevni porast kolonije (mm/dan)	Rang	Dnevni porast kolonije (mm/dan)	Rang	Dnevni porast kolonije (mm/dan)	Rang
MPHKU	0,00±0,00	a	1,67±0,00	a	3,67±0,38	a	15,00±0,00	a	28,33±0,00	a	0,00±0,00	a
MPHSO	0,00±0,00	a	10,00±0,00	l	21,67±0,00	nj	28,33±0,00	e	28,33±0,00	a	0,00±0,00	a
MPHSU	0,00±0,00	a	9,00±0,00	j	19,67±0,38	llj	28,33±0,00	e	28,33±0,00	a	0,00±0,00	a
ŠR1/11	0,00±0,00	a	6,67±0,00	de	18,33±0,00	i	28,33±0,00	e	28,33±0,00	a	0,00±0,00	a
ŠR10/09	0,00±0,00	a	7,00±0,38	e	20,00±0,00	lljm	28,33±0,00	e	28,33±0,00	a	0,00±0,00	a
ŠR104/13	0,00±0,00	a	6,67±0,00	de	18,33±0,00	i	28,33±0,00	e	28,33±0,00	a	1,67±0,00	c
ŠR110/13	0,00±0,00	a	6,67±0,00	d	18,33±0,00	i	28,33±0,00	e	28,33±0,00	a	1,67±0,00	c
ŠR14/09	0,00±0,00	a	8,33±0,00	hij	21,67±0,00	nj	28,33±0,00	e	28,33±0,00	a	4,00±0,00	i
ŠR15/11	0,00±0,00	a	10,00±0,00	l	20,00±0,00	lljm	28,33±0,00	e	28,33±0,00	a	2,67±0,00	f
ŠR16/13	0,00±0,00	a	8,33±0,00	hj	19,33±0,00	jl	28,33±0,00	e	28,33±0,00	a	0,00±0,00	a
ŠR23/11	0,00±0,00	a	11,67±0,00	m	20,00±0,00	lljm	28,33±0,00	e	28,33±0,00	a	2,00±0,00	d
ŠR24M/10	0,00±0,00	a	8,33±0,00	hij	20,00±0,00	lljm	28,33±0,00	e	28,33±0,00	a	5,00±0,00	j
ŠR3/09	0,00±0,00	a	10,50±0,58	lj	24,17±0,96	p	28,33±0,00	e	28,33±0,00	a	0,00±0,00	a
ŠR30/12	0,00±0,00	a	15,33±0,38	n	25,00±0,00	r	28,33±0,00	e	28,33±0,00	a	3,33±0,00	g
ŠR31(2)/09	0,00±0,00	a	6,67±0,00	de	14,00±0,00	e	28,33±0,00	e	28,33±0,00	a	1,67±0,00	c
ŠR32/12	0,00±0,00	a	4,17±0,96	c	8,33±0,00	b	23,00±0,38	b	28,33±0,00	a	0,00±0,00	a
ŠR32/13	0,00±0,00	a	7,33±0,00	f	20,00±0,00	lljm	28,33±0,00	e	28,33±0,00	a	0,00±0,00	a
ŠR34/12	0,00±0,00	a	8,33±0,00	hij	21,67±0,00	nj	28,33±0,00	e	28,33±0,00	a	2,33±0,00	e
ŠR36/12	0,00±0,00	a	8,33±0,00	hij	20,67±0,00	mn	28,33±0,00	e	28,33±0,00	a	3,67±0,38	h
ŠR38/12	0,00±0,00	a	8,33±0,00	hij	20,00±0,00	lljm	28,33±0,00	e	28,33±0,00	a	4,00±0,00	i
ŠR39(2)/09	0,00±0,00	a	6,67±0,00	de	19,17±0,96	j	28,33±0,00	e	28,33±0,00	a	1,67±0,00	c
ŠR40/12	0,00±0,00	a	6,67±0,00	de	19,17±0,96	jk	28,33±0,00	e	28,33±0,00	a	1,67±0,00	c
ŠR42(1)/09	0,00±0,00	a	8,33±0,00	h	11,67±1,92	d	27,50±0,96	d	28,33±0,00	a	2,17±0,19	de
ŠR45(4)/09	0,00±0,00	a	6,67±0,00	de	18,33±0,00	i	28,33±0,00	e	28,33±0,00	a	1,67±0,00	c
ŠR45/12	0,00±0,00	a	8,67±0,38	i	20,33±0,38	ljm	28,33±0,00	e	28,33±0,00	a	0,00±0,00	a
ŠR45/13	0,00±0,00	a	6,67±0,00	de	16,67±0,00	f	28,33±0,00	e	28,33±0,00	a	0,00±0,00	a
ŠR49(5)/09	0,00±0,00	a	1,67±0,00	a	10,00±0,00	c	28,33±0,00	e	28,33±0,00	a	0,00±0,00	a
ŠR5/09	0,00±0,00	a	8,33±0,00	hij	20,00±0,00	lljm	28,33±0,00	e	28,33±0,00	a	0,00±0,00	a
ŠR5/12	0,00±0,00	a	7,67±0,00	g	20,00±0,00	lljm	28,33±0,00	e	28,33±0,00	a	0,00±0,00	a
ŠR51/12	0,00±0,00	a	7,83±0,58	g	17,5±0,96	h	26,67±0,00	c	28,33±0,00	a	0,00±0,00	a
ŠR52/12	0,00±0,00	a	3,33±0,00	b	20,00±0,00	lljm	28,33±0,00	e	28,33±0,00	a	0,00±0,00	a
ŠR52/13	0,00±0,00	a	8,67±0,38	ij	20,00±0,00	lljm	28,33±0,00	e	28,33±0,00	a	0,00±0,00	a
ŠR55(3)/09	0,00±0,00	a	8,33±0,00	hij	21,17±0,58	nnj	28,33±0,00	e	28,33±0,00	a	0,00±0,00	a
ŠR62(4)/09	0,00±0,00	a	6,67±0,00	de	16,67±0,00	f	28,33±0,00	e	28,33±0,00	a	0,00±0,00	a
ŠR62(5)/09	0,00±0,00	a	6,67±0,00	d	15,00±0,00	f	28,33±0,00	e	28,33±0,00	a	5,50±0,58	k
ŠR65(2)/09	0,00±0,00	a	9,00±0,00	j	20,00±0,00	lljm	28,33±0,00	e	28,33±0,00	a	2,67±0,00	f

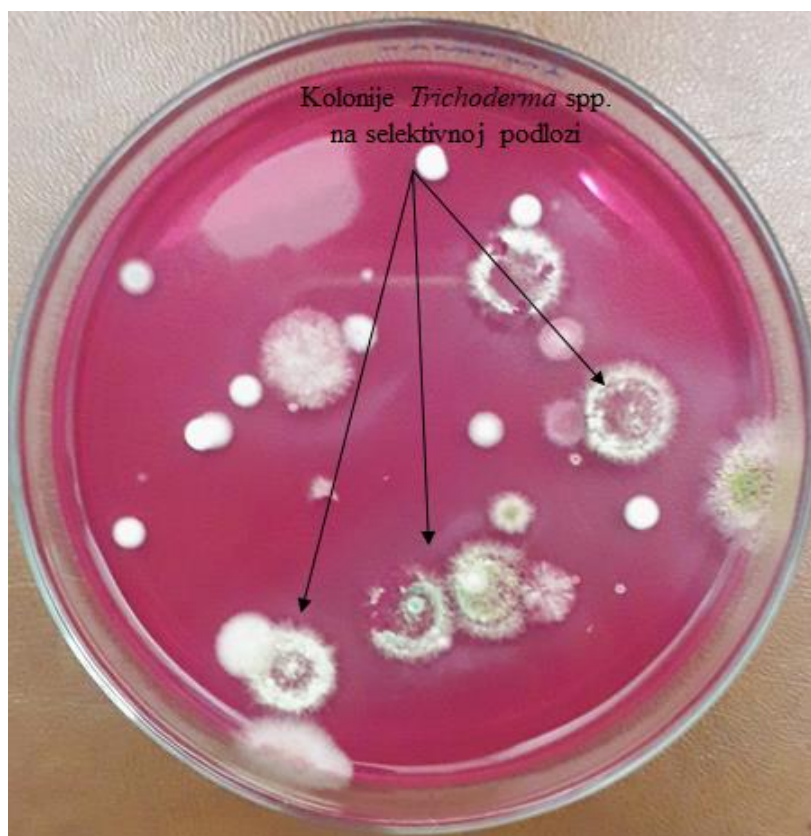
ŠR70/13	0,00±0,00	a	10,00±0,00	l	21,67±0,00	nj	28,33±0,00	e	28,33±0,00	a	2,33±0,00	e
ŠR71/13	0,00±0,00	a	6,67±0,00	d	20,00±0,00	lljm	28,33±0,00	e	28,33±0,00	a	1,67±0,00	c
ŠR75/13	0,00±0,00	a	10,00±0,00	l	21,17±0,58	nnj	28,33±0,00	e	28,33±0,00	a	5,83±0,96	l
ŠR80/13	0,00±0,00	a	8,33±0,00	hij	18,33±0,00	i	28,33±0,00	e	28,33±0,00	a	2,33±0,00	e
ŠR82/13	0,00±0,00	a	8,42±0,17	hij	21,67±0,00	nj	28,33±0,00	e	28,33±0,00	a	0,00±0,00	a
ŠR84/13	0,00±0,00	a	10,00±0,00	l	21,67±0,00	nj	28,33±0,00	e	28,33±0,00	a	3,33±0,00	g
ŠR85/12	0,00±0,00	a	8,33±0,00	hij	16,67±0,00	g	26,67±0,00	c	28,33±0,00	a	1,67±0,00	c
ŠR95/13	0,00±0,00	a	10,00±0,00	l	18,50±0,19	ik	28,33±0,00	e	28,33±0,00	a	1,33±0,00	b
ŠR97/12	0,00±0,00	a	8,33±0,00	hij	22,50±0,96	o	28,33±0,00	e	28,33±0,00	a	1,67±0,00	c
ŠR9M/10	0,00±0,00	a	6,67±0,00	de	19,33±0,77	jl	28,33±0,00	e	28,33±0,00	a	2,33±0,00	e
<b>Prosečan dnevni porast (mm/dan)</b>	<b>0,00</b>		<b>7,87</b>		<b>18,74</b>		<b>27,84</b>		<b>28,33</b>		<b>1,52</b>	

\*Vrednosti obeležene istim slovom su na istom nivou značajnosti u intervalu poverenja 95%; (±) – standardna devijacija

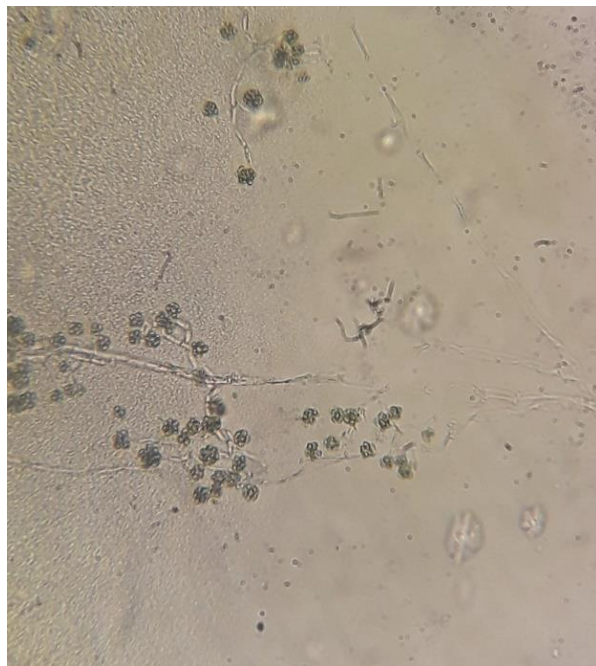
## 6.4. Izolacija biološkog agensa i dobijanje čistih kultura

Prikupljanje uzoraka zemljišta iz rizosfere korena šećerne repe i soje je vršeno 2018. godine na lokalitetu Rimski Šančevi.

Uzorci zemljišta su pripremljeni za izolaciju biološkog agensa. Zasejavanje supernatanta je vršeno na selektivnu podlogu za izolaciju *Trichoderma* spp., nakon čega je svakodnevno praćenja pojava tipičnih kolonija *Trichoderma* spp. (Slika 16). Vizuelnim pregledom kolonija i mikroskopiranjem reproduktivnih organa (Slika 17), izdvojeni su izolati koji po osnovnim karakteristikama odgovaraju rodu *Trichoderma* spp. Izolati su presejani na KDA podlogu u cilju dobijanja čistih kultura. Svi dobijeni izolati su prečišćeni do monosporijalnih izolata. Podaci o lokalitetu i šiframa izolata koji su korišćeni u istraživanju su prikazani u Tabeli 27.



Slika 16. Karakteristične kolonije *Trichoderma* spp. na selektivnoj podlozi za izolaciju *Trichoderma* spp. (Original)



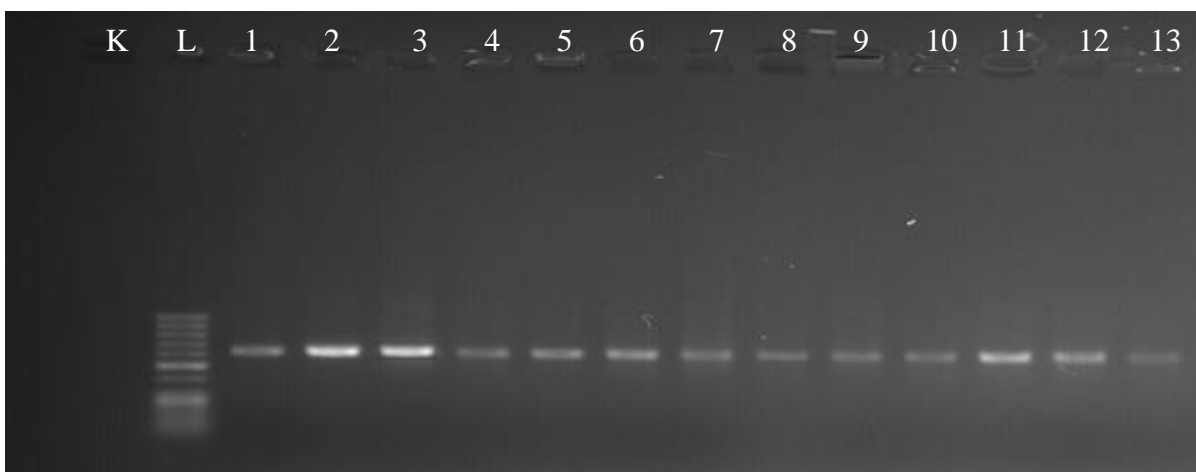
Slika 17. Konidiofore sa konidijama (Original)

Tabela 27. Spisak izolata *T. harzianum*

Redni broj	Šifra izolata	Lokalitet	Mesto uzorkovanja
1.	T1	Rimski Šančevi	Rizosfera šećerne repe
2.	T2	Rimski Šančevi	Rizosfera šećerne repe
3.	T3	Rimski Šančevi	Rizosfera šećerne repe
4.	T4	Rimski Šančevi	Rizosfera šećerne repe
5.	T5	Rimski Šančevi	Rizosfera šećerne repe
6.	T6	Rimski Šančevi	Rizosfera šećerne repe
7.	T7	Rimski Šančevi	Rizosfera šećerne repe
8.	T8	Rimski Šančevi	Rizosfera šećerne repe
9.	T9	Rimski Šančevi	Rizosfera šećerne repe
10.	T10	Rimski Šančevi	Rizosfera šećerne repe
11.	T11	Rimski Šančevi	Rizosfera soje
12.	T12	Rimski Šančevi	Rizosfera soje
13.	T13	Rimski Šančevi	Rizosfera soje

## 6.5. Amplifikacija ITS regiona ispitivanih izolata i identifikacija *M. phaseolina*

U PCR reakciji sa prajmerima ITS1 i ITS4 je došlo do umnožavanja fragmenta ITS regiona kod svih ispitivanih izolata *M. phaseolina*. Dužina produkata amplifikacije, iznosila je 650 bp, dok kod negativne kontrole nije došlo do amplifikacije (Slika 18). PCR produkti su zatim prečišćeni i poslani na sekvenciranje u Macrogen Inc. (<https://dna.macrogen-europe.com/eng/>).



Slika 18. Produkti amplifikacije ITS regiona izolata *M. phaseolina* (K – negativna kontrola, L – 100bp DNK lestvica, 1 – ŠR31(2)/09, 2 – ŠR36/12, 3 – ŠR75/13, 4 – MPHSU, 5 – ŠR52/13, 6 – ŠR95/13, 7 – ŠR95/13, 8 – ŠR84/13, 9 – ŠR45/13, 10 – ŠR51/12, 11 – ŠR40/12, 12 – ŠR52/12, 13 – ŠR16/13)

### 6.5.1. Analiza sekvenci ITS regiona izolata *M. phaseolina*

Nakon procene kvaliteta i čistoće dobijenih sekvenci ITS fragmenata testiranih izolata *M. phaseolina* sekvence su prevedene u FASTA format (primer – izolat ŠR55(3)/09):

```
>ŠR55(3)/09
CCGAGTTGATTCGGGCTCCGTCCCGATCCTCCCACCCTTTGTATACCTACCTCTGTTG
CTTTGGCGGGCCGCGGTCTTCCGCGGCCGCCCGGATTTTGGGGGGTGGCTAGTGC
CCGCCAGAGGACTATCAAACCTCCAGTCAGGAAACGTTGCAGTCTGAAAAAAATAT
```

TAAATAAACTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACG  
 CAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTG  
 AACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCA  
 ACCCTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCACCGTCCTTTGCGGGCGCGCCTCAAAGACC  
 TCGGCGGTGGCGTCTTGCCTCAAGCGTAGTAGAATAACACCTCGCTTCGGAGCGTAAG  
 GCGTCGCCCCGCCGGACGAACCTTCTGAACTTTTCTCAAGGTTGAC

Sekvence su zatim, primenom BLAST algoritma (eng. Basic Local Alignment Search Tool, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), upoređivane sa odgovarajućim sekvencama u međunarodnoj bazi podataka GenBank (NCBI). Na osnovu procenta poklapanja sa sekvencama u bazi ustanovljen je identitet ITS sekvenci što se može videti na datom primeru kod izolata ŠR55(3)/09 (Tabela 28). Kod ovog izolata, utvrđen je maksimalan i ukupan rezultat poravnanja od 926 nukleotida sa sekvencom pod GenBank brojem KU578311.1 (*M. phaseolina*). Takođe, dobijeni rezultati ukazuju da je sekvenca izolata imala pokrivenost kao i identičnost od 100% sa prethodno navedenom sekvencom. Detaljnije statističko poravnanje izolata sa sekvencom KU578313.1 prikazano je na Slici 19. Pored poklapanja sa sekvencom KU578311.1, uočena su i poklapanja sa drugim sekvencama *M. phaseolina*, pri čemu su maksimalni i ukupni rezultat poravnanja nukleotida jednaki u odnosu na poklapanja sa prvom sekvencom. Pokrivenost se kretala do 100%, pri čemu je identičnost bila 100%.

Tabela 28. Rezultati BLAST analize, izolat ŠR55(3)/09

Opis	Maksimalni rezultat poravnanja	Ukupni rezultat poravnanja	Pokrivenost	E vrednost	Procent identičnosti	Pristupni broj
<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP1b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	926	926	100%	0.0	100%	<a href="#">KU578311.1</a>
<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP2b internal transcribed	926	926	100%	0.0	100%	<a href="#">KU578312.1</a>



spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence						
<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP3b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	926	926	100%	0.0	100%	<u>KU578313.1</u>

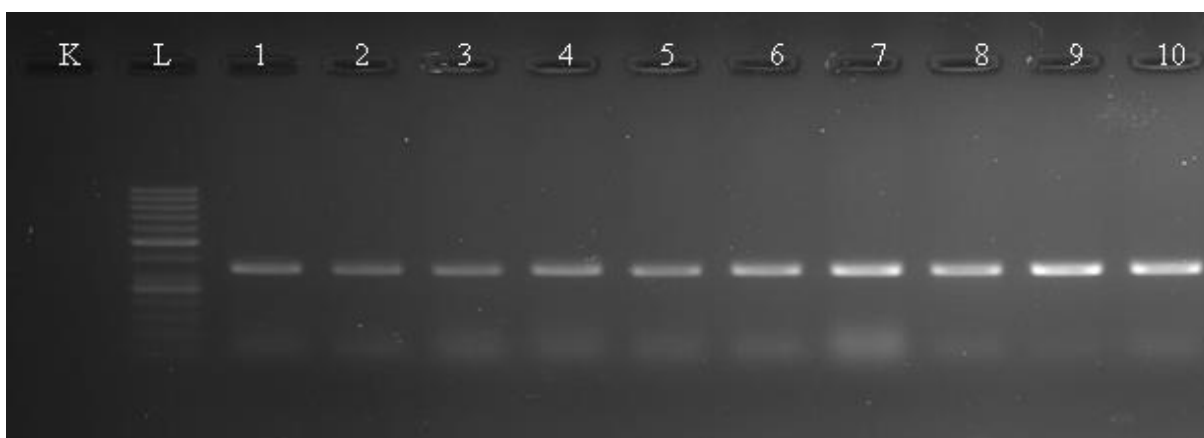
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
926 bits(501)	0.0	501/501(100%)	0/501(0%)	Plus/Plus
Query 1	CCGAGTTGATTCGGGCTCCGTCCCGATCCTCCCACCCTTTGTATACCTACCTCTGTTGCT	60		
Sbjct 26	CCGAGTTGATTCGGGCTCCGTCCCGATCCTCCCACCCTTTGTATACCTACCTCTGTTGCT	85		
Query 61	TTGGCGGGCCGCGGTCTTCCGCGGCGCCCGGATTTGGGGGGTGGCTAGTGCCCGCC	120		
Sbjct 86	TTGGCGGGCCGCGGTCTTCCGCGGCGCCCGGATTTGGGGGGTGGCTAGTGCCCGCC	145		
Query 121	AGAGGACTATCAAACCTCAGTCAGGAAACGTTGCAGTCTGaaaaaaaTATTAATAAAC	180		
Sbjct 146	AGAGGACTATCAAACCTCAGTCAGGAAACGTTGCAGTCTGAAAAAAAAATTAATAAAC	205		
Query 181	TAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG	240		
Sbjct 206	TAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG	265		
Query 241	ATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCC	300		
Sbjct 266	ATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCC	325		
Query 301	CCTTGGTATTCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTG	360		
Sbjct 326	CCTTGGTATTCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTG	385		
Query 361	GTATTGGGCACCGTCCTTTCGCGGCGCGCCTCAAAGACCTCGGCGGTGGCGTCTTGCCCTC	420		
Sbjct 386	GTATTGGGCACCGTCCTTTCGCGGCGCGCCTCAAAGACCTCGGCGGTGGCGTCTTGCCCTC	445		
Query 421	AAGCGTAGTAGAATACACCTCGCTTCGGAGCGTAAGGCGTCGCCCGCCGGACGAACCTTC	480		
Sbjct 446	AAGCGTAGTAGAATACACCTCGCTTCGGAGCGTAAGGCGTCGCCCGCCGGACGAACCTTC	505		
Query 481	TGAACTTTTCTCAAGGTTGAC	501		
Sbjct 506	TGAACTTTTCTCAAGGTTGAC	526		

Slika 19. Statističko poravnanje sekvence izolata ŠR55(3)/09 sa sekvencom KU578311.1

Svih 46 izolata uključenih u ispitivanja su identifikovani kao *M. phaseolina*. Rezultati BLAST analize ispitivanih ITS sekvenci izolata *M. phaseolina* se nalaze u Prilogu 3 doktorata. ITS sekvence izolata *M. phaseolina* su prijavljene u GenBank. Spisak priznatih sekvenci se nalazi u Prilogu 2 doktorata.

## 6.6. Amplifikacija ITS regiona ispitivanih izolata i identifikacija *Trichoderma* spp.

U PCR reakciji sa prajmerima ITS1 i ITS2 je došlo do umnožavanja fragmenta ITS regiona kod svih ispitivanih izolata *Trichoderma* spp. Dužina produkata amplifikacije, iznosila je od 330 bp, dok kod negativne kontrole nije došlo do amplifikacije (Slika 20). PCR produkti su zatim prečišćeni i poslani na sekvenciranje u Macrogen Inc. (<https://dna.macrogen-europe.com/eng/>).



Slika 20. Produkti amplifikacije ITS regiona izolata *Trichoderma* spp. (K – negativna kontrola, L – 50bp DNK lestvica, 1 – T2, 2 – T5, 3 – T6, 4 – T7, 5 – T8, 6 – T9, 7 – T10, 8 – T11, 9 – T12, 10 – T13)

### 6.6.1. Analiza sekvenci ITS regiona izolata *Trichoderma* spp.

Nakon procene kvaliteta i čistoće dobijenih sekvenci ITS fragmenata testiranih izolata *Trichoderma* spp. sekvence su prevedene u FASTA format. Zatim su primenom BLAST algoritma upoređivane sa odgovarajućim sekvencama u međunarodnoj bazi podataka GenBank (NCBI). Na osnovu procenta poklapanja sa sekvencama u bazi ustanovljen je identitet ITS sekvenci, gde je utvrđeno da izolati T2, T7, T8, T9, T10, T11, T12 i T13 pripadaju vrsti *Trichoderma harzianum*. Detaljnije je prikazano na primeru izolata T11 (Tabela 29):

&gt;ITSAT11

TCACTCCCAACCCAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCC  
 CGGGTGCGTTCGACCCCCGGACCAAGGCGCCCGCCGGAGGACCAACCAAACTCTT  
 ATTGTATACCCCTCGCGGGTTTTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTA  
 GGCGTTTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGA  
 TGAAGAACACAAATTGGTCGGACAATTTTTTCTTAAATAAACTCCGACTCAACTGT  
 GCGGGGGGGGGGGGGGGGGAAAGATAAATTGCATTATTTCTGAACCTTCCAGTCT  
 TCCA

Kod ovog izolata, utvrđen je maksimalan i ukupan rezultat poravnanja od 436 nukleotida sa sekvencom pod GenBank brojem KC551814.1 (*T. harzianum*). Takođe, dobijeni rezultati ukazuju da je sekvenca izolata imala pokrivenost 68% kao i identičnost od 100% sa napred navedenom sekvencom. Detaljnije statističko poravnanje izolata sa sekvencom KC551814.1 prikazano je na Slici 21. Pored poklapanja sa sekvencom KC551814.1, uočena su i poklapanja sa drugim sekvencama *T. harzianum*, pri čemu su maksimalni i ukupani rezultat poravnanja nukleotida jednak u odnosu na poklapanja sa prvom sekvencom. Pokrivenost je bila 68%, dok je identičnost bila 100%.

Tabela 29. Rezultati BLAST analize, izolat T11

Opis	Maksimalni rezultat poravnanja	Ukupni rezultat poravnanja	Pokrivenost	E vrednost	Procenat identičnosti	Pristupni broj
<i>Trichoderma harzianum</i> isolate OTPS3 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	436	436	68%	4e-118	100%	<u>KC551814.1</u>
<i>Trichoderma</i> sp. isolate SDAS203523 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large	436	436	68%	4e-118	100%	<u>MK870190.</u> <u>1</u>

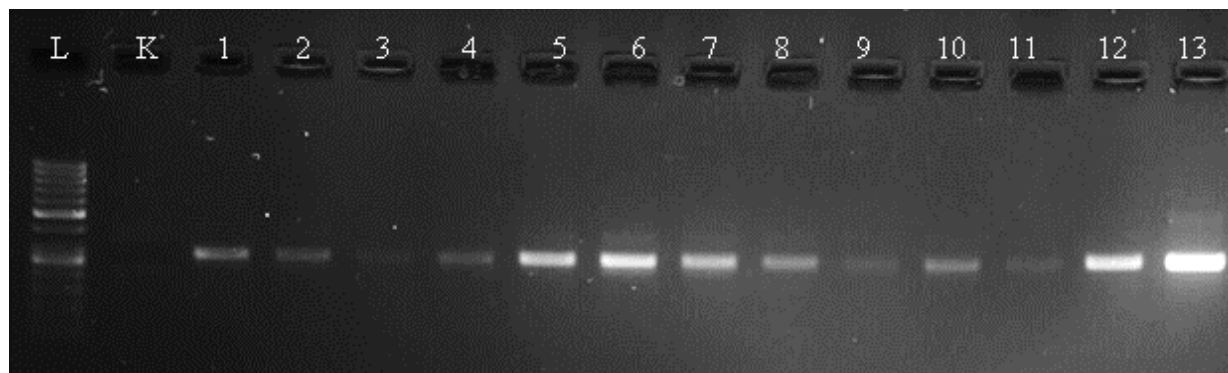
subunit ribosomal RNA gene, partial sequence						
<i>Trichoderma</i> sp. isolate SDAS203114 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	436	436	68%	4e-118	100%	<u>MK870141.1</u>

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
436 bits(236)	4e-118	236/236(100%)	0/236(0%)	Plus/Plus
Query 1	TCACTCCCAACCCAATGTGAACGTTACCAAACGTTGCCTCGGC	GGGATCTCTGCCCCGG	60	
Sbjct 14	TCACTCCCAACCCAATGTGAACGTTACCAAACGTTGCCTCGGC	GGGATCTCTGCCCCGG	73	
Query 61	GTGCGTCGCAGCCCCGGACCAAGGCGCCCGCGGAGGACCAAC	CAAAACTCTTATTGTAT	120	
Sbjct 74	GTGCGTCGCAGCCCCGGACCAAGGCGCCCGCGGAGGACCAAC	CAAAACTCTTATTGTAT	133	
Query 121	ACCCCTCGCGGGtttttttATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCT	TCTCGTAGGCGTTTCG	180	
Sbjct 134	ACCCCTCGCGGGTTTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCT	TCTCGTAGGCGTTTCG	193	
Query 181	AAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGC	ATCGATGAAGAAC	236	
Sbjct 194	AAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGC	ATCGATGAAGAAC	249	

Slika 21. Statističko poravnanje sekvence izolata T11 sa sekvencom KC551814.1

## 6.7. Amplifikacija TEF-1 $\alpha$ gena ispitivanih izolata i identifikacija *Trichoderma* spp.

U PCR reakciji sa prajmerima EF1-728 i EF1-986 je dovela do umnožavanja fragmenata TEF-1 $\alpha$  gena kod svih ispitivanih izolata *Trichoderma* spp. Dužina produkata amplifikacije, iznosila je oko 300 bp, dok kod negativne kontrole nije došlo do amplifikacije (Slika 22). PCR produkti su zatim prečišćeni i poslani na sekvenciranje u MacroGen Inc. (<https://dna.macrogen-europe.com/eng/>).



Slika 22. Produkti amplifikacije TEF-1 $\alpha$  gena izolata *Trichoderma* spp. (L – 50bp DNK lestvica, K – negativna kontrola, 1 – T1, 2 – T2, 3 – T3, 4 – T4, 5 – T5, 6 – T6, 7 – T7, 8 – T8, 9 – T9, 10 – T10, 11 – T11, 12 – T12, 13 – T13)

### 6.7.1. Analiza sekvenci TEF-1 $\alpha$ gena izolata *Trichoderma* spp.

Kvalitet i čistoća dobijenih TEF sekvenci testiranih izolata *Trichoderma* spp. su provereni, a nakon toga sekvence su prevedene u FASTA format. Zatim su primenom BLAST algoritma upoređivane sa odgovarajućim sekvencama u međunarodnoj bazi podataka GenBank (NCBI). Na osnovu procenta poklapanja sa sekvencama u bazi ustanovljen je identitet TEF sekvenci, gde je utvrđeno je da izolati T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, i T11 pripadaju vrsti *T. harzianum*. Detaljnije je prikazano na primeru izolata T1 (Tabela 30):

> EFAT1

```
CTCGCGCGGGTTCCTTACCCCTGTGGAGTCCCAACACGGGGTAGAGCGACCGCCAG
GAAGGTGGGCGGCGGGTTCCTTGGTCCCAGGGGTGGGACGTTTTGGATCTGAGA
TTTCTCGAGGCTCTCGTTGGTGTCTGTTAAAATGGGGTTTGGTAGTTGTAAGTCGGTCT
GATTTCTGCGTCGTTGACCTACGGAAGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCAAACCC
AATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGTGCGTCGCA
GCCCCGGACCAAGGCGCCCGGGAGGAGCACTAAAACCTTATTGTAAACCCCCCGC
GGG
```

Kod ovog izolata, utvrđen je maksimalan i ukupan rezultat poravnanja od 244 nukleotida sa sekvencom KC576681.1 (*T. harzianum*). Takođe, dobijeni rezultati ukazuju da je sekvenca

izolata T1 imala pokrivenost od 45% kao i identičnost od 94,44% sa napred navedenom sekvencom. Detaljnije statističko poravnanje izolata T1 sa sekvencom KC576681.1 dato je na Slici 23. Pored poklapanja sa pomenutom sekvencom, uočena su i poklapanja sa drugim sekvencama *T. harzianum*, pri čemu su maksimalni rezultat poravnanja nukleotida jednak u odnosu na poklopanja sa prvom sekvencom. Pokrivenost je bila od 45 do 62%, dok je identičnost bila 94,44%.

Tabela 30. Rezultati BLAST analize, izolat T1

Opis	Maksimalni rezultat poravnanja	Ukupni rezultat poravnanja	Pokrivenost	E vrednost	Procenat identičnosti	Pristupni broj
<i>Trichoderma harzianum</i> strain CEN258 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	244	509	45%	2e-64	94,44%	<a href="#">KC576681.1</a>
<i>Trichoderma harzianum</i> strain CEN248 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	244	514	62%	2e-64	94,44%	<a href="#">KC576673.1</a>
<i>Trichoderma harzianum</i> strain CEN247 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	244	244	45%	2e-64	94,44%	<a href="#">KC576672.1</a>

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
244 bits(132)	2e-64	153/162(94%)	5/162(3%)	Plus/Plus
Query 187	ACCTACGGAAGGATCATTACCGAGTTTACAACCT-CCAAACCCAATGTGAACGTTACCAAAA			245
Sbjct 95	ACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCAAACCCAATGTGAACGTTACCAAAA			154
Query 246	CTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCGGGTGCCTCGCAGCCCCGGACCAAGGCGCCCG-			304
Sbjct 155	CTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCGGGTGCCTCGCAGCCCCGGACCAAGGCGCCCGC			214
Query 305	-GGAGGAGC-ACTAAAACCTTTATTGTAAACCCCC-CGCGGG		343	
Sbjct 215	CGGAGGACCAACCAAAACCTTTATTGTATACCCCTCGCGGG		256	

Slika 23. Statističko poravnanje sekvence izolata T1 sa sekvencom KC576681.1

Svih 13 izolata uključenih u ispitivanja su identifikovani kao *T. harzianum* (Tabela 31). ITS i TEF sekvence izolata *T. harzianum* su prijavljene u GenBank. Spisak priznatih sekvenci se nalazi u Prilogu 2 doktorata.

Tabela 31. Rezultati BLAST i TrichOkey analize ispitivanih ITS i TEF sekvenci izolata *Trichoderma* spp.

Izolot	BLAST-NCBI identifikovana vrsta			TrichOkey identifikovana vrsta
	ITS region	TEF region	GenBank pristupni broj	
<b>T1</b>	-	<i>Trichoderma harzianum</i> 94,44%	KC576673.1	-
<b>T2</b>	<i>Trichoderma harzianum</i> 88,73%	<i>Trichoderma harzianum</i> 91,55%	KX595135.1	-
<b>T3</b>	-	<i>Trichoderma harzianum</i> 97,35%	MN518401.1	-
<b>T4</b>	-	<i>Trichoderma harzianum</i> 98,44%	MT090760.1	-

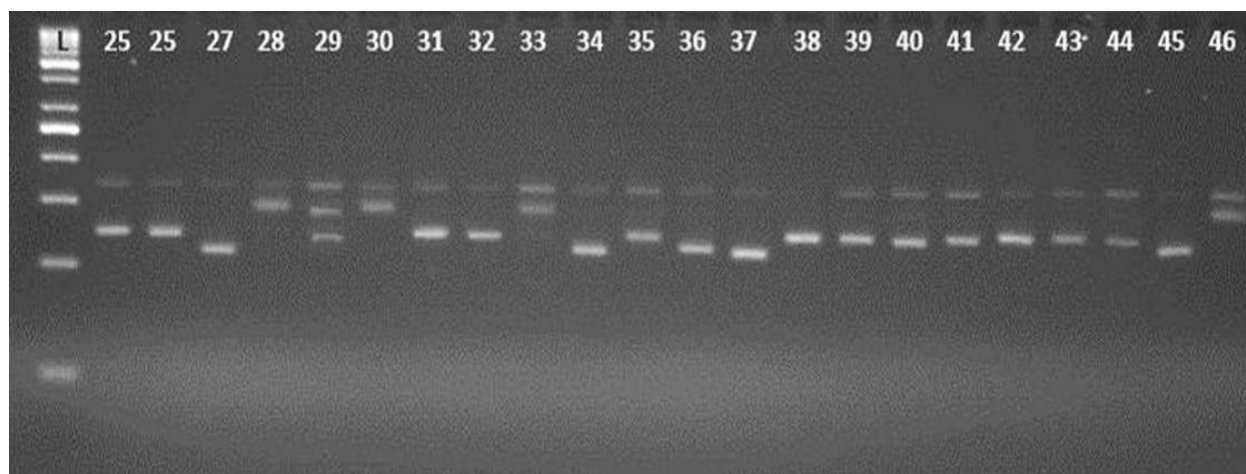


<b>T5</b>	-	<i>Trichoderma harzianum</i> 99,3%	AY605832.1	-
<b>T6</b>	-	<i>Trichoderma harzianum</i> 97,99%	LN846715.1	-
<b>T7</b>	<i>Trichoderma harzianum</i> 99,56%	<i>Trichoderma harzianum</i> 85,32%	MN046978.1	-
<b>T8</b>	<i>Trichoderma harzianum</i> 99,56%	<i>Trichoderma harzianum</i> 94,95%	MN046978.1	<i>Trichoderma harzianum</i>
<b>T9</b>	<i>Trichoderma harzianum</i> 100%	<i>Trichoderma harzianum</i> 97,71%	MN046978.1	<i>Trichoderma harzianum</i>
<b>T10</b>	<i>Trichoderma harzianum</i> 100%	-	MK870791.1	<i>Trichoderma harzianum</i>
<b>T11</b>	<i>Trichoderma harzianum</i> 100%	<i>Trichoderma aff. harzianum</i> 87,93%	MK870763.1	<i>Trichoderma harzianum</i>
<b>T12</b>	<i>Trichoderma harzianum</i> 99,57%	-	MK870767.1	-
<b>T13</b>	<i>Trichoderma harzianum</i> 99,56%	-	MK613207.1	-

## 6.8. Utvrđivanje genetičke varijabilnosti izolata *M. phaseolina* pomoću SSR markera

U svim uzorcima umnožavanje sekvenci sa testiranim SSR prajmerima je rezultiralo PCR produktima različitih veličina (Slika 24). Da bi se utvrdilo koji je procenat varijabilnosti prisutan između populacija, između ispitivanih individua u populaciji, ali i unutar individua, urađena je analiza molekularne varijanse (AMOVA) (Tabela 32). Prilikom primene ove analize izvršena je podela izolata u tri grupe prema lokalitetu: Srem, Banat, Bačka. Rezultati su pokazali da je 26% od ukupne varijacije bilo zbog razlike među izolatima unutar grupa, dok je 74% bilo zbog heterozigotnosti unutar izolata. Varijacija među grupama je iznosila 0% od ukupne varijabilnosti

(Tabela 33). Broj alela za SSR markere varirao je od dva do šest, sa prosečno 4 po lokusu. Najraznovrsniji, sa najvećim brojem različitih alela, brojem efektivnih alela i Shaenon's indeksom bio je SSR marker MP474. Isti marker je imao najveću očekivanu heterozigotnost, dok je posmatrana heterozigotnost zabeležena u slučaju markera MP11. Indeks fiksacije je varirao od -1,00 za marker MP11 do 0,855 za MP431 (Tabela 33).



Slika 24. SSR profil 21 izolata *M. phaseolina* generisanih MP27 prajmerima (25-ŠR36/12; 27-ŠR97/12; 28-ŠR5/12; 29-ŠR28/12; 30-ŠR51/12; 31-ŠR40/12; 32-ŠR54/12; 33-ŠR32/12; 34-ŠR21/11; 35-ŠR52/12; 36-ŠR75/13; 37-ŠR49/13; 38-MPHSU; 39-ŠR52/13; 40-MPHSO; 41-ŠR32/13; 42-ŠR104/13; 43-ŠR97/13; 44-ŠR78/13; 45-ŠR95/13; 46-ŠR90/13)

Tabela 32. Analiza molekularne varijanse (AMOVA) među i unutar populacija

Izvor varijacije	Stepeni slobode (df)	Suma kvadrata (SS)	Sredina kvadrata (MS)	Est. Var.	Procenat (%)
Između grupa	2,00	9,49	4,74	0,01	0,00
Između izolata	43,00	189,49	4,41	0,90	26,00
Unutar izolata	46,00	120,00	2,61	2,61	74,00
<b>Total</b>	<b>91,00</b>	<b>318,98</b>		<b>3,52</b>	<b>100,00</b>

Tabela 33. Parametri genetičke varijabilnosti populacije izolata *M. phaseolina* SSR markerima

<b>Locus</b>	<b>Na</b>	<b>Ne</b>	<b>I</b>	<b>Ho</b>	<b>He</b>	<b>F</b>
<b>MP04</b>	5,00	1,76	0,83	0,16	0,43	<b>0,64</b>
<b>MP11</b>	3,00	2,89	1,08	0,74	0,65	<b>-0,13</b>
<b>MP32</b>	4,00	1,14	0,29	0,02	0,12	<b>0,85</b>
<b>MP27</b>	4,00	2,52	1,11	0,14	0,60	<b>0,77</b>
<b>MP05</b>	3,00	2,01	0,77	0,59	0,50	<b>-0,17</b>
<b>StvMph532a</b>	6,00	2,31	1,18	0,45	0,57	<b>0,21</b>
<b>MP474</b>	5,00	2,96	1,25	0,50	0,66	<b>0,24</b>
<b>MP31</b>	3,00	2,17	0,84	0,55	0,54	<b>-0,02</b>
<b>MP475</b>	5,00	2,38	0,99	0,71	0,58	<b>-0,22</b>
<b>MP431</b>	5,00	2,55	1,07	0,10	0,61	<b>0,83</b>
<b>MP468</b>	3,00	1,95	0,82	0,55	0,49	<b>-0,13</b>
<b>MP449</b>	2,00	1,93	0,68	0,71	0,48	<b>-0,47</b>
<b>MP445</b>	4,00	2,58	1,04	0,36	0,61	<b>0,41</b>
<b>Mean</b>	4,00	2,24	0,92	0,43	0,53	<b>0,22</b>
<b>SE</b>	0,32	0,14	0,07	0,07	0,04	<b>0,12</b>

\*Na – broj alela po lokusu, Ne – Efektivni broj alela, I – Shannon's informacijski indeks, Ho – uočena heterozigotnost, He – očekivana heterozigotnost, F – indeks fiksacije

## 6.9. Osetljivost izolata *M. phaseolina* *in vitro*

### 6.9.1. Osetljivost *M. phaseolina* prema tiofanat-metilu

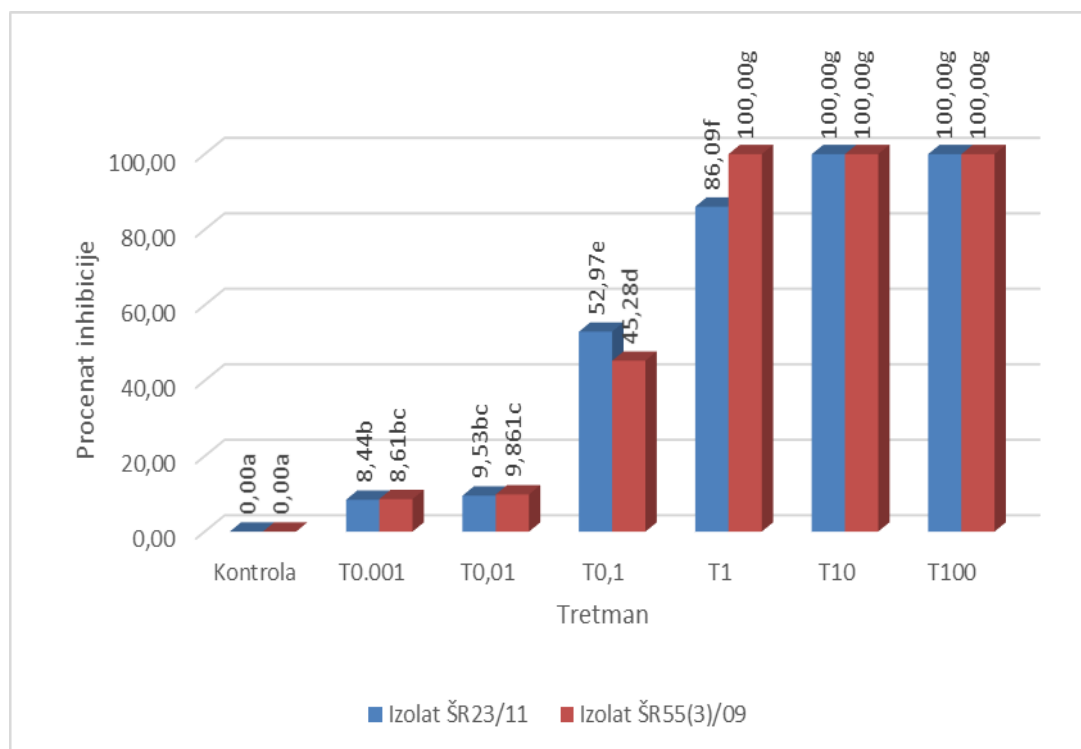
Na osnovu dobijenih rezultata analize varijanse, tiofanat-metil je ispoljio značajno inhibitorno dejstvo na porast kolonije izolata ŠR55(3)/09 i ŠR23/11 (Tabela 34). Inhibitorski efekat je značajno varirao u zavisnosti od koncentracije primenjenog preparata, izolata, kao i zajedničkog delovanja ova dva faktora. Pri primenjenim koncentracijama od 1 i 10 mg/l dobijena vrednost procenta inhibicije kod oba izolata je bila na istoj statističkoj značajnosti i iznosila je 100%, u slučaju primene koncentracije 100 mg/l uočeno je postojanje značajne razlike u inhibiciji patogena gde je kod izolata ŠR55(3)/09 procenat inhibicije iznosio 100%, dok je u slučaju izolata ŠR23/11 taj procenat iznosio 86,09%. Kod primene nižih koncentracija preparata od 0,1 mg/l procenat

inhibicije je iznosio 45,28 do 52,97%. Dok je pri koncentracijama 0,001 i 0,01 mg/l procenat inhibicije bio na znatno nižem nivou i kretao se od 8,44 do 9,53% (Grafik 4).

Tabela 34. Dvofaktorijalna analiza varijanse prečnika kolonije izolata *M. phaseolina* ŠR55(3)/09 i ŠR23/11 u testu osetljivosti prema tiofanat-metilu

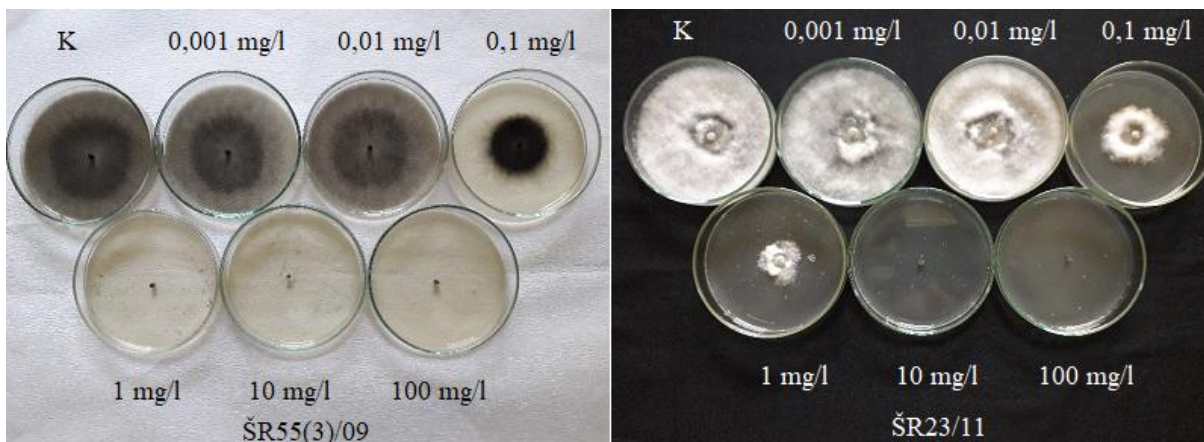
Izvori varijacije	Suma kvadrata (SS)	Stepeni slobode (Df)	Sredina kvadrata (MS)	F - odnos (F)	Nivo značajnosti (p)
<i>M. phaseolina</i>	202928,2	6	33821,4	22256,5	0,00*
Tretman	25,8	1	25,8	17,0	0,00*
<i>M. phaseolina</i> * Tretman	984,9	6	164,1	108,0	0,00*

\*Statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ )



Grafik 4. Uticaj različitih koncentracija tiofanat-metila na porast kolonija izolata *M. phaseolina*

\*Stubovi obeleženi različitim slovima se statistički značajno razlikuju



Slika 25. Uticaj različitih koncentracija tiofanat-metila na porast kolonija izolata *M. phaseolina* (Original)

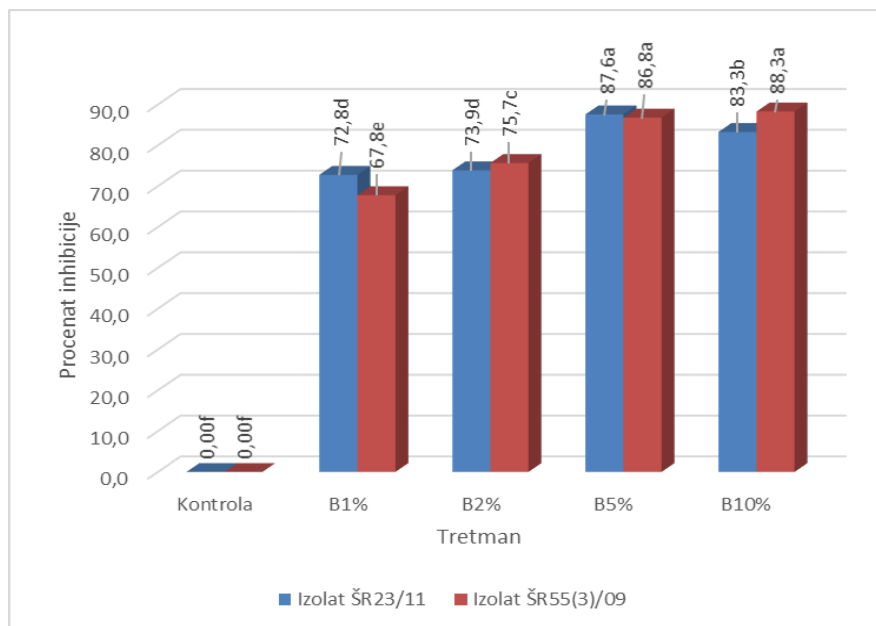
### 6.9.2. Osetljivosti *M. phaseolina* prema *Bacillus* sp.

Analizom rezultata utvrđeno je da je primenom preparata na bazi *Bacillus* sp. značajno inhibiran porast kolonije oba ispitivana izolata ŠR55(3)/09 i ŠR23/11 u odnosu na kontrolu, nezavisno od koncentracije preparata koja je primenjena (Tabela 35). Procenat inhibicije se kretao od 67,8 do 88,3 kod izolata ŠR55(3)/09 i od 72,8 do 87,6 kod izolata ŠR23/11 (Grafik 5).

Tabela 35. Dvofaktorijalna analiza varijanse prečnika kolonije izolata *M. phaseolina* ŠR55(3)/09 i ŠR23/11 u testu osetljivosti prema *Bacillus* sp.

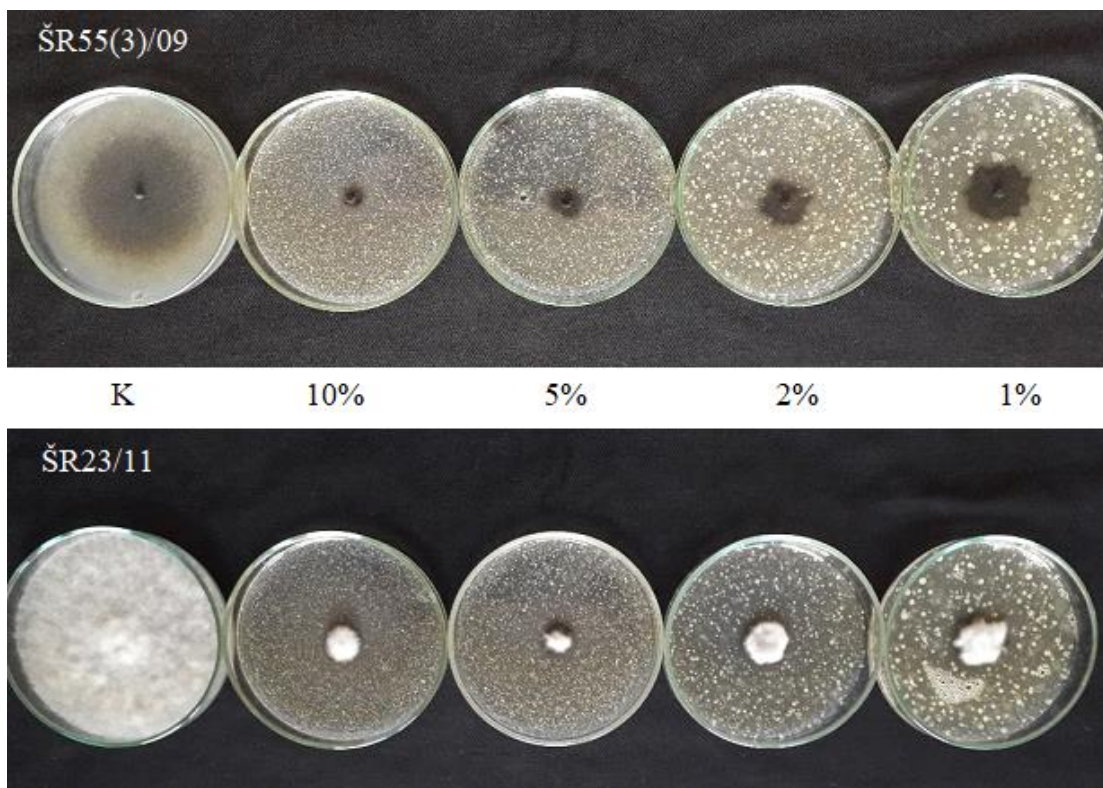
Izvori varijacije	Suma kvadrata (SS)	Stepeni slobode (Df)	Sredina kvadrata (MS)	F - odnos (F)	Nivo značajnosti (p)
<i>M. phaseolina</i>	0,8	1	0,8	0,3	0,58
<b>Tretman</b>	84274,1	4	21068,5	8259,9	0,00*
<b><i>M. phaseolina</i> * Tretman</b>	215,1	4	53,8	21,1	0,00*

\*Statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ )



Grafik 5. Uticaj *Bacillus* sp. na razvoj kolonija izolata *M. phaseolina*

\*Stubovi obeleženi različitim slovima se statistički značajno razlikuju



Slika 26. Uticaj različitih koncentracija *Bacillus* sp. na razvoj kolonija izolata *M. phaseolina*  
(Original)

### 6.9.3. Osetljivost *M. phaseolina* prema *Trichoderma harzianum*

Dvofaktorijalnom analizom varijanse (ANOVA), testa dvojne kulture (TDK) i testa isparljivih jedinjenja (TIJ), utvrđene su statistički značajne razlike gde su obe nezavisne promenljive, različiti izolati *M. phaseolina* ŠR55(3)/09 i ŠR23/11, kao i izolati *T. harzianum* (T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11, T12, T13) bili značajan izvor variranja zavisne promenljive tj. prečnika kolonije patogena ( $p < 0,05$ ) (Tabela 36 i Tabela 37).

Tabela 36. Dvofaktorijalna analiza varijanse prečnika kolonije izolata *M. phaseolina* ŠR55(3)/09 i ŠR23/11 u testu dvojne kulture

Izvori varijacije	Suma kvadrata (SS)	Stepeni slobode (Df)	Sredina kvadrata (MS)	F - odnos (F)	Nivo značajnosti (p)
<i>M. phaseolina</i>	63,40	1	63,40	13,77	0,00*
<i>T. harzianum</i>	16233,40	13	1248,70	271,04	0,00*
<i>M. phaseolina</i> * <i>T. harzianum</i>	172,10	13	13,20	2,87	0,00*

\*Statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ )

Tabela 37. Dvofaktorijalna analiza varijanse prečnika kolonije izolata *M. phaseolina* ŠR55(3)/09 i ŠR23/11 u testu isparljivih jedinjenja

Izvori varijacije	Suma kvadrata (SS)	Stepeni slobode (Df)	Sredina kvadrata (MS)	F - odnos (F)	Nivo značajnosti (p)
<i>M. phaseolina</i>	864,10	1	864,10	88,87	0,00*
<i>T. harzianum</i>	16049,40	13	1234,60	126,98	0,00*
<i>M. phaseolina</i> * <i>T. harzianum</i>	2401,90	13	184,80	19,00	0,00*

\*Statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ )

#### 6.9.3.1. Test dvojne kulture

Svi testirani izolati *T. harzianum* su ispoljili antagonistički potencijal i inhibirali porast micelije izolata *M. phaseolina* u TDK. Potvrđene su značajne statističke razlike kod svih tretmana u odnosu na kontrolu, a procenat inhibicije se kretao od 54,07 do 64,44%. Najjača inhibicija je

zabeležena u tretmanu sa izolatom *T. harzianum* T2 u kombinaciji sa oba testirana izolata *M. phaseolina*. Slični rezultati su dobijeni i u slučaju ostalih izolata *Trichoderma* osim T11 i T13, koji su ispoljili značajno manju inhibiciju na ŠR55(3)/09. Izolat *T. harzianum* T2 je bio najefikasniji u inhibiciji rasta *M. phaseolina* ŠR23/11 zajedno sa T3, T9 i T13, koji su bili na istom nivou značajnosti. Detaljnijim pregledom samog kontakta micelije antagonista i patogeni izolati su podeljeni prema klasama, gde su utvrđene razlike u antagonističkom delovanju izolata *T. harzianum* na *M. phaseolina* (Tabela 38). Izolati T1 do T10 pripadaju II klasi, gde je zabeleženo prerastanje dve trećine površine hranljive podloge od strane *T. harzianum*, a takođe je došlo do formiranja prazne zone na podlozi između antagonista i patogeni., kao i potpunog zaustavljanja rasta micelije kod oba. Kod izolata T11 i T12 je uočena obilna sporulacija praćena prerastanjem micelije patogeni gde je *T. harzianum* prekrila čitavu površinu Petri kutije te su ovi izolati svrstani u I grupu. U III klasu je svrstan izolata T13, gde bioagens i patogen kolonizuju približno istu površinu hranljive podloge i ni jedna vrsta ne dominira nad drugom (Slika 27).



Tabela 38. Antagonistički efekat izolata *T. harzianum* na porast micelije izolata patogena, procenat inhibicije i način antagonističkog delovanja u testu dvojne kulture

Tretman	Prečnik micelije <i>M.</i> <i>phaseolina</i> (mm)		Inhibicija (%)		Klasa antagonističkog delovanja
	<i>M.</i> <i>phaseolina</i> ŠR23/11	<i>M.</i> <i>phaseolina</i> ŠR55(3)/09	<i>M.</i> <i>phaseolina</i> ŠR23/11	<i>M.</i> <i>phaseolina</i> ŠR55(3)/09	
	<b>Kontrola</b>	90,00±0,00 <sup>a</sup>	90,00±0,00 <sup>a</sup>		
<b>T1</b>	36,67±4,71 <sup>cd</sup>	34,33±1,24 <sup>cde</sup>	59,26	61,85	II
<b>T2</b>	35,00±2,49 <sup>cde</sup>	32,00±0,81 <sup>d</sup>	61,11	64,44	II
<b>T3</b>	35,67±0,94 <sup>cde</sup>	34,33±0,94 <sup>cde</sup>	60,37	61,85	II
<b>T4</b>	38,33±3,39 <sup>bc</sup>	36,00±0,81 <sup>cde</sup>	57,41	60,00	II
<b>T5</b>	38,33±2,35 <sup>bc</sup>	34,33±0,47 <sup>cde</sup>	57,41	61,85	II
<b>T6</b>	41,00±2,28 <sup>b</sup>	33,67±0,47 <sup>de</sup>	54,44	62,59	II
<b>T7</b>	37,00±1,41 <sup>cd</sup>	34,33±0,47 <sup>cde</sup>	58,89	61,85	II
<b>T8</b>	38,33±1,69 <sup>bc</sup>	35,00±0,00 <sup>cde</sup>	57,41	61,11	II
<b>T9</b>	35,67±2,35 <sup>cde</sup>	35,67±0,47 <sup>cde</sup>	60,37	60,37	II
<b>T10</b>	36,33±0,47 <sup>cd</sup>	36,00±0,00 <sup>cde</sup>	59,63	60,00	II
<b>T11</b>	36,67±2,35 <sup>cd</sup>	36,33±0,94 <sup>cd</sup>	59,26	59,63	I
<b>T12</b>	38,33±2,35 <sup>bc</sup>	35,00±0,00 <sup>cde</sup>	57,41	61,11	I
<b>T13</b>	35,33±2,05 <sup>cde</sup>	41,33±0,47 <sup>b</sup>	60,74	54,07	III

\*Vrednosti obeležene istim slovom su na istom nivou značajnosti u intervalu poverenja 95%; (±) – standardna devijacija

\*T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11, T12 and T13 = *T. harzianum*



Slika 27. Različite klase antagonističkog delovanja izolata *T. harzianum* (T2, T12 i T13) na *M. phaseolina* u testu dvojne kulture (Original) (Klasa I: *Trichoderma* spp. potpuno prerasta patogena i prekriva čitavu površinu hranljive podloge; Klasa II: *Trihoderma* spp. prerasta dve

trećine površine hranljive podloge; Klasa III: *Trichoderma* spp. i patogen kolonizuju približno istu površinu hranljive podloge, i ni jedna vrsta ne dominira nad drugom)

### 6.9.3.2. Test isparljivih jedinjenja

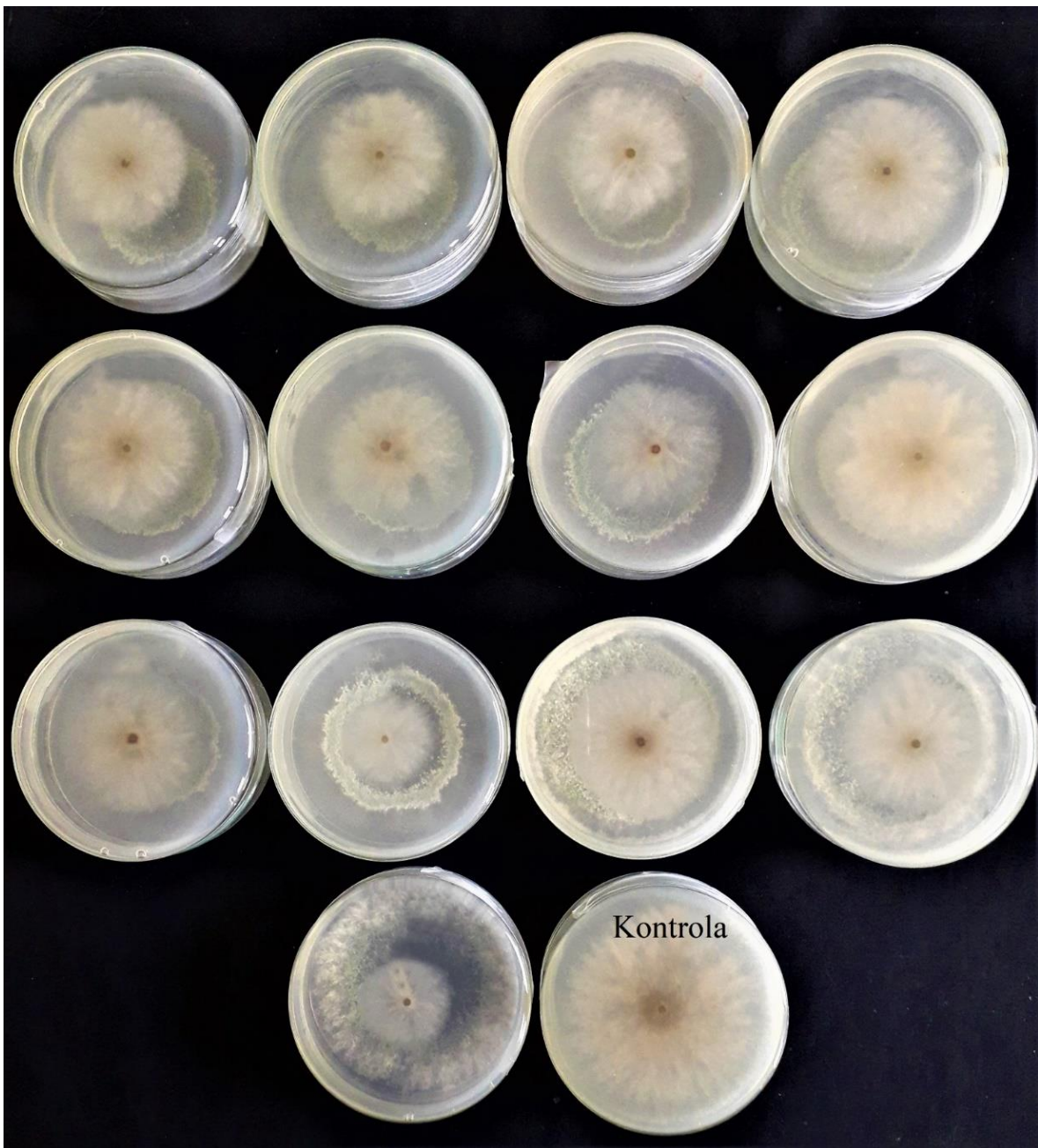
Dobijeni rezultati u TIJ ukazuju na to da isparljiva jedinjenja koja produkuju izolati *T. harzianum* inhibiraju porast kolonije *M. phaseolina* (Slika 28). Isparljiva jedinjenja produkovana od strane izolata T2 i T12 ispoljila su najjači inhibitorski efekat u slučaju oba izolata *M. phaseolina*, i to 62,75% i 55,49% u slučaju izolata ŠR23/11 i 48,44 i 48,22% kod izolata ŠR55(3)/09. Najniži procenat inhibicije koji je iznosio 22,22% zabeležen je kod izolata T6 u varijanti sa izolatom ŠR55(3)/09 i 28,82% u kombinaciji T8 izolata sa ŠR23/11 (Tabela 39).

Tabela. 39. Antagonistički efekat isparljivih jedinjenja izolata *T. harzianum* na porast micelije izolata *M. phaseolina* *in vitro*

Tretman	Prečnik micelije <i>M. phaseolina</i> (mm)		Inhibicija (%)	
	<i>M. phaseolina</i> ŠR23/11	<i>M. phaseolina</i> ŠR55(3)/09	<i>M. phaseolina</i> ŠR23/11	<i>M. phaseolina</i> ŠR55(3)/09
<b>Kontrola</b>	85,00±0,00 <sup>a</sup>	75,00±0,00 <sup>b</sup>		
<b>T1</b>	47,33±3,03 <sup>hij</sup>	42,17±2,26 <sup>kl</sup>	44,31	43,78
<b>T2</b>	31,67±2,35 <sup>m</sup>	38,67±1,49 <sup>lj</sup>	62,75	48,44
<b>T3</b>	52,5±9,46 <sup>fg</sup>	48,00±2,16 <sup>hij</sup>	38,24	36,00
<b>T4</b>	59,00±1,52 <sup>cd</sup>	48,83±2,03 <sup>ghij</sup>	30,59	34,89
<b>T5</b>	57,33±1,88 <sup>cd</sup>	52,17±1,46 <sup>fg</sup>	32,55	30,44
<b>T6</b>	53,33±3,34 <sup>ef</sup>	58,33±2,35 <sup>cd</sup>	37,25	22,22
<b>T7</b>	46,50±1,50 <sup>j</sup>	50,67±0,74 <sup>fghi</sup>	45,29	32,44
<b>T8</b>	60,50±4,34 <sup>c</sup>	47,50±2,5 <sup>hij</sup>	28,82	36,67
<b>T9</b>	56,33±2,86 <sup>d</sup>	51,33±1,97 <sup>fgh</sup>	33,73	31,56
<b>T10</b>	50,83±0,89 <sup>fghi</sup>	41,50±1,60 <sup>klj</sup>	40,20	44,67
<b>T11</b>	59,67±2,86 <sup>cd</sup>	45,00±0,00 <sup>jk</sup>	29,80	40,00
<b>T12</b>	37,83±4,05 <sup>lj</sup>	38,83±2,03 <sup>lj</sup>	55,49	48,22
<b>T13</b>	50,67±2,6 <sup>8</sup>	47,00±1,41 <sup>ij</sup>	40,39	37,33

\*Vrednosti obeležene istim slovom su na istom nivou značajnosti u intervalu poverenja 95%; (±) – standardna devijacija

\*T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11, T12 and T13 = *T. harzianum*



Slika 28. Antagonističko delovanje isparljivih jedinjenja izolata *T. harzianum* na izolat ŠR23/11 *M. phaseolina* (Original)

## 6.10. Osetljivost izolata *M. phaseolina in vivo*

Jednofaktorijalnom analizom varijanse, utvrđene su statistički značajne razlike gde je nezavisna promenljiva različiti tretmani, predstavljali značajan izvor variranja zavisne promenljive tj. intenziteta oboljenja biljaka šećerne repe ( $p < 0,05$ ) (Tabela 40 i 41).

Tabela 40. Jednofaktorijalna analiza varijanse intenziteta oboljenja biljaka šećerne repe inokulisanih ŠR23/11 u *in vivo* testu

Izvori varijacije	Suma kvadrata (SS)	Stepeni slobode (Df)	Sredina kvadrata (MS)	F - odnos (F)	Nivo značajnosti (p)
<b>Tretman</b>	42,112	6	7,019	23,115	0,00*

\*Statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ )

Tabela 41 Jednofaktorijalna analiza varijanse intenziteta oboljenja biljaka šećerne repe inokulisanih ŠR55(3)/09 u *in vivo* testu

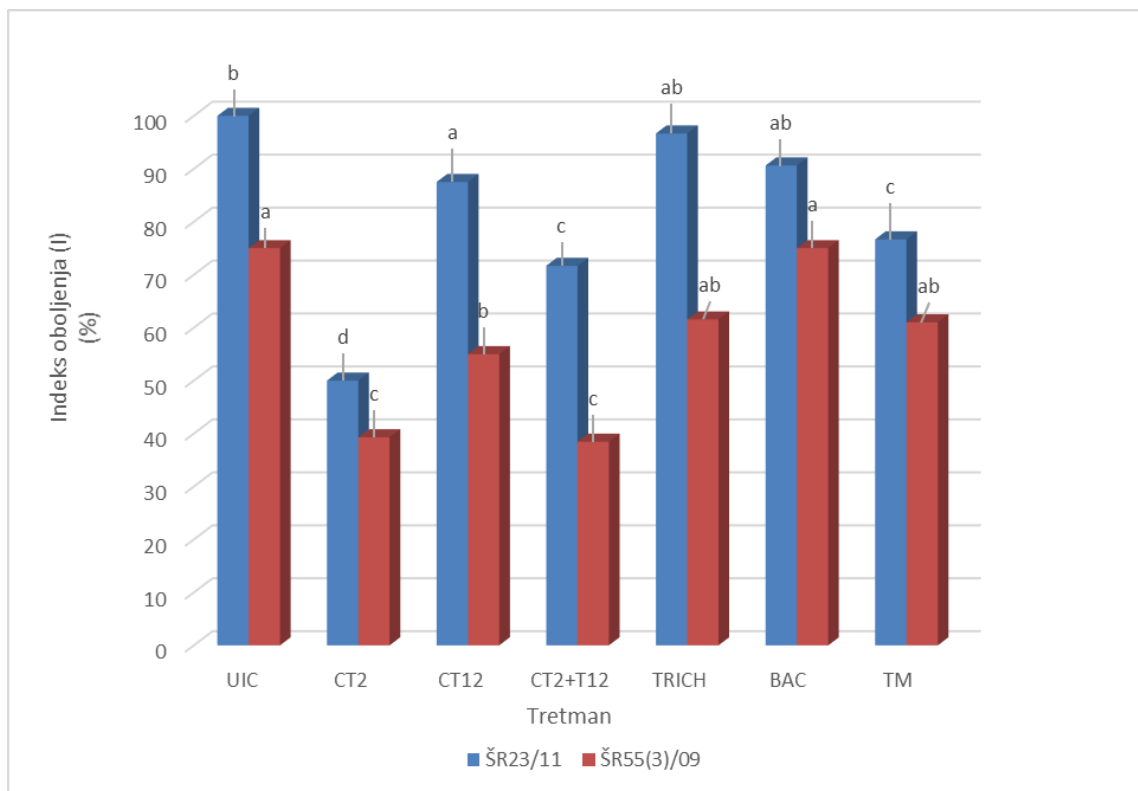
Izvori varijacije	Suma kvadrata (SS)	Stepeni slobode (Df)	Sredina kvadrata (MS)	F - odnos (F)	Nivo značajnosti (p)
<b>Tretman</b>	26,8670	6	4,4778	9,3016	0,00*

\*Statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ )

Rezultati *in vivo* eksperimenta su predstavljeni na Grafiku 6. Sedam dana nakon inokulacije primećeni su karakteristični simptomi ugljenaste truleži kod kontrolnih biljaka inokulisanih patogenom nakon čega se pristupilo vađenju biljaka i oceni simptoma oboljenja prema skali datoj u Tabeli 1. Rezultati ukazuju da je izolat ŠR23/11 ispoljio značajno veći nivo agresivnosti prema biljkama šećerne repe u odnosu na izolat ŠR55(3)/09. Inicijalni simptomi koji su konstatovani su bili u vidu hloroze lišća, gubitka turgora, uvenuća i nekroze.

Indeks oboljenja u slučaju kontrole inokulisane izolatom ŠR23/11 je bio 100% dok je u slučaju izolata ŠR55(3)/09 bio 75%. Takođe, značajna razlika ( $p \leq 0,05$ ) je detektovana između primenjenih tretmana (Tabela 40 i 41). Dva izolata *T. harzianum* (T2 i T12), koji su ispoljili najjače antagonističko dejstvo protiv patogena u *in vitro* ogledima i koja su odabrana za dalje ispitivanje

u ogledu *in vivo* ispoljili su pozitivan efekat u suzbijanju patogena. Rezultati eksperimenta ukazuju na to da primena izolata T2 i T12, pojedinačno, ili u kombinaciji, značajno utiče na smanjenje indeksa oboljenja biljaka u poređenju sa kontrolom. Najniži indeks oboljenja u slučaju biljaka inokulisanih izolatom ŠR55(3)/09 je zabeležen u tretmanu CT2+T12, dok je tretman CT2 bio na istom nivou statističke značajnosti. U slučaju biljaka inokulisanih izolatom ŠR23/11 najniži indeks oboljenja je zabeležen u tretmanu CT2, a zatim i tretmanima CT2+T12 i TM. Efikasnost primene hemijskog tretmana je bila na istom nivou značajnosti kao i u tretmanu u kom je vršena primena kombinacije dva izolata *T. harzianum*, dok se CT2 tretman pokazao boljim u odnosu na primenu hemijskog tretmana i zabeležen je značajno nizi indeks oboljenja. Sa druge strane Trifender® Pro i Bacillomix® Original nisu ispoljili zadovoljavajući efekat u kontroli prouzrokovala ugljenaste truleži, gde je indeks oboljenja bio na istom nivou statističke značajnosti kao u slučaju kontrole kod oba testirana *M. phaseolina* izolata.

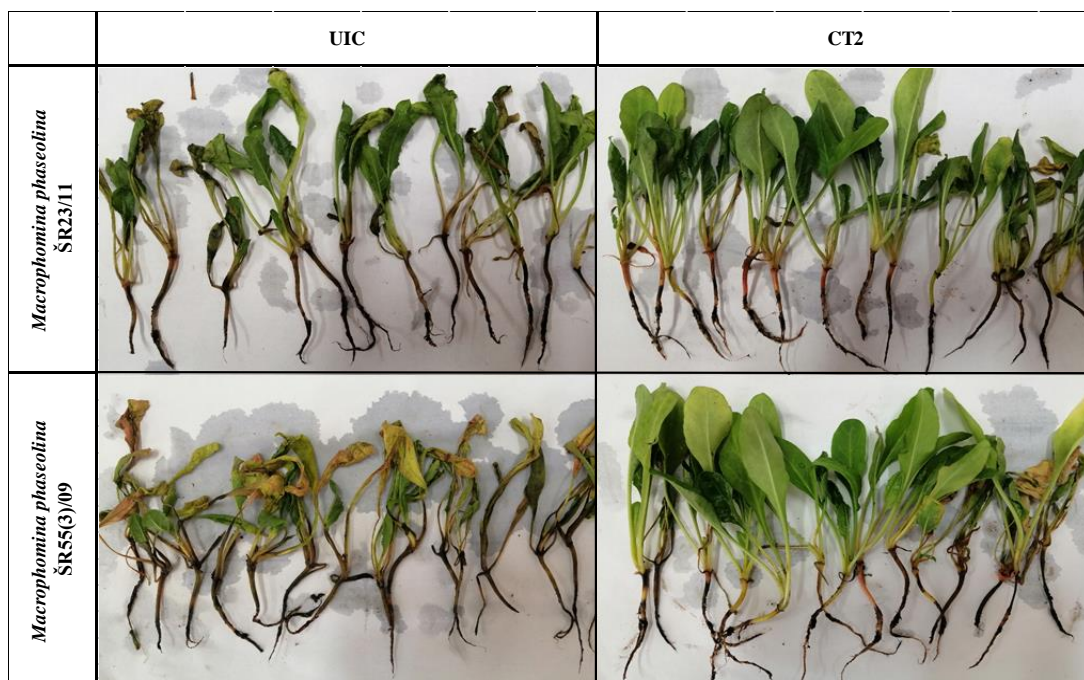


\*Jednofaktorijalna analiza varijanse

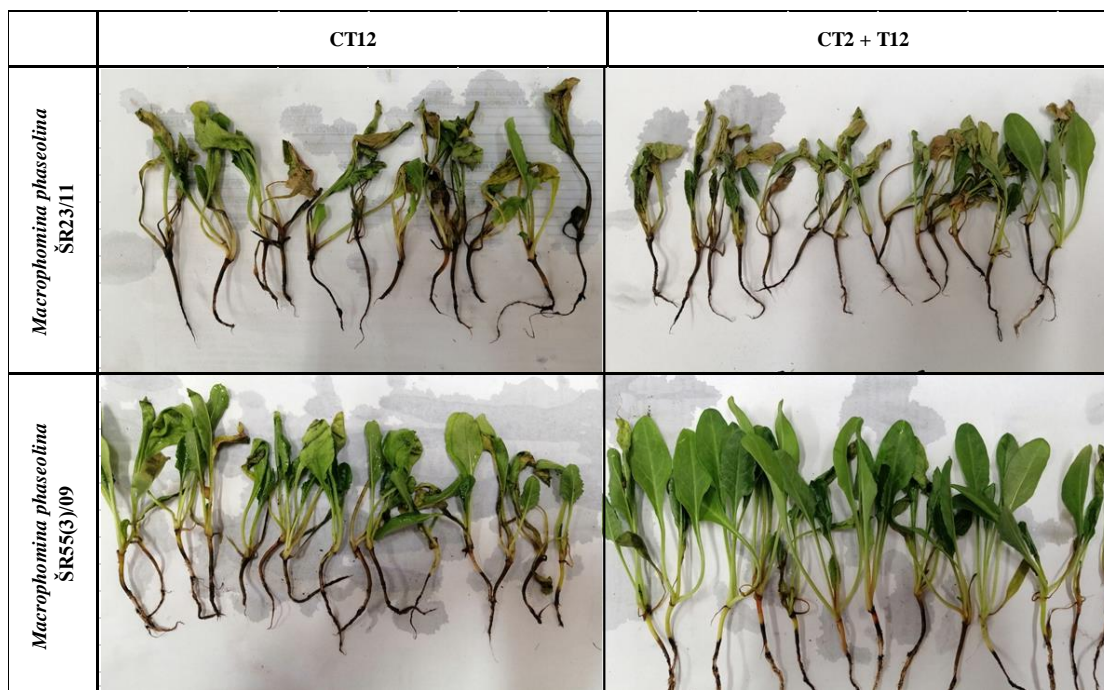
\*Stubovi obeleženi različitim slovima se statistički značajno razlikuju

Grafik 6. Efekat različitih tretmana na pojavu ugljenaste truleži korena na biljkama šećerne repe nakon 7 dana inkubacije u kontrolisanim uslovima klima komore (UIC = netretirana inokulisana kontrola, CT2 = suspenzija konidija *T. harzianum* T2, CT12 = suspenzija konidija *T. harzianum* T12, CT2+T12 = suspenzija konidija *T. harzianum* T2 and *T. harzianum* T12, TRICH = Trifender<sup>®</sup> Pro, BAC = Bacillomix<sup>®</sup> Original, TM = Funomil<sup>®</sup> 700 WG)





Slika 29. Biljke šećerne repe inokulisane patogenom (UIC) i biljke šećerne repe inokulisane patogenom i tretirane suspenzijom konidija *T. harzianum* T2 izolata (CT2) (Original)

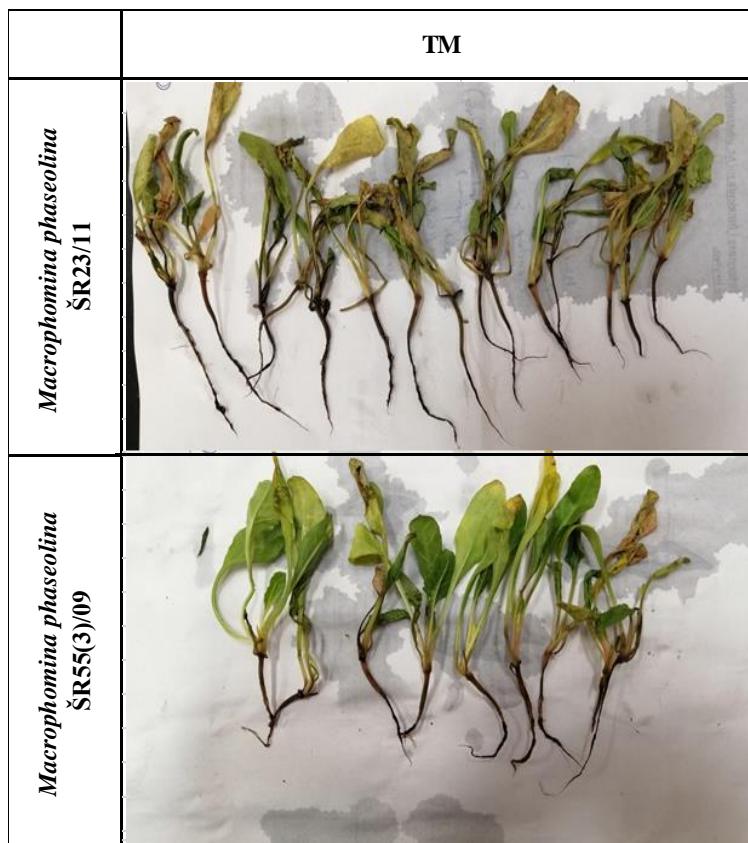


Slika 30. Biljke šećerne repe inokulisane patogenom i tretirane suspenzijom konidija *T. harzianum* T12 izolata (CT12) i suspenzijom konidija *T. harzianum* T2 + T12 izolata (CT2 + T12) (Original)



Slika 31. Biljke šećerne repe inokulisane patogenom i tretirane preparatom Trifender<sup>®</sup> Pro (TRICH) i preparatom Bacillomix<sup>®</sup> Original (BAC) (Original)





Slika 32. Biljke šećerne repe inokulisane patogenom i tretirane preparatom Funomil® 700 WG (TM) (Original)

## 7. DISKUSIJA

### 7.1. Simptomi bolesti

Simptomi bolesti koji su opisani kod biljaka iz kojih je izolovana *M. phaseolina* su u skladu sa simptomima koje opisuje (Stojšin, 2003; Karadimos i sar., 2002). Simptomi ugljenaste truleži su se ispoljavali na nadzemnom delu biljaka u vidu uvenuća lišća, koje je kasnije potpuno nekrotiralo i odumiralo. Na korenu su se ispoljili karakteristični simptomi u vidu sivo mrkih lezija. Trulež se najčešće razvijala na bočnim stranama korena, kao i na repu korena, a nešto ređe trulež se mogla detektovati i na glavi korena. Unutrašnjost korena je u početku bila žute boje, a zatim u podmakloj fazi tkivo je poprimilo braon i crnu boju sa mikrosklerocijama u šupljinama nekrotiranog tkiva, dok je na samom kraju vegetacije koren mumificirao. Iste simptome opisuje i Jacobsen (2006).

### 7.2. Provera patogenosti izolata

Provera patogenosti izolata urađena je za svih 46 izolata. Uočeno je da su početni simptomi koji se javljaju na nadzemnom delu biljaka šećerne repe BBCH 14, hloroza lišća i gubitak turgora, dok su početni simptomi na korenu biljaka bili u vidu pojave individualnih lezija tamne boje, vremenom dolazi do spajanja lezija, i prstenaste do potpuna nekroza korena. Ovi rezultati su saglasni sa nalazima Stojšin i sar. (2012) koji takođe opisuju simptome na mladim biljkama šećerne repe i za koje je utvrđeno da ih prouzrokuje vrsta *M. phaseolina*. Rezultati dobijeni u ovom radu pokazuju da postoji značajna razlika između izolata u nivou patogenosti. Slične rezultate su dobili Omar i sar. (2007) koji su, takođe, uočili statistički značajne razlike u nivou patogenosti različitih izolata *M. phaseolina* na biljkama pamuka. Beas-Fernandez i sar. (2006) su utvrdili da postoji visok stepen varijabilnosti u nivou patogenosti, između izolata poreklom sa različitog domaćina. Ovi navodi su u saglasnosti sa rezultatima ovog istraživanja gde su se izolati *M. phaseolina* koji su izolovani sa kukuruza, soje i suncokreta jasno mogli razdvojiti u tri grupe prema

nivou patogenosti. Takođe, Das i sar. (2008) su u svojim istraživanjima ispitivali patogenost geografski udaljenih izolata, a njihovi rezultati su pokazali da izolati poseduju visok stepen varijabilnosti.

### **7.3. Morfološko - odgajivačke karakteristike izolata *M. phaseolina***

Ispitivanjem uticaja različitih medijuma na brzinu porasta izolata *M. phaseolina* zabeležene su značajne razlike, na šta su uticale kako morfološke osobine svakog izolata tako i vrsta hranljive podloge. Na osnovu dobijenih rezultata može se reći da su gotovo svi izolati imali najbolji porast na KDA podlozi. Takođe, uočena je značajna razlika u brzini porasta kolonije različitih izolata na gore pomenutoj podlozi, a ovi rezultati su u saglasnosti sa istraživanjima koja su sprovedeli Reznikov i sar. (2018). Proučavanjem morfoloških karakteristika svih 46 izolata na KDA i MIN + KClO<sub>3</sub> podlozi može se reći da su izolati pokazali visok nivo varijabilnosti kada se posmatraju makroskopske i mikroskopske morfološke karakteristike. Na KDA podlozi izolati su veoma varijabilni kada je u pitanju intenzitet formiranja micelije kao i intenzitet formiranih mikrosklerocija, što je saglasno sa rezultatima koje navode Beas-Fernandez i sar. (2006). Isto tako razlike u izgledu kolonija na MIN + KClO<sub>3</sub> podlozi su bile evidentne, kao i razdvajanje izolata u tri fenotipske grupe prema njihovoj osetljivost na hlor. Slično rezultatima ovog istraživanja Pearson i sar. (1986) su podelili izolate prema načinu na koji metabolišu jedinjenja hlora u tri grupe. Ovu pojavu objašnjavaju činjenicom da se hlorat koji je analog nitrata redukuje u hlorit preko puta nitrat-reduktaze i može biti toksičan za gljive, dok je normalan porast izolata bio rezultat inaktivacije jednog, ili više enzima koji su uključeni u put nitrat-reduktaze. Fenotipsku karakterizaciju izolata na osnovu osetljivosti prema hloru prijavilo je nekoliko autora (Su i sar., 2001; Purkayastha i sar., 2006). Nadalje, Das i sar. (2008) su u svom istraživanju pokušali da utvrde korelaciju između biljke domaćina i osetljivosti izolata prema hloru. Rezultati njihovih istraživanja su u saglasnosti sa rezultatima našeg rada gde nije utvrđena korelacija između biljke domaćina i osetljivosti izolata prema hloru. Sa druge strane Pearson i sar. (1986) navode da se izolati *M. phaseolina* izolovani sa soje i kukuruza jasno razlikuju po pitanju osetljivosti prema hloru i da se mogu grupisati. Pored pomenutih navoda, većina dostupnih istraživanja sugerise da

nema korelacije između osetljivosti izolata na hlor i patogenosti izolata (Kaur i sar., 2012), te su ovi navodi takođe potvrđeni i kroz rezultate ovog istraživanja.

Svi izolati *M. phaseolina* ispitivani u okviru ove disertacije obrazovali su mikrosklerocije tamno braon do crne boje, nepravilnog oblika. Veličina mikrosklerocija se kretala od 112,50 x 105,00 µm do 167,50 x 147,50 µm. Nešto manju veličinu mikrosklerocija beleže Reznikov i sar. (2018) od 68,8 x 52,0 µm do 113,7x 96,0 µm. Dok sa druge strane Beas-Fernandez i sar. (2006) navode da se veličina mikrosklerocija njihovih testiranih izolata kretala od 112 x 78 µm do 324 x 196 µm. Dhingra i Sinclair (1978) navode da nije utvrđena korelacija između veličine mikrosklerocija i patogenosti izolata, sa njihovim rezultatima su saglasni i Beas-Fernandez i sar. (2006). Rezultati ispitivanja sprovedenih u okviru ove disertacije su takođe u saglasnosti sa gore pomenutim navodima.

Faktori spoljašnje sredine značajno deluju na porast *M. phaseolina*. Prema Agrios (2005), pH vrednost sredine u kojoj se mikroorganizami razvijaju, kao i temperatura mogu biti limitirajući faktori za razvoj u koliko nisu ispunjeni minimalni zahtevi organizama koji su im neophodni za neometan rast i razvoj. Optimalna vrednost pH podloge za razvoj izolata *M. phaseolina* je bila u rasponu od 4 do 7, slično navode i Csöndes i sar. (2011) koji zaključuju da je optimalna pH za razvoj izolata od 4 do 6. Takođe rezultati istraživanja koja su sprovedeli Dhingra i Sinclair (1978) pokazuju da je optimalan pH rang za rast gljive od 5 do 8, što je takođe u skadu sa našim istraživanjem jer su izolati ostvarili zadovoljavajući porast i na pH 8. Csöndes i sar. (2011) beleže da je pH 2 nepovoljno uticala na porast izolata, što je takođe saglasno rezultatima dobijenim u ovom istraživanju, gde je zabeleženo da su izolati MPHKU, MPHSU, ŠR32/12 potpuno prekinuli rast. Ova pojava se može objasniti činjenicom da nekim izolatima više odgovara kisela nego bazna sredina (Dhingra i Sinclair, 1978). Optimalan porast izolata *M. phaseolina* u ovim istraživanjima zabeležen je na temperaturama u opsegu od 30 do 35 °C, a iste temperature navode Collins i sar. (1991) u rezultatima svog istraživanja. Sa druge strane, temperature od 15 i 40°C u potpunosti zaustavljaju rast izolata što je u saglasnosti sa rezultatima istraživanja koja su sprovedeli Csöndes i sar. (2011). Osim razlika u brzini rasta micelije izolata, temperature nisu uticale na izgled kolonije izolata.

### 7.4.1. Utvrđivanje genetičke varijabilnosti izolata *M. phaseolina* pomoću SSR markera

*M. phaseolina* je patogen koji je široko rasprostranjen u R. Srbiji. Karakterizacija ove vrste veoma je važna kako bi se što bolje razvio plan za suzbijanje ove fitopatogene gljive. Rezultati istraživanja u okviru ove disertacije su pokazali da se primenom SSR markera izolati nisu grupisali, kako prema patogenim tako ni prema morfološkim karakteristikama. Razlog ovakve pojave može biti činjenica da su izolati uzeti sa veoma malog geografskog područja. Ovi rezultati su saglasni sa istraživanjima Mahdizadeh i sar. (2011) koji navode da nije dokazana korelacija između fenotipskih karakteristika i genetičke varijabilnosti izolata *M. phaseolina*, kao i da nije moguće grupisati podatke i razdvojiti izolate prema njihovoj patogenosti, morfološkim karakteristikama, domaćinu, ili geografskom poreklu. Nasuprot nas, oni ovu činjenicu objašnjavaju uključenošću velikog broja izolata poreklom sa različitih domaćina i lokaliteta koje su ispitivali, u odnosu na ostala istraživanja u kojima su druge grupe istraživača došle do suprotnih rezultata. Naime, oni navode da bi pomenuti molekularni markeri mogli da se koriste za grupisanje izolata *M. phaseolina* na osnovu geografskih regiona (Sánchez i sar., 2017; Jana i sar., 2005). Nadalje, Purkayastha i sar. (2008) su utvrdili da primenom ove molekularne metode izolati bivaju dosledno grupisani u genetski slične grupe. Takođe, širok genetički diverzitet ove polifagne fitopatogene gljive se ne uočava samo kod izolata poreklom sa različitih domaćina i različitih lokaliteta, već i unutar populacije izolata sa iste vrste domaćina, ovo je u saglasnosti sa rezultatima istraživanja, gde je uočeno da je najveći procenat ukupne varijabilnosti posledica varijabilnosti unutar ispitivanih izolata. Genetički diverzitet između izolata *M. phaseolina* može biti posledica varijabilnosti u nivou patogenosti kao i sposobnosti ove vrste da se prilagodi različitim agroekološkim uslovima sredine (Babu i sar., 2010). U prilog tome govore i činjenice koje navode Csondes i sar. (2012) koji su otkrili da karakteristike kao što su sposobnost rasta pri različitim temperaturama i pH vrednostima zemljišta omogućavaju patogenu da se prilagodi različitim uslovima spoljašnje sredine, što je u korelaciji sa genetičkom varijabilnošću ove vrste.

## 7.5. Osetljivost izolata *M. phaseolina* *in vitro*

### 7.5.1. Osetljivost *M. phaseolina* prema tiofanat-metilu

Dobijeni rezultati ukazuju na to da je tiofanat-metil značajno inhibirao porast kolonije izolata *M. phaseolina* u koncentraciji od 0,1 mg/l gde je zabeležena inhibicija iznosila od 45,28 do 52,97 %, dok je pri koncentraciji od 1 mg/l inhibicija patogena bila 100%. Rezultati Chikkanna Swamy i sar. (2018) ukazuju na jako inhibitorno delovanje tiofanat-metila protiv *M. phaseolina*, i navode da pri koncentraciji od 500 ppm dolazi do potpunog porasta kolonije patogena, što je u skladu sa rezultatima u ovom istraživanju. Takođe, Lakhnan i sar. (2022), potvrđuju navode da tiofanat-metil ispoljio zadovoljavajući inhibitorni efekat u *in vitro* ispitivanjima, ali da karbendazim + mankozeb u kombinaciji kao i sam karbendazim daju bolje rezultate.

### 7.5.2. Osetljivosti *M. phaseolina* prema *Bacillus* sp.

Antagonizam različitih gljiva prema patogenim organizmima je oblast koja se sve više proučava i dobija posebnu pažnju. Veliki broj literaturnih podataka ukazuje na visok potencijal vrsta iz roda *Bacillus* u biološkoj zaštiti od fitopatogenih gljiva (Fira i sar., 2018). Ovaj rod je široko rasprostranjen u prirodi i dobro adaptiran na različite agroekološke uslove (Liu i sar., 2019). Rezultati do sada sprovedenih istraživanja govore da primena vrsta iz roda *Bacillus* u suzbijanju prouzrokovala ugljenaste truleži korena različitih biljaka daje dobre rezultate i predstavlja ekološki opravdanu meru za suzbijanje patogena (Rangel-Montoya i sar., 2022; Hashem i sar., 2017; El-Bendary i sar., 2016; Castaldi i sar., 2021). Torres i sar. (2016) navode da je fungistatični efekat povezan sa potencijalom ovog agensa da se takmiči za prostor i hranljive materije što ga čini dobrim kompetitorom. Osim toga ovi agensi imaju različite strategije za suzbijanje fitopatogenih gljiva kao što su, proizvodnja antibiotika, litičkih enzima, a takođe imaju mogućnost da oslobađaju isparljiva jedinjenja u spoljašnju sredinu (Abdelmoteleb i sar. 2017; Khan i sar., 2018).

Rezultati ispitivanja antagonističkog uticaja *Bacillus* sp. na izolate *M. phaseolina* u *in vitro* ogledima, ukazuju na to da ovaj agens ima veliki potencijal u suzbijanju prouzrokovala ugljenaste

truleži. Takođe, dobijeni rezultati su u saglasnosti sa podacima Singh i sar. (2008), koji navode da *Bacillus* spp. uspešno vrši inhibiciju porasta kolonije u testu dvojne kulture kao i da poseduje izuzetan antifungalni potencijal u suzbijanju *M. phaseolina*. Nadalje, Bojórquez-Armenta i sar. (2021) takođe navode da su u *in vitro* testu, izolati *Bacillus* spp. ispoljili visok nivo antagonizma prema *M. phaseolina*, gde se procenat inhibicije porasta kolonije patogena kretao od 62,5 do 85%. Takođe, Rangel-Montoya i sar. (2022) su došli do zaključaka da pojedini sojevi *Bacillus amyloliquefaciens* deluju antagonistički na porast kolonije i produkciju mikrosklerocija ispitivanih izolata *M. phaseolina*, što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u *in vitro* ispitivanjima u okviru ove disertacije.

### 7.5.3. Osetljivost izolata *M. phaseolina* prema *Trichoderma harzianum*

Ispitivanjem antagonističkog delovanja izolata *T. harzianum* na izolate *M. phaseolina* zabeleženo je da su svi testirani izolati *T. harzianum* u testu dvojne kulture ispoljili inhibitorni efekat na porast micelije patogena. Slične rezultate u svom istraživanju dobili su Sreedevi i sar. (2011) koji navode da je *T. harzianum* značajno smanjila porast micelije *M. phaseolina* izolata u testu dvojne kulture. Khaled i Taheri (2016) su dokazali antagonistički efekat 11 izolata *Trichoderma* spp. prema ispitivanim izolatima *M. phaseolina* u testu dvojne kulture gde je procenat inhibicije varirao u rasponu od 20,22 do 58,67%. Pored inhibicije porasta kolonije patogena u istraživanju sprovedenom u okviru ove disertacije uočena je i različita antifungalna aktivnost *T. harzianum* izolata, te su raspoređeni u tri različite klase. Navedena zapažanja su u skladu sa rezultatima velikog broja istraživanja u kojima se navodi da se potencijalna efikasnost vrsta iz roda *Trichoderma* protiv patogena ispoljava kroz nekoliko načina antagonističkog delovanja, a to su antibioza, kompeticija i mikoparazitizam (Mendoza i sar., 2015; Park, 1960). Antibioza se javlja tokom međusobne interakcije mikroorganizama kada dolazi do proizvodnje antibiotika od strane sojeva *Trichoderma*, koji inhibiraju rast drugih mikroorganizama. Shodno tome formiranje zone bez rasta između patogena i antagonista može se pripisati dejstvu sekundarnih metabolita kao što su gliotoksin, gliovirin, viridin i njegovi derivati, koji funkcionišu kao antimikrobni lekovi i koji imaju važnu ulogu u antibiozi (Tomah i sar., 2020; Howell, 2006; Benitez i sar., 2004). Ovi navodi su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u ovom istraživanju

gde je kod izolata T1 do T10 zabeleženo formiranje opisane zone, te se može pretpostaviti da se radi o pomenutom mehanizmu delovanja. Nadalje, konkurencija za hranljive materije i životni prostor predstavlja važan način antagonističkog delovanja i predstavlja korisno svojstvo u pogledu primene ovakvih agenasa u zaštiti bilja. Sposobnost vrsta *Trichoderma* da se takmiče za hranljive materije i životni prostor progresivnim formiranjem biomase micelijuma, rezultira supresijom drugih mikroorganizama. Na ovaj način oni brzo kolonizuju supstrate i isključuju sporije rastuće patogene (Andrade-Hoyos i sar., 2020; Köhl i sar., 2019). Sa druge strane, pretpostavlja se da litički enzimi koje proizvode vrste roda *Trichoderma* igraju važnu ulogu u mikoparazitizmu tako što dezintegrišu ćelijski zid patogena i olakšavaju prodiranje u hife (Bailei i sar., 2008; Hajnal Jafari i sar., 2020). Mendoza i sar. (2015) navode i da je ovo poželjna karakteristika i da izolati koji pokazuju ovo svojstvo imaju ogroman potencijal kao agensi za suzbijanje patogena. U ovom istraživanju ispitivani izolati su pokazali visok inhibitorni potencijal u redukovanju porasta micelije patogena. Zbog svoje sposobnosti da proizvode enzime koji su odgovorni za razgradnju ćelijskog zida fitopatogenih gljiva, kao i materija koje imaju antifungalno delovanje može se reći da poseduju visok potencijal da se koriste kao biofungicidi, promoteri biljnog rasta, a takođe i u povećanju produktivnosti poljoprivredne proizvodnje (Guzmán-Guzmán i sar., 2023).

Na osnovu rezultata dobijenih u testu isparljivih jedinjenja može se reći da su jedinjenja koje proizvodi izolati *T. harzianum* značajno uticala na smanjenje porasta kolonije patogena. Ovi rezultati su u saglasnosti sa brojnim istraživanjima u kojima se navodi da *Trichoderma* vrste produkuju isparljiva jedinjenja koji značajno inhibiraju razvoj fitopatogenih gljiva (Sood i sar., 2020). Takođe, Vey i sar. (2001) navode da jedinjenja kao što su etilen, cijanovodonik, aldehidi i ketoni koje proizvodi *Trichoderma* spp. igraju važnu ulogu u kontroli različitih biljnih patogena. U dosadašnjim istraživanjima potvrđeno je njihovo inhibitorno delovanje prema *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina* i *Alternaria brassicicola* (Zeilinger i sar., 2016; Khaled i Taheri, 2016). Takođe, Raut i sar. (2014) su u svojim istraživanjima potvrdili antagonističko delovanje isparljivih jedinjenja prema *F. graminearum*, *R. solani* i *P. ultimum*. Pretpostavka je da je redukcija porasta micelije prouzrokovana antifungalnim delovanjem ovih materija, dok sa tim u vezi Mukherjee i sar. (2012) navode da hidrolitički enzimi deluju na oslabljene ćelije i narušavaju njihovu strukturu što prouzrokuje degradaciju i nekarakterističan rast. Sridharan i sar. (2020) su dokazali fungistatično



dejstvo isparljivih jedinjenja tako što su nakon što je *Trichoderma* spp. uklonjena iz sredine patogena on nastavio svoj rast, slično je zapaženo i u pogledu formiranja mikrosklerocija u odsustvu *Trichoderma* spp.

## 7.6. Osetljivost izolata *M. phaseolina* *in vivo*

U *in vivo* eksperimentu potvrđen je snažan antagonistički efekat dva izolata *Trichoderma* koji su pokazali najjači potencijal u kontroli patogena *in vitro*. Takođe, i druge grupe istraživača su u svojim istraživanjima potvrdili visok nivo antagonističke aktivnosti i potencijalnu efikasnost *Trichoderma* spp. u borbi protiv ekonomski značajnih fitopatogenih gljiva kao što su *M. phaseolina*, *F. oxysporum* f. sp. *capsici* i *Aspergillus flavus* u različitim usevima (Pastrana i sar., 2016; Jamil i sar., 2021; Kifle i sar., 2017). Abd-Elsalam (2010) u svojim istraživanjima navodi da neki od testiranih *Trichoderma* spp. izolata predstavljaju obećavajuće bioagense koji su veoma perspektivni za komercijalizaciju jer su značajno povećali preživljavanje sadnica pamuka zaraženih *M. phaseolina*. Harman i sar. (2004) navode da vrste iz roda *Trichoderma* kolonizuju površinu korena i dovode do promena u metabolizmu biljaka, sve ovo dalje rezultira intenzivnijem rastu i bokorenju korena, što povećava dostupnost hranljivih materija i otpornost biljaka prema patogenima iz zemljišta. Takođe, molekuli elicitori proizvedeni od strane *Trichoderma* spp. učestvuju u ekspresiji gena uključenih u aktivaciju odbrambenog sistema biljaka što ih čini otpornijim prema patogenu (Gomes i sar., 2016). U prilog pomenutim navodima, Vinale i sar. (2004) tvrde da je primena *T. harzianum* i *T. atroviride* povećala produktivnost biljaka zelene salate i paradajza u stakleničkoj proizvodnji za 300% u odnosu na netretiranu kontrolu. Takođe, Indra i Subbiah (2003) navode da je primenom *T. harzianum* i *T. viride* pojava ugljenaste truleži u biljkama crnog pasulja smanjena za 50%, što je saglasno sa rezultatima dobijenim u ovom istraživanju, gde je indeks oboljenja u slučaju izolata T2 i T12 bio značajno smanjen u odnosu na inokulisanu kontrolu. Zanimljivo je da varijanta u kojoj je primenjena kombinacija izolata T2 i T12 nije poboljšala kontrolu ugljenaste truleži u poređenju sa upotrebom pojedinačnog izolata *T. harzianum*. Razlog za ovu pojavu može biti postojanje specifičnih veza u okviru vrsta ili sojeva, a efikasnost proizvoda koji sadrže različite vrste ili sojeve može da varira čak i u sličnim uslovima

(Zin i Badaluddin, 2020). Sa druge strane tiofanat-metil nije bio efikasan u smanjenju pojave ugljenaste truleži biljaka šećerne repe, što je u saglasnosti sa rezultatima do kojih je došao De (2014), koji navodi da je tiofanat-metil najmanje efikasan protiv *M. phaseolina* u Juti. Štaviše, Martinez-Salgado i sar. (2021) su utvrdili da je tiofanat-metil pokazao istu efikasnost kao izolati *Trichoderma* spp. u smanjenju pojave ugljenaste truleži u usevu kikirikija, što objašnjavaju činjenicom da su lokalni sojevi *M. phaseolina* stekli otpornost prema tiofanat-metilu. Navedene konstatacije su u skladu sa rezultatima dobijenim u ovom istraživanju te se pojava da su izolati poreklom iz ovog regiona postali otporni prema Funomil® 700 WG možda može objasniti prethodno pomenutom činjenicom. Pored primene *Trichoderma* spp. veliki broj autora je ukazao na mogućnost primene *B. subtilis* u suzbijanju prouzrokovala ugljenaste truleži. Međutim, rezultati ovog istraživanja dobijeni u *in vivo* ispitivanju nisu dali zadovoljavajuće rezultate, iako su rezultati *in vitro* ispitivanja bili obećavajući. Slična zapažanja u svojim rezultatima navode Dure i sar. (2022) koji beleže nedosledne rezultate u *in vitro* i *in vivo* ispitivanjima pojedinih sojeva *Bacillus* u suzbijanju *Sclerotinia sclerotiorum*. Takođe, podaci dobijeni u drugim istraživanjima govore da postoji značajna razlika u delovanju antagonista u laboratorijskim uslovima u odnosu na *in vivo* ispitivanja. Pretpostavlja se da je razlika u delovanju uslovljena smanjenom količinom metabolita koju proizvode antagonisti u *in vivo* uslovima gde je njihova produkcija uslovljena raznim fizičko – hemijskim procesima koji se odvijaju u zemljištu (Engelkes i sar., 1997). Nadalje, dobijeni rezultati nisu u saglasnosti sa rezultatima koje su dobili Singh i sar. (2008) koji su utvrdili da *Bacillus* spp. poseduje visok antagonistički potencijal i može se primenjivati u kontroli *M. phaseolina*. Takođe, prema navodima Pastrana i sar. (2016) primena *T. asperellum* i *Bacillus* spp. je smanjila pojavu ugljenaste truleži u usevu jagode slično sintetičkim fungicidima, dok druga grupa autora navodi da tretmani u kojima su primenjene *T. asperellum* i *T. harzianum* nisu pokazali zadovoljavajuću inhibiciju bolesti kao što je to bilo u slučaju tretmana sa *T. koningiopsis* (Martinez-Salgado i sar., 2021). Razlog za ovako oprečne rezultate može da bude ograničena efikasnost prirodnih agenasa, kao i njihova nedoslednost u uslovima na terenu. Mukherjee i sar. (2012) objašnjavaju da poreklo ovih poteškoća leži u tome da mikroorganizmi sporo deluju i da su pod jakim uticajem faktora spoljašnje sredine. Slično, Zin i Badaluddin (2020) navode da mehanizmi delovanja bioloških agenasa mogu zavisi od uslova životne sredine kao što su pH, temperatura, salinitet i dostupnost hranljivih materija. Takođe, opšte je poznato da faktori kao što

su biljna vrsta i sorta, a takođe i mikrobna aktivnost u zemljištu značajno utiču na efikasnost preparata na bazi korisnih mikroorganizama. S druge strane, izolati *T. harzianum* korišćeni u ovoj studiji (T2 i T12) su pokazali visok potencijal u kontroli *M. phaseolina*. Iz tog razloga možemo pretpostaviti da upotreba antagonističkih mikroorganizama predstavlja obećavajuću alternativu za suzbijanje prouzrokovaca ugljenaste truleži korena šećerne repe. Zbog svoje sposobnosti da kolonizuju različite ekološke niše, ovi biološki agensi ostvaruju simbiozu sa biljkama i deluju blagotvorno, podstičući rast biljaka i razvoj korenovog sistema te na taj način stimulišu odbrambene mehanizme i jačaju imuni odgovor biljaka. Ove mere kontrole su u skladu sa tehnologijama uzgoja biljaka, gde je akcenat stavljen na uticaj na životnu sredinu, kao i sa European Green Deal (EGD) koji ima za cilj smanjenje primene hemijskih pesticida za 50% do 2030. godine (Hulot i Hiller, 2021).

## 8. ZAKLJUČAK

Na osnovu sprovednih istraživanja mogu se doneti sledeći zaključci:

- Izolacijom patogena iz uzoraka korena šećerne repe prikupljenih sa različitih lokaliteta u Srbiji i proučavanjem patogenih i morfoloških karakteristika dobijenih izolata, utvrđeno je da pripadaju vrsti *Macrophomina phaseolina*. Identitet izolata je potvrđen sekvenciranjem umnoženih ITS regiona.
- Svih 46 izolata *Macrophomina phaseolina* je nakon sedam dana od inokulacije biljaka šećerne repe BBCH14 prouzrokovalo uvenuće, hlorozu listova, nekrozu korena i konačno potpuno propadanje biljaka.
- Utvrđeno je da izolati imaju najbrži porast na KDA podlozi, dok je značajno manji na MIN + KClO<sub>3</sub>. Izolati su podeljeni u različite grupe u zavisnosti od ispitanih makroskopskih morfoloških karakteristika na KDA podlozi. Utvrđeno je da su izolati veoma varijabilni po pitanju makroskopskih morfoloških odlika. Na MIN + KClO<sub>3</sub> podlozi je utvrđeno je da su izolati ispoljili osetljivost na prisustvo hlora i podeljeni su u tri grupe. U prvu grupu spadaju izolati koji imaju normalan porast i nisu ispoljili osetljivost prema hloru 9% izolata. U drugoj grupi se nalazi 32%, dok treću grupu čini 59% izolata, izolati iz ove dve grupe su ispoljili osetljivost na hlor.
- Proučavanjem veličine mikrosklerocija na KDA podlozi utvrđeno je da je veličina mikrosklerocija veoma varijabilna, i da se kretala u rasponu od 112,50 x 105,00 µm do 167,50 x 147,50 µm.
- Optimalna pH vrednost za porast patogena je pH 6 gde je zabeležen najveći prosečan dnevni porast micelije 27,96 mm/dan. Najmanji porast registrovan je na pH 2, dok je kod nekih izolata došlo do potpunog prekida rasta micelije.
- Optimalne temperature za rast i razvoj izolata *Macrophomina phaseolina* su od 30 i 35 °C, dok temperature ispod 15 i iznad 40 °C predstavljaju granične vrednosti za rast i razvoj izolata ove fitopatogene gljive.
- Ispitivanje genetičkog diverziteta izolata *Macrophomina phaseolina* pomoću SSR prajmera utvrđeno je da se izolati nisu grupisali kako prema patogenim, tako ni prema

morfološkim karakteristikama. Varijabilnost unutar izolata je imala najveći udeo u ukupnoj varijabilnosti.

- Izolacijom biološkog agensa iz uzoraka zemljišta i proučavanjem karakteristika reproduktivnih organa dobijenih izolata, utvrđeno je da pripadaju rodu *Trichoderma*. Umnožavanjem i sekvenciranjem ITS i TEF regiona potvrđeno je da izolati pripadaju vrsti *Trichoderma harzianum*.
- Svi testirani izolati *Trichoderma harzianum* su ispoljili antagonistički potencijal i inhibirali porast micelije izolata *Macrophomina phaseolina* u testu dvojne kulture, a procenat inhibicije se kretao od 54,07 do 64,44%. Najjača inhibicija je zabeležena u tretmanu sa izolatom T2 u kombinaciji sa oba testirana izolata *Macrophomina phaseolina*. Na osnovu kontakta micelije antagonista i patogena u izolati su podeljeni prema klasama, gde su utvrđene razlike u načinu antagonističkog delovanja bioagensa prema patogenu.
- Isparljiva jedinjenja koja produkuju izolati *Trichoderma harzianum* inhibiraju porast kolonije patogena. Utvrđeno je to da su isparljiva jedinjenja produkovana od strane izolata T2 i T12 ispoljila najjači inhibitorni efekat.
- Postoji snažna inhibicija rasta kolonija testiranih izolata patogena primenom biološkog agensa *Bacillus* sp. u *in vitro* ogledu u svim testiranim koncentracijama. Najjača inhibicija zabeležena je prilikom primene najviših koncentracije od 10 i 5%, dok je pri primeni koncentracija 2 i 1%, takođe zabeležen veoma visok procenat inhibicije koji se kretao od 67,8 do 75,7%.
- Pri koncentracijama tiofanat-metila od 1, 10 i 100 mg/l dolazi do potpunog prestanka porasta izolata patogena, dok je u slučaju primene preparata od 0,1 mg/l procenat inhibicije iznosio 45,28 do 52,97%. Koncentracije preparata od 0,001 i 0,01 mg/l nisu dale zadovoljavajuće rezultate, a procenat inhibicije kretao se od 8,44 do 9,53%.
- U *in vivo* eksperimentu sedam dana nakon inokulacije je došlo do pojave karakterističnih simptoma ugljenaste truleži. Inicijalni simptomi koji su primećeni su bili hloroza lišća, gubitak turgora, uvenuće i nekroza. Izolat ŠR23/11 ispoljio značajno veći nivo agresivnosti prema biljkama šećerne repe u odnosu na izolat ŠR55(3)/09.
- Primena izolata *Trichoderma harzianum* T2 i T12, pojedinačno ili u kombinaciji, značajno utiče na smanjenje indeksa oboljenja biljaka u poređenju sa kontrolom. U slučaju biljaka

inokulisanih izolatom ŠR23/11 efikasnost primene hemijskog tretmana bila na istom nivou značajnosti kao i tretman u kom je vršena primena kombinacije dva izolata *Trichoderma harzianum* (T2+T12), dok se tretman u kom je primenjen samo izolat (T2) pokazao boljim u odnosu na primenu hemijskog tretmana i zabeležen je značajno niži indeks oboljenja. Preparati Trifender® Pro i Bacillomix® Original nisu ispoljili zadovoljavajući efekat u kontroli prouzrokovala ugljenaste truleži u *in vivo* ispitivanju.

## 9. LITERATURA

1. Abdelmoteleb, A., Troncoso-Rojas, R., Gonzalez-Soto, T., González-Mendoza, D. (2017): Antifungal activity of autochthonous *Bacillus subtilis* isolated from *Prosopis juliflora* against phytopathogenic fungi. *Mycobiology* 45(4): 385–391. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2017.45.4.385>
2. Abd-Elsalam, K.A. (2010): Genetical and biological control of cotton ashy stem caused by *Macrophomina phaseolina* in an outdoor pot experiment. *Saudi Journal of Biological Sciences* 17(2): 147–152. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2010.02.008>
3. Aćimović, M. (1962): *Sclerotium bataticola* Taub., kao uzročnik uvelosti suncokreta u Vojvodini. *Zaštita bilja* (69-70), 125-137.
4. Aćimović, M., (1988): *Bolesti soje*. Naučna knjiga, Beograd.
5. Agrios, G.N. (2005): *Plant Pathology*, 5<sup>th</sup> edition. Academic Press, San Diego, USA.
6. Allmann, M., Candrian, U., Hofelein, C., Luthy, J. (1993): Polymerase chain reaction (PCR): a possible alternative to immunochemical methods assuring safety and quality of food – detection of wheat contamination in non-wheat food-products. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 196(3): 248–251. <https://doi.org/10.1007/BF01202741>
7. Almeida, Á.M.R., Abdelnoor, R.V., Arrabal Arias, C.A., Carvalho, V.P., Jacoud Filho, S.D., Marin, S.R.R., Benato, L.C., Pinto, M.C., Carvalho, C.G.P. (2003): Genotypic diversity among Brazilian isolates of *Macrophomina phaseolina* revealed by RAPD. *Fitopatologia Brasileira* 28: 279–285. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582003000300009>
8. Andrade-Hoyos, P., Silva-Rojas, H.V., Romero-Arenas, O. (2020): Endophytic *Trichoderma* species isolated from *Persea americana* and *Cinnamomum verum* roots reduce symptoms caused by *Phytophthora cinnamomi* in avocado. *Plants* 9: 1220. <https://doi.org/10.3390/plants9091220>
9. Anis, M., Abbasi, W., Zaki, M.J. (2010): Bioefficacy of microbial antagonists against *Macrophomina phaseolina* on sunflower. *Pakistan Journal of Botany* 42(4): 2935-2940.

10. Arias, S.R., Ray, D.J., Mengistu, A., Scheffler, E.B. (2011): Discriminating microsattellites from *Macrophomina phaseolina* and their potential association to biological functions. *Plant Pathology* 60: 709–718.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02421.x>
11. Athira, K. (2017): Efficacy of fungicide and bio-control agent against root rot of blackgram (*Vigna mungo* L.) caused by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6: 2601–2607.  
<https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.610.306>
12. Babu, B.K., Reddy, S.S., Yadav, M.K., Sukumar, M., Mishra, V., Saxena, A.K., Arora, D.K. (2010): Genetic diversity of *Macrophomina phaseolina* isolates from certain agro-climatic regions of India by using RAPD markers. *Indian Journal of Microbiology* 50(2): 199–204 <https://doi.org/10.1007/s12088-010-0033-x>
13. Bailey, B.A., Bae, H., Strem, M.D., Crozier, J., Thomas, S.E., Samuels, G.J., Holmes, K.A. (2008): Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. *Biological Control* 46(1): 24–35. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.01.003>
14. Baird, R.E., Wadl, P.A., Allen, T., McNeill, D., Wang, X.W., Moulton, J.K., Rinehart, T. A., Abbas, H.K., Shier, T., Trigiano, R.N. (2010): Variability of United States isolates of *Macrophomina phaseolina* based on simple sequence repeats and cross genus transferability to related genera within *Botryosphaeriaceae*. *Mycopathologia* 170(3): 169–180. <https://doi.org/10.1007/s11046-010-9308-3>
15. Baird, R.E., Watson, C.E., Scruggs, M. (2003): Relative longevity of *Macrophomina phaseolina* and associated mycobiota on residual soybean roots in soil. *Plant Disease* 87(5): 563–566. <https://doi.org/10.1094/pdis.2003.87.5.563>
16. Balaž, F., Balaž, J., Tošić, M., Stojšin, V., Bagi, F. (2010): Fitopatologija: bolesti ratarskih i povrtarskih biljaka. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
17. Bayraktar, H., Dolar, F.S., Tor, M. (2007): Determination of genetic diversity within *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr., the cause of ascochyta blight of chickpea in Turkey. *Journal of Plant Pathology* 89(3): 341–347.



18. Beas-Fernández, R., Santiago-de Santiago, A., Hernández-Delgado, S., Mayek-Perez, N. (2006): Characterization of Mexican and non-Mexican isolates of *Macrophomina phaseolina* based on morphological characteristics, pathogenicity on bean seeds and endoglucanase genes. *Journal of Plant Pathology* 88(1): 53–60.
19. Bell, D.K., Wells, H.D., Markham, C.R. (1982): In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology* 72: 379–382. <https://doi.org/10.1094/Phyto-72-379>
20. Benitez, T., Rincon, A.M., Limon, M.C., Condon, A.C. (2004): Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* 7(4): 249–260.
21. Bhargava, A., Fuentes, F.F. (2010): Mutational Dynamics of Microsatellites. *Molecular Biotechnology*, 44(3): 250-266. <https://doi.org/10.1007/s12033-009-9230-4>
22. Bojórquez-Armenta, Y.J., Mora-Romero, G.A., López-Meyer, M. (2021): Evaluation of *Bacillus* spp. isolates as potential biocontrol agents against charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* on common bean. *Journal of General Plant Pathology* 87: 377–386. <https://doi.org/10.1007/s10327-021-01019-4>
23. Carbone, I., Kohn, L.M. (1999): A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91(3): 553-556.
24. Castaldi, S., Petrillo, C., Donadio, G., Piaz, F.D., Cimmino, A., Masi, M., Evidente, A., Isticato, R. (2021): Plant Growth Promotion Function of *Bacillus* sp. Strains Isolated from Salt-Pan Rhizosphere and Their Biocontrol Potential against *Macrophomina phaseolina*. *International Journal of Molecular Sciences* 22: 3324. <https://doi.org/10.3390/ijms22073324>
25. Chakravarthi, B.K., Naravaneni, R. (2006): SSR marker based DNA fingerprinting and diversity study in rice (*Oryza sativa* L.). *African Journal of Biotechnology* 5(9): 684–688.
26. Chambers, G.K.; MacAvoy, E.S. (2000): Microsatellites: Consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 126(4): 455–476. [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(00\)00233-9](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(00)00233-9)
27. Chamorro, M., Miranda, L., Domínguez, P., Medina, J.J., Soria, C., Romero, F. (2015): Evaluation of biosolarization for the control of charcoal rot disease (*Macrophomina phaseolina*) in strawberry. *Crop Protection* 67, 279–286.

- <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.10.021>
28. Cohen, R., Omari, N., Porat, A., Edelstein, M. (2012): Management of *Macrophomina* wilt in melons using grafting or fungicide soil application: pathological, horticultural and economical aspects. *Crop Protection* 35: 58–63.  
<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.12.015>
29. Collins, D.J., Wyllie, T.D., Anderson, S.H. (1991): Biological activity of *Macrophomina phaseolina* in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 23: 495e496.
30. Crous, P.W., Slippers, B., Wingfield, M.J., Rheeder J., Marasas, W.F.O., Philips, A.J.L., Alves, A., Burgess, T., Barber, P. Groenewald, J. (2006): Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. *Studies in Mycology* 55(1): 235-253.  
<https://doi.org/10.3114/sim.55.1.235>
31. Csöndes, I., Cseh, A., Taller, J., Poczai, P. (2011): Genetic diversity and effect of temperature and pH on the growth of *Macrophomina phaseolina* isolates from sunflower fields in Hungary. *Molecular Biology Reports* 39(3): 3259–3269.  
<https://doi.org/10.1007/s11033-011-1094-6>
32. Das, I.K., Fakrudin, B., Arora, D.K. (2008): RAPD cluster analysis and chlorate sensitivity of some Indian isolates of *Macrophomina phaseolina* from sorghum and their relationships with pathogenicity. *Microbiological Research* 163(2): 215–224.  
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.05.006>
33. De, R.K. (2014): Search for new fungicides against Stem rot of jute (*Corchorus olitorius* L. and *C. capsularis* L.) caused by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *Journal of Mycopathological Research* 52(2): 217-225.
34. Debrauwere, H., Gendrel, C.G., Lechat, S., Dutreix, M. (1997): Differences and similarities between various tandem repeat sequences: Minisatellites and microsatellites. *Biochimie* 79(9-10): 577–586. [https://doi.org/10.1016/s0300-9084\(97\)82006-8](https://doi.org/10.1016/s0300-9084(97)82006-8)
35. Desai, S., Reddy, M.S., Kloepper, J.W. (2002): Comprehensive testing of biological agents. In *Biological control of crop diseases*, S.S. Gnanamnickam, ed (New York: Marcel Dekker), pp. 387-420.
36. Dhingra, O.D., Sinclair, J.B. (1978): *Biology and pathology of Macrophomina phaseolina*. Imprensa Universitaria, Universidade Federal de Vicosa.

37. Dhingra, O.D., Sinclair, J.B. (1995): Basic Plant Pathology Methods. CRC Press, Ins., Boca Raton, Florida, USA.
38. Dure, L., Galeano, R., Viana, T., Roque, C., Matias, R., Paggi, G., Correa, B., Brasil, M. (2022): *Bacillus* strains with potential for growth promotion and control of white mold in soybean. Research Square. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1256488/v1>
39. Eddington, L.V., Khew, K.L., Barren, G.I. (1971): Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. *Phytopathology* 61: 42-44.
40. Elad, Y., Chet, I., Katan, J. (1980): *Trichoderma harzianum*: A biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoclonia solani*. *Phytopathology* 70: 119-121.
41. El-Bendary, M.A., Hamed, H.A., Moharam, M.E. (2016): Potential of *Bacillus* isolates as bio-control agents against some fungal phytopathogens. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 5: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.02.001>
42. Ellegren, H. (2004): Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics* 5: 435–445. <https://doi.org/10.1038/nrg1348>
43. Engelkes, C.A., Nucló, R.L., Fravel, D.R. (1997): Effect of carbon, nitrogen and C:N ratio on growth, sporulation and bio-control efficacy of *Talaromyces flavus*. *Phytopathology* 87: 500-505.
44. FAOSTAT (2019): FAO statistical database. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
45. Fan, H., Chu, J.Y. (2007): A brief review of short tandem repeat mutation. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 5: 7-14.
46. Farr, D.F., Rossman, A.Y. (2021): Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. [https:// nt. ars- grin. gov/ funga ldata bases/](https://nt.ars-grin.gov/fungaldata bases/)Retrieved May 22, 2021.
47. Fira, Đ., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J., Stanković, S. (2018): Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology* 285: 44–55. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.044>
48. Francl, L.J., Wyllie, T.D., Rosenbrock, S.M. (1988): Influence of crop rotation on population density of *Macrophomina phaseolina* in soil infested with *Heterodera glycines*. *Plant Disease* 72: 760–764.

49. Gaetant, S.A., Fernandez, L., Madia, M. (2006): Occurrence of charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* on canola in Argentina. *Plant Disease* 90: 524. <https://doi.org/10.1094/PD-90-0524A>
50. Gajera, H.P., Bambharolia, R.P., Patel, S.V., Khatrani, T.J., Goalkiya, B.A. (2012): Antagonism of *Trichoderma* spp. against *Macrophomina phaseolina*: Evaluation of Coiling and Cell Wall Degrading Enzymatic Activities. *Journal of Plant Pathology and Microbiology* 3: 149. <https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000149>
51. Ghosh, T., Biswas, M.K., Guin, C., Roy, P. (2018): A review on characterization, therapeutic approaches and pathogenesis of *Macrophomina phaseolina*. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology* 19: 72-84.
52. Ghosh, T., Mukherji N., Basak, M. (1964): On the occurrence of a new species of *Orbilaria*. *Fr. Jute. Bull.* 27:134–141.
53. Gomes, E.V., Costa, M. do N., de Paula, R.G., Ricci de Azevedo, R., da Silva, F.L., Noronha, E.F., Jose Ulhoa, C., Neves Monteiro, V., Elena Cardoza, R., Gutierrez, S., Nascimento Silva, R. (2016): The Cerato-Platanin protein Epl-1 from *Trichoderma harzianum* is involved in mycoparasitism, plant resistance induction and self cell wall protection. *Scientific Reports* 5: 17998. <https://doi.org/10.1038/srep17998>
54. Gupta, G.K., Chauhan, G.S. (2005): Symptoms, Identification and Management of Soybean Diseases. Technical Bulletin 10. Indore, India, National Research Centre for Soybean.
55. Guzmán-Guzmán, P., Kumar, A., de los Santos-Villalobos, S., Parra-Cota, F.I., Orozco-Mosqueda, M.d.C., Fadji, A.E., Hyder, S., Babalola, O.O., Santoyo, G. (2023): *Trichoderma* Species: Our Best Fungal Allies in the Biocontrol of Plant Diseases. A Review. *Plants* 12(3): 432. <https://doi.org/10.3390/plants12030432>
56. Hai, F.I., Modin, O., Yamamoto, K., Fukushi, K., Nakajiam, F., Nghiem, L.D. (2012): Pesticide removal by a mixed culture of bacteria and white-rot fungi. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 43(3): 459-462.
57. Hajnal Jafari, T., Stamenov, D., Đurić, S. (2020): Proizvodnja i primena biopreparata. Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.

58. Harman, G.E. (2006): Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96(2): 190–194. <https://doi.org/10.1094/phyto-96-0190>
59. Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M. (2004): *Trichoderma* species — opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology* 2(1): 43–56. <https://doi.org/10.1038/nrmicro797>
60. Harman, G.E., Petzoldt, R., Comis, A., Chen, J. (2004): Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology* 94, 147e153. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.2>
61. Hartman, G.L., Sinclair, J.B., Rupe, J.C. (1999): *Compendium of Soybean Diseases*. The American Phytopathological Society, Edition IV, St. Paul, MN, USA, APS Press.
62. Hashem, A., Abd\_Allah, E. F., Alqarawi, A. A., Radhakrishnan, R., Kumar, A. (2017): Plant defense approach of *Bacillus subtilis* (BERA 71) against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid in mung bean. *Journal of Plant Interactions* 12(1): 390–401. <https://doi.org/10.1080/17429145.2017.1373871>
63. Hjeljord, L.G., Stensvand, A., Tronsmo, A. (2000): Effect of temperature and nutrient stress on the capacity of commercial *Trichoderma* products to control *Botrytis cinerea* and *Mucor piriformis* in greenhouse strawberries. *Biological Control* 19: 149-160. <https://doi.org/10.1006/bcon.2000.0859>
64. Howell, C.R. (2006): Understanding the mechanisms employed by *Trichoderma virens* to effect biological control of cotton diseases. *Phytopathology* 96: 178–180. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0178>
65. Howell, C.R. (2007): Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease* 87: 4-10. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.1.4>
66. Hulot, J.F, Hiller, N. (2021): *Exploring the Benefits of Biocontrol for Sustainable Agriculture—A Literature Review on Biocontrol in Light of the European Green Deal*; Institute for European Environmental Policy: Brussels, Belgium, 2021; pp. 1–42.

67. Hussain, T., Khan, A.A. (2020): Determining the antifungal activity and characterization of *Bacillus siamensis* AMU03 against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *Indian Phytopathology* 73: 507–516. <https://doi.org/10.1007/s42360-020-00239-6>
68. Indra, N., Subbiah, G. (2003): Management of blackgram root rot caused by *Macrophomina phaseolina* by antagonistic microorganisms. *Madras Agricultural Journal* 90 (7-9): 490-494.
69. Jacobsen, B.J. (2006): Root rot diseases of sugar beet. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*. Novi Sad, br. 110: 9-19.
70. Jamil, A., Musheer, N., Ashraf, S. (2021): Antagonistic potential of *Trichoderma harzianum* and *Azadirachta indica* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *capsici* for the management of chilli wilt. *Journal of Plant Diseases and Protection* 128: 161–172. <https://doi.org/10.1007/s41348-020-00383-1>
71. Jana, T., Sharma, T. R., Singh, N. K. (2005): SSR-based detection of genetic variability in the charcoal root rot pathogen *Macrophomina phaseolina*. *Mycological Research* 109(1): 81–86. <https://doi.org/10.1017/s0953756204001364>
72. Jordaan, E., Van der Waals, J. E., McLaren, N. W. (2019): Effect of irrigation on charcoal rot severity, yield loss and colonization of soybean and sunflower. *Crop Protection* 122: 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.04.026>
73. Karadimos, D.A., Karaoglanidis, G.S., Klonari, K. (2002): First Report of Charcoal Rot of Sugar Beet Caused by *Macrophomina phaseolina* in Greece. *Plant Disease* 86(9): 1051. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.9.1051D>
74. Kaur, S., Dhillon, G.S., Brar, S.K., Vallad, G.E., Chand, R., Chauhan, V.B. (2012): Emerging phytopathogen *Macrophomina phaseolina*: biology, economic importance and current diagnostic trends. *Critical Reviews in Microbiology* 38(2): 136–151. <https://doi.org/10.3109/1040841x.2011.640977>
75. Kendig, S.R., Rupe, J.C., Scott, H.D. (2000): Effect of irrigation and soil water stress on densities of *Macrophomina phaseolina* in soil and roots of two soybean cultivars. *Plant Disease* 84: 895–900. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.8.895>

76. Khaledi, N., Taheri, P. (2016): Biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* against soybean charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina*. *Journal of Plant Protection Research* 56(1): 21–31. <https://doi.org/10.1515/jppr-2016-0004>
77. Khan, M., Salman, M., Jan, S.A., Shinwari, Z.K. (2021): Biological control of fungal phytopathogens: A comprehensive review based on *Bacillus* species. *MOJ Biology and Medicine* 6: 90–92. <https://doi.org/10.15406/mojbm.2021.06.00137>
78. Khan, N., Martínez-Hidalgo, P., Ice, T.A., Maymon, M., Humm, E.A., Nejat, N. (2018): Antifungal activity of *Bacillus* species against *Fusarium* and analysis of the potential mechanisms used in biocontrol. *Frontiers in Microbiology* 9: 2363. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02363>
79. Khan, S.N. (2007): *Macrophomina phaseolina* as causal agent for charcoal rot of sunflower. *Mycopathologia* 5(2): 111–118.
80. Kifle, M.H., Yobo, K.S., Laing, M.D. (2017): Biocontrol of *Aspergillus flavus* in groundnut using *Trichoderma harzianum* strain kd. *Journal of Plant Diseases and Protection* 124: 51–56. <https://doi.org/10.1007/s41348-016-0066-4>
81. Köhl, J., Kolnaar, R., Ravensberg, W.J. (2019): Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: Relevance beyond efficacy. *Frontiers in Plant Science* 10: 845. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00845>
82. Kouadri, M., Zaim, S., Bekkar, A., (2021): First report of *Macrophomina pseudophaseolina* infecting *Lens culinaris*. *Australasian Plant Disease Notes* 16: 26. <https://doi.org/10.1007/s13314-021-00440-0>
83. Kumar, K., Amaresan, N., Bhagat, S., Madhuri, K., Srivastava, R.C. (2011): Isolation and Characterization of *Trichoderma* spp. for Antagonistic Activity Against Root Rot and Foliar Pathogens. *Indian Journal of Microbiology* 52(2): 137–144. <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0205-3>
84. Kumari, R., Shekhawat, K.S., Gupta, R., Khokhar, M.K. (2012): Integrated Management against Root-rot of Mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) incited by *Macrophomina phaseolina*. *Journal of Plant Pathology and Microbiology* 3: 5. <https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000136>



85. Lakhran, L., Ahir, R.R., Choudhary, M. Choudhary, S. (2018): Isolation, purification, identification and pathogenicity of *Macrophomina phaseolina* (Tassi) goid caused dry root rot of chickpea. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 7(3): 3314-3317.
86. Lakhran, L., Kumar, N., Ahir, R., Nehera, D., Bijarnia, P. (2022): Management strategies against stem and root rot of sesame incited by *Macrophomina phaseolina*. *The Pharma Innovation Journal* 11(2): 158-161.
87. Leroux, P., Gredt, M. (1972): Etude de l' action in vitro des fongicides, methode de l' incorporation ou milieu. *Laboratoire de Phytopharmacie-CNRA-Versailles*, 1-10.
88. Liu, J., Cui, X., Liu, Z., Guo, Z., Yu, Z., Yao, Q. (2019): The diversity and geographic distribution of cultivable *Bacillus*-like bacteria across black soils of northeast China. *Frontiers in Microbiology* 10: 1424. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01424>
89. Locher, P., Lorentz, G. (1991): Methods for monitoring the sensitivity of *Botrytis cinerea* to dicarboximide fungicides. In: *FRAC Methods for Monitoring Fungicide Resistance*. *EPPO Bulletin*, 21: 341-345.
90. Lokesh, R., Rakholiya, K. B., Thesiya, M.R. (2020): Evaluation of different fungicides against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) goid. causing dry root rot of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in vitro. *Artic. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 9(7): 1–11. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2020.907.001>
91. Ma, J., Hill, C. B., Hartman, G. L. (2010): Production of *Macrophomina phaseolina* Conidia by Multiple Soybean Isolates in Culture. *Plant Disease* 94(9): 1088–1092. <https://doi.org/10.1094/pdis-94-9-1088>
92. Machado, A.R., Pinho, D.B., Soares, D.J., Gomes, A.A.M., Pereira, O.L. (2019): Bayesian analyses of five gene regions reveal a new phylogenetic species of *Macrophomina* associated with charcoal rot on oilseed crops in Brazil. *European Journal of Plant Pathology* 153: 89–100. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1545-1>
93. Mahdizadeh, V., Safaie, N., Goltapeh, E. (2011): Diversity of *Macrophomina phaseolina* Based on Morphological and Genotypic Characteristics in Iran. *Plant Pathology* 27(2) : 128-137.
94. Marić, A. (1974): Bolesti šećerne repe, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.



95. Martínez-Salgado, S.J., Andrade-Hoyos, P., Parraguirre Lezama, C., Rivera-Tapia, A., Luna-Cruz, A., Romero-Arenas, O. (2021): Biological control of charcoal rot in peanut crop through strains of *Trichoderma* spp., in Puebla, Mexico. *Plants* 10: 2630. <https://doi.org/10.3390/plants10122630>
96. Marulanda, M.L, Lopez, A.M, Isaza, L., Lopez, P. (2014): Microsatellite isolation and characterization for *Colletotrichum* spp., causal agent of anthracnose in Andean blackberry. *Genetics and Molecular Research* 13(3): 7673-7685.
97. Mayek-Pérez, N., Garcia-Espinosa, R., López-Castañeda, C., Acosta-Gallegos, J.A., Simpson, J. (2002): Water relations, histopathology, and growth of commonbean (*Phaseolus vulgaris* L.) during pathogenesis of *Macrophomina phaseolina* under drought stress. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 60(4): 185-195. <https://doi.org/10.1006/pmpp.2001.0388>
98. Mendoza, J.L.H., Pérez, M.I.S., Prieto, J.M.G., Velásquez, J.D.Q., Olivares, J.G.G., Langarica, H.R.G. (2015): Antibiosis of *Trichoderma* spp strains native to northeastern Mexico against the pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. *Brazilian Journal of Microbiology* 46(4): 1093–1101. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246420120177>
99. Mihail, J.D, Taylor, S.J. (1995): Interpreting variability among isolates of *Macrophomina phaseolina* in pathogenicity, pycnidium production, and chlorate utilization. *Canadian Journal of Botany* 73: 1596–1603.
100. Mihajlović, M., Rekanović, E., Hrustić, J., Grahovac, M., Tanović, B. (2016): Mogućnost biološkog suzbijanja patogena iz zemljišta. *Biljni lekar* 44(3): 231-240.
101. Mukherjee, M., Mukherjee, P.K., Horwitz, B.A., Zachow, C., Berg, G., Zeilinger, S. (2012): *Trichoderma*-plant-pathogen interactions: advances in genetics of biological control. *Indian Journal of Microbiology* 52(4): 522-529. <https://doi.org/10.1007/s12088-012-0308-5>
102. Mukherjee, P.K., Horwitz, B.A., Kenerley, C.M. (2012): Secondary metabolism in *Trichoderma*—a genomic perspective. *Microbiology* 158(1): 35–45. <https://doi.org/10.1099/mic.0.053629-0>
103. Nawrocka, J, Malolepsza, U. (2013): Diversity in plant systemic resistance induced by *Trichoderma*. *Biological Control* 67: 149-156.

104. Nei, M. (1973): Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70: 3321–3323.
105. Olesen, J.E., Trnka, M., Kersebaum, K., Skjelvag, A., Seguin, B., Peltonen-Sainio, P., Rossi, F., Kozyra, J., Micale, F. (2011): Impacts and adaptation of European crop production systems to climate change. *European Journal of Agronomy* 34: 96–112. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2010.11.003>
106. Omar, M.R., Abd-Elsalam, K.A., Aly, A.A., El-Samawaty, A.M.A. Verreet, J.A. (2007): Diversity of *Macrophomina phaseolina* from cotton in Egypt: Analysis of pathogenicity, chlorate phenotypes and molecular characterization. *Journal of Plant Diseases and Protection* 114(5): 196-204.
107. Park, D. (1960): Antagonism - the background to soil fungi. *The Ecology of Soil Fungi*. pp. 148-159. Liverpool: University Press.
108. Parmar, H.V., Kapadiya, H.J., Bhaliya, C.M. (2017): Efficacy of different fungicides against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid causing castor root rot. *International Journal of Chemical Studies* 5: 1807–1809.
109. Pastrana, A.M., Basallote-Ureba, M.J., Aguado, A., Akdi, K., Capote, N. (2016): Biological control of strawberry soil-borne pathogens *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium solani*, using *Trichoderma asperellum* and *Bacillus* spp. *Phytopathologia Mediterranea* 55(1): 109–120. [https://doi.org/10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-16363](https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-16363)
110. Pawar, K., Mishra, S.P., Singh, R.K. (2015): Efficacy of bioagents and fungicides against seed borne fungi of soybean. *Annals Of Plant And Soil Research* 17: 77–81.
111. Pearson, C.A.S., Leslie, J.F., Schwenk, F.W. (1986): Variable chlorate resistance in *Macrophomina phaseolina* from corn, soybean and soil. *Phytopathology* 76: 646-649.
112. Pearson, C.A.S., Leslie, J.F., Schwenk, F.W. (1987): Host preference correlated with chlorate resistance in *Macrophomina phaseolina*. *Plant Disease* 71: 828-831.
113. Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S., Rafalski, A. (1996): The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* 2: 225–238.
114. Purkayastha, S., Kaur, B., Arora, P., Bisyer, I., Dilbaghi, N., Chaudhury A. (2008): Molecular Genotyping of *Macrophomina phaseolina* Isolates: Comparison of

- Microsatellite Primed PCR and Repetitive Element Sequence-based PCR. *Journal Phytopathology* 156: 372–381.
115. Purkayastha, S., Kaur, B., Dilbaghi, N., Chaudhury, A. (2006): Characterization of *Macrophomina phaseolina*, the charcoal rot pathogen of culuster bean, using conventional techniques and PCR-based molecular markers. *Plant Pathology* 55: 106-116. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2005.01317.x>
116. Rangel-Montoya, E.A., Delgado-Ramírez, C.S., Sepulveda, E., Hernández-Martínez, R. (2022): Biocontrol of *Macrophomina phaseolina* Using *Bacillus amyloliquefaciens* Strains in Cowpea (*Vigna unguiculata* L.). *Agronomy* 12: 676. <https://doi.org/10.3390/agronomy12030676>
117. Raut, I., Badea-Doni, M., Calin, M., Oancea, F., Vasilescu, G., Sesan, T.E., Jecu, L., (2014): Effect of volatile and non-volatile metabolites from *Trichoderma* spp. against important phytopathogens. *Revista De Chimie* 65(11): 1285–1288.
118. Rayatpanath, S., Nanagulyan, S. G., Alavi, S. V., Yasari, E. (2009): Phenotypic variations of isolates of *Macrophomina phaseolina* from different hosts in Northen Iran. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 3(3): 2908-2913.
119. Reznikov, S., Vellicce, G.R., González, V., de Lisi, V., Castagnaro, A.P., Ploper, L.D. (2016): Evaluation of chemical and biological seed treatments to control charcoal rot of soybean. *Journal of General Plant Pathology* 82: 273–280. <https://doi.org/10.1007/s10327-016-0669-4>
120. Reznikov, S., Vellicce, G., Mengistu, A., Silvia A., Gonzalez, V., De Lisi, V., Gabriela, G., Maria Lourdes, R., Pardo, E., Castagnaro, A., Ploper, L. (2018): Disease incidence of charcoal rot (*Macrophomina phaseolina*) on soybean in north-western Argentina and genetic characteristics of the pathogen. *Publications from USDA-ARS / UNL Faculty*. 2075.
121. Rodgers, P.B. (1989): Potential of biological control organisms as a source of antifungal compounds for agrochemical and pharmaceutical product development. *Pesticide science* 27 (2): 155-164.

122. Rothrock, C.S., Hargrove, W.L. (1988): Influence of legume cover crops and conservation tillage on soil population of selected fungal genera. *Canadian Journal of Microbiology* 34: 201–206.
123. RZS (2022): Republički zavod za statistiku Srbije. Biljna proizvodnja 2021. (Baza podataka). Preuzeto sa <https://data.stat.gov.rs/Home/Result/130102?languageCode=sr-Cyrl> (datum pristupa: 30.12.2022.)
124. Sabate, D.C., Petroselli, G., Erra-Balsells, R., Carina Audisio, M., Brandan, C.P. (2019): Beneficial effect of *Bacillus* sp. P12 on soil biological activities and pathogen control in common bean. *Biological Control* 141: 104–131. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104131>
125. Salik, N.K. (2007): *Macrophomina phaseolina* as causal agent for charcoal rot of sunflower. *Mycopath* 5 (2): 111–118.
126. Sánchez, S., Chamorro, M., Henríquez, J.L., Grez, J., Díaz, I., Santos, B.d.L. (2017): Genetic and biological characterization of *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. causing crown and root rot of strawberry. *Chilean Journal Of Agricultural Research* 77: 325-331. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392017000400325>
127. Sarr, M.P., Ndiaye, M., Groenewald, J.Z., Crous, P.W. (2014): Genetic diversity in *Macrophomina phaseolina*, the causal agent of charcoal rot. *Phytopathologia Mediterranea* 53(2): 250–268. [https://doi.org/10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-13736](https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-13736)
128. Shannon, C. Weaver, W. (1949): The mathematical theory of communication. University of Illinois Press, Urbana.
129. Short, G.E., Wyllie, T.D. (1978): A quantitative technique for measuring vegetative growth and sclerotial production by *Macrophomina phaseolina* in soybean tissues. *Proc Am Phytopathological Soc* 3:222.
130. Simonetti, E., Viso, N. P., Montecchia, M., Zilli, C., Balestrasse, K., Carmona, M. (2015): Evaluation of native bacteria and manganese phosphite for alternative control of charcoal root rot of soybean. *Microbiological Research* 180: 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.07.004>
131. Singh, N., Pandey, P., Dubey, R.C., Maheshwari, D.K. (2008): Biological control of root rot fungus *Macrophomina phaseolina* and growth enhancement of *Pinus roxburghii*

- (Sarg.) by rhizosphere competent *Bacillus subtilis* BN1. World Journal of Microbiology and Biotechnology 24(9): 1669-1679. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9680-z>
132. Somma, M. (2004): Extraction and purification of DNA. In: Querci M, Jermini M, Van den Eede G (eds) The analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms, Special Publication No. I.03.114, Session 4, European Commission DG-JRC, pp 13–17.
133. Sood, M., Kapoor, D., Kumar, V., Sheteiwy, M.S., Ramakrishnan, M., Landi, M., Araniti, F., Sharma, A. (2020): *Trichoderma*: The “secrets” of a multitasking biocontrol agent. Plants 9: 762. <https://doi.org/10.3390/plants9060762>
134. Spagnoletti, F. N., Cornero, M., Chiochio, V., Lavado, R. S., Roberts, I. N. (2020): Arbuscular mycorrhiza protects soybean plants against *Macrophomina phaseolina* even under nitrogen fertilization. European Journal of Plant Pathology 156: 839–849. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-01934-w>
135. Sreedevi, B., Charitha Devi, M., Saigopal, D.V.R. (2011): Isolation and screening of effective *Trichoderma* spp. against the root rot pathogen *Macrophomina phaseolina*. Journal of Agricultural Science and Technology 7(3): 623-635.
136. Sridharan, A.P., Thankappan, S., G., Karthikeyan., Uthandi, S. (2020): Comprehensive profiling of the VOCs of *Trichoderma longibrachiatum* EF5 while interacting with *Sclerotium rolfsii* and *Macrophomina phaseolina*. Microbiological Research: 126436. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126436>
137. Stojšin, V. (2003): Etiologija bolesti korena šećerne repe u uslovima različite mineralne ishrane. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet.
138. Stojšin, V., Budakov, D., Bagi, F., Đuragin, N., Marinkov, R. (2012): Morphological, cultural and pathogenic characteristics of *Macrophomina phaseolina* isolates from sugar beet. Current Trends in Plant Protection, Belgrade, 25-28 September, 251-256.
139. Stojšin, V., Budakov, D., Bagi, F., Marinković, B., Marinkov, R., Janićević, M. (2011): Influence of locality on type of rot and mycopopulation of sugar beet root in 2010. Plant doctor 39(1): 54-60.

140. Stojšin, V., Marić, A., Marinković, B. (1999): Effect of drought, high temperatures and mineral nutrition on the occurrence of charcoal root rot of sugar beet (*Macrophomina phaseolina* Tassi Goidanich). Proceeding of the International Symposium for Biological Control of Noxious Animals and Pests-East Palearctic Section, Vrnjačka Banja, Yugoslavia, September 25th, 195-203.
141. Stojšin, V., Stankov, A., Medić, J., Budakov, D., Jaćimović, G., Ćirić, M., Ćurčić, Ž. (2018): Influence of NPK mineral nutrition and cultivar on sugar beet root rot. 76th IIRB Congress, Deauville.
142. Su, G., Suh, S.O., Schneider, R.W., Russin, J.S. (2001): Host specialization in the charcoal rot fungus, *Macrophomina phaseolina*. *Phytopathology* 91: 120–126.
143. Swamy, C., Naik, M.K., Amaresh, Y.S., Jayalakshmi, S.K. (2018): Evaluation of Fungicides and Bio-Agents under in vitro Condition against *Macrophomina phaseolina* causing stem canker of Pigeonpea. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 7: 811–819. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.701.099>
144. Szabo, L.J. (2007): Development of simple sequence repeat markers for the plant pathogenic rust fungus, *Puccinia graminis*. *Molecular Ecology Notes* 7: 92–94.
145. Taliei, T., Safaei, N., Aghajani, M.A. (2013): Survival of *Macrophomina phaseolina* and associated mycobiota on soybean residuals and the effect of *Trichoderma harzianum* on their population dynamics. *Journal of Applied Researches in Plant Protection* 1, 1-13.
146. Tomah, A.A., Abd Alamer, I.S., Li, B., Zhang, J.Z. (2020): A new species of *Trichoderma* and gliotoxin role: a new observation in enhancing biocontrol potential of *T. virens* against *Phytophthora capsici* on chili pepper. *Biological Control* 145: 104261. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104261>
147. Tonin, R.F.B., Avozani, A., Durante Danelli, A.L., Reis, E.M., Zoldan, S.M., Garcés-Fiallos, F.R. (2013): In vitro mycelial sensitivity of *Macrophomina phaseolina* to fungicides *Pesquisa Agropecuária Tropical* 43: 460–466. <https://doi.org/10.1590/S1983-40632013000400014>
148. Torres, M.J., Brandan, C.P., Petroselli, G., Erra-Balsells, R., Audisio, M.C. (2016): Antagonistic effects of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* and *B. amyloliquefaciens* against

- Macrophomina phaseolina*: SEM study of fungal changes and UV-MALDI-TOF MS analysis of their bioactive compounds. *Microbiological Research* 182: 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.09.005>
149. Torres, M.J., Pérez-Brandan, C., Sabaté, D.C., Petroselli, G., Erra-Balsells, R., Audisio, M.C. (2016): Biological activity of the lipopeptideproducing *Bacillus amyloliquefaciens* PGPBacCA1 on common bean *Phaseolus vulgaris* L. pathogens. *Biological Control* 105: 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.12.001>
150. Townsend, G.K., Heuberger, J.W. (1943): Methods for Estimating Losses Caused by Diseases in Fungicide Experiments. *Plant Disease Report* 27(17): 340-343.
151. Vasebi, Y., Safaie, N., Alizadeh, A. (2013): Biological control of soybean charcoal root rot disease using bacterial and fungal antagonists in vitro and greenhouse condition. *Journal of Crop Protection* 2: 139–150.
152. Vey, A., Hoagland, R.E., Butt, T.M. (2001): Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: Butt TM, Jackson C, Magan N (eds) *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential*, CAB International, Bristol, UK, pp 311-346.
153. Villarreal-Delgado, M.F., Villa-Rodríguez, E.D., Cira-Chávez, L.A., Estrada-Alvarado, M.I., Parra-Cota, F.I., De los Santos-Villalobos, S. (2018): The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. *Revista mexicana de fitopatología* 36: 95–130. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>
154. Vinale, F., D Ambrosio, G., Abadi, K., Scala, F., Marra, R., Turra, D., Sheridan, W., Lorito, M. (2004): Application of *Trichoderma harzianum* (T22) and *Trichoderma atroviride* (P1) as plant growth promoters, and their compatibility with copper oxychloride. *Journal of Zhejiang University-Science* 30: 2-8.
155. Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Woo, S.L., Lorito, M. (2008): *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(1): 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.07.002>
156. Waseer, N.A., Pathan, M.A., Wondiar, M., Solangi, G.R. (1990): Studies on charcoal rot of soybean caused by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *Journal of Phytopathology* 2: 22–30.



157. White, T.J., Burns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990): Amplification and sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) PCR protocols. A guide to methods and applications. San Diego, Calif. Academic Press, pp. 315–322.
158. Winton, L.M., Krohn, L., Leiner, R.H. (2007): Microsatellite markers for *Sclerotinia subarctica* nom. prov., a new vegetable pathogen of the High North. *Molecular Ecology Notes* 7: 1077–1079.
159. Wrather, J.A., Anderson, T.R., Arsyad, D.M., Tan, Y., Ploper, L.D., Porta-Puglia, A., Ram, H.H., Yorinori, J.T. (2001): Soybean disease loss estimates for the top 10 soybean producing countries in 1998. *Canadian Journal of Plant Pathology* 23: 115–121.
160. Wrather, J.A., Koenning, S.R. (2006): Estimates of disease effects on soybean yields in the United States 2003 to 2005. *Journal of Nematology* 38:173–180.
161. Wu, Q., Sun, R., Ni, M., Yu, J., Li, Y., Yu, C., Dou, K., Ren, J., Chen, J. (2017): Identification of a novel fungus, *Trichoderma asperellum* GDFS1009, and comprehensive evaluation of its biocontrol efficacy. *PLOS ONE* 12(6): e0179957. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179957>
162. Yamamoto, T., Timura, T., Sawamura, Y., Kotobuki, K., Ban, Y., Hayashi, T., Matsuta, N. (2001): SSRs isolated from apple can identify polymorphism and genetic diversity in pear. *Theoretical and Applied Genetics* 102: 865–870.
163. Yang, X.B., Navi, S.S. (2005): First report of charcoal root rot epidemics caused by *Macrophomina phaseolina* in soybean in Iowa. *Plant Disease* 89: 526.
164. Zeilinger, S., Gruber, S., Bansal, R., Mukherjee, P.K. (2016): Secondary metabolism in *Trichoderma*. *Chemistry meets genomics Fungal Biology Reviews* 30: 74–90. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.05.001>
165. Zin, N.A., Badaluddin, N.A. (2020): Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications. *Annals of Agricultural Sciences* 65(2): 168–178. <https://doi.org/10.1016/j.aoas.2020.09.003>



## 10. PRILOZI

### Prilog 1

Hranljive podloge

\* Krompir - dekstrozni agar (KDA)

- 200 g krompira,
- 20 g dekstroze,
- 17 g agara,
- 1 l destilovane vode.

\* Vodeni agar (VA)

- 17 g agara,
- 1 l destilovane vode.

\* Minimalna podloga obogaćena  $\text{KClO}_3$  (MIN +  $\text{KClO}_3$ , Pearson i sar., 1986)

- 20 g agara,
- 1,6 g asparagina,
- 15 g kalijum hlorata,
- 30 g saharoze,
- 2 g  $\text{NaNO}_3$ ,
- 1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,
- 0,2 ml rastvora mikroelemenata (95 ml destilovane vode, 10 g limunske kiseline, 10 g  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 2 g  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_4 \times 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ , 100 mg  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , 100 mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 100 mg  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  i 1 ml hloroforma).

\* Kikiriki ekstrakt agar (KEA, Ma i sar., 2010)

- 20 g kikiriki putera,
- 100 ml etra,

- 500 ml destilovane vode,
- 7,5 g Bacto agar.

\* Selektivna podloga za izolaciju *Trichoderma* spp. (Elad i sar., 1980)

- 0,2 g MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O,
- 0,9 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,
- 0,15 g KCl,
- 1,0 g NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>,
- 3,0 g glukoze,
- 20 g agara,
- 0,15 g rosebengal,
- 0,25 g hloramfenikola,
- 1000 ml destilovane vode, pH 6,5.

## Prilog 2

Spisak ITS sekvenci *M. phaseolina* i *T. harzianum*

1. Nagl, N., Stankov, A., Stojsin, V., Budakov, D., Grahovac, M., Bagi, F (2020):  
*Macrophomina phaseolina* isolate 1-11 internal transcribed spacer 1, partial sequence;  
5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial  
sequence. GenBank: MT039641.1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT039641.1>
2. Nagl, N., Stankov, A., Stojsin, V., Budakov, D., Grahovac, M., Bagi, F (2020):  
*Macrophomina phaseolina* isolate 3-09 internal transcribed spacer 1, partial sequence;  
5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial  
sequence. GenBank: MT039642.1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT039642.1>
3. Nagl, N., Stankov, A., Stojsin, V., Budakov, D., Grahovac, M., Bagi, F (2020):  
*Macrophomina phaseolina* isolate 5-09 internal transcribed spacer 1, partial sequence;  
5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial  
sequence. GenBank: MT039643.1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT039643.1>
4. Nagl, N., Stankov, A., Stojsin, V., Budakov, D., Grahovac, M., Bagi, F (2020):  
*Macrophomina phaseolina* isolate 23-11 internal transcribed spacer 1, partial sequence;

- 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: MT039644.1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT039644.1>
5. Nagl, N., Stankov, A., Stojsin, V., Budakov, D., Grahovac, M., Bagi, F (2020): *Macrophomina phaseolina* isolate 5-12 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: MT039645.1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT039645.1>
  6. Nagl, N., Stankov, A., Stojsin, V., Budakov, D., Grahovac, M., Bagi, F (2020): *Macrophomina phaseolina* isolate 9-10 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: MT039646.1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT039646.1>
  7. Nagl, N., Stankov, A., Stojsin, V., Budakov, D., Grahovac, M., Bagi, F (2020): *Macrophomina phaseolina* isolate 10-09 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: MT039647.1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT039647.1>
  8. Nagl, N., Stankov, A., Stojsin, V., Budakov, D., Grahovac, M., Bagi, F (2020): *Macrophomina phaseolina* isolate 38-12 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: MT039648.1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT039648.1>
  9. Nagl, N., Stankov, A., Stojsin, V., Budakov, D., Grahovac, M., Bagi, F (2020): *Macrophomina phaseolina* isolate 34-12 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: MT039649.1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT039649.1>
  10. Nagl, N., Stankov, A., Stojsin, V., Budakov, D., Grahovac, M., Bagi, F (2020): *Macrophomina phaseolina* isolate 15-11 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: MT039650.1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT039650.1>
  11. Nagl, N., Stankov, A., Stojsin, V., Budakov, D., Grahovac, M., Bagi, F (2020): *Macrophomina phaseolina* isolate 30-12 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: MT039651.1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT039651.1>
  12. Nagl, N., Stankov, A., Stojsin, V., Budakov, D., Grahovac, M., Bagi, F (2020): *Macrophomina phaseolina* isolate 45-12 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: MT039652.1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT039652.1>

13. Nagl, N., Stankov, A., Stojsin, V., Budakov, D., Grahovac, M., Bagi, F (2020): *Macrophomina phaseolina* isolate 39(2)-09 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: MT039653.1  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT039653.1>
14. Nagl, N., Stankov, A., Stojsin, V., Budakov, D., Grahovac, M., Bagi, F (2020): *Macrophomina phaseolina* isolate 45(5)-09 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: MT039654.1  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT039654.1>
15. Nagl, N., Stankov, A., Stojsin, V., Budakov, D., Grahovac, M., Bagi, F (2020): *Macrophomina phaseolina* isolate 45(4)-09 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: MT039655.1  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT039655.1>
16. Nagl, N., Stankov, A., Stojsin, V., Budakov, D., Grahovac, M., Bagi, F (2020): *Macrophomina phaseolina* isolate 62(5)-09 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: MT039656.1  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT039656.1>
17. Nagl, N., Stankov, A., Stojsin, V., Budakov, D., Grahovac, M., Bagi, F (2020): *Macrophomina phaseolina* isolate 55(3)-09 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: MT039657.1  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT039657.1>
18. Nagl, N., Stankov, A., Stojsin, V., Budakov, D., Grahovac, M., Bagi, F (2020): *Macrophomina phaseolina* isolate 62(4)-09 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: MT039658.1  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT039658.1>
19. Nagl, N., Stankov, A., Stojsin, V., Budakov, D., Grahovac, M., Bagi, F (2020): *Macrophomina phaseolina* isolate 24-10 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: MT039659.1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT039659.1>

20. Nagl, N., Stankov, A., Stojsin, V., Budakov, D., Grahovac, M., Bagi, F (2020):  
*Macrophomina phaseolina* isolate 65(2)-09 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: MT039660.1  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT039660.1>
21. Nagl, N., Stankov, A., Stojsin, V., Budakov, D., Grahovac, M., Bagi, F (2020):  
*Macrophomina phaseolina* isolate 85-12 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: MT039661.1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT039661.1>
22. Nagl, N., Stankov, A., Stojsin, V., Budakov, D., Grahovac, M., Bagi, F (2020):  
*Macrophomina phaseolina* isolate 97-12 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: MT039662.1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT039662.1>
23. Nagl, N., Stankov, A., Stojsin, V., Budakov, D., Grahovac, M., Bagi, F (2020):  
*Macrophomina phaseolina* isolate Mphku internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: MT039663.1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT039663.1>
24. Nagl, N., Stankov, A., Stojsin, V., Budakov, D., Grahovac, M., Bagi, F (2020):  
*Macrophomina phaseolina* isolate 11-15 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: MT039664.1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT039664.1>
25. Nagl, N., Stankov, A., Stojsin, V., Budakov, D., Grahovac, M., Bagi, F (2020):  
*Macrophomina phaseolina* isolate 36-12 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: MT039665.1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT039665.1>
26. Nagl, N., Stankov, A., Stojsin, V., Budakov, D., Grahovac, M., Bagi, F (2020):  
*Macrophomina phaseolina* isolate 40-12 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: MT039666.1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT039666.1>
27. Nagl, N., Stankov, A., Stojsin, V., Budakov, D., Grahovac, M., Bagi, F (2020):  
*Macrophomina phaseolina* isolate 51-12 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: MT039667.1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT039667.1>

28. Nagl, N., Stankov, A., Stojsin, V., Budakov, D., Grahovac, M., Bagi, F (2020):  
*Macrophomina phaseolina* isolate 52-13 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: MT039668.1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT039668.1>
29. Nagl, N., Stankov, A., Stojsin, V., Budakov, D., Grahovac, M., Bagi, F (2020):  
*Macrophomina phaseolina* isolate 75-13 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: MT039669.1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT039669.1>
30. Nagl, N., Stankov, A., Stojsin, V., Budakov, D., Grahovac, M., Bagi, F (2020):  
*Macrophomina phaseolina* isolate 80-13 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: MT039670.1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT039670.1>
31. Nagl, N., Stankov, A., Stojsin, V., Budakov, D., Grahovac, M., Bagi, F (2020):  
*Macrophomina phaseolina* isolate 84-13 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: MT039671.1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT039671.1>
32. Nagl, N., Stankov, A., Stojsin, V., Budakov, D., Grahovac, M., Bagi, F (2020):  
*Macrophomina phaseolina* isolate 95-13 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: MT039672.1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT039672.1>
33. Nagl, N., Stankov, A., Stojsin, V., Budakov, D., Grahovac, M., Bagi, F (2020):  
*Macrophomina phaseolina* isolate Mphsu internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: MT039673.1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT039673.1>
34. Nagl, N., Stankov, A., Stojsin, V., Budakov, D., Grahovac, M., Bagi, F (2020):  
*Macrophomina phaseolina* isolate 32-13 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: MT039674.1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT039674.1>
35. Nagl, N., Stankov, A., Stojsin, V., Budakov, D., Grahovac, M., Bagi, F (2020):  
*Macrophomina phaseolina* isolate Mphso internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: MT039675.1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT039675.1>

36. Nagl, N., Stankov, A., Stojsin, V., Budakov, D., Grahovac, M. (2020): *Trichoderma harzianum* isolate T8 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: MT078700.1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT078700.1>
37. Nagl, N., Stankov, A., Stojsin, V., Budakov, D., Grahovac, M. (2020): *Trichoderma harzianum* isolate T9 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: MT078701.1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT078701.1>
38. Nagl, N., Stankov, A., Stojsin, V., Budakov, D., Grahovac, M. (2020): *Trichoderma harzianum* isolate T8 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: MT078702.1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT078702.1>
39. Nagl, N., Stankov, A., Stojsin, V., Budakov, D., Grahovac, M. (2020): *Trichoderma harzianum* isolate T11 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: MT078703.1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT078703.1>
40. Nagl, N., Stankov, A., Stojsin, V., Budakov, D., Grahovac, M. (2020): *Trichoderma harzianum* isolate T12 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: MT078704.1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT078704.1>
41. Nagl, N., Stankov, A., Stojsin, V., Budakov, D., Grahovac, M. (2020): *Trichoderma harzianum* isolate T13 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence. GenBank: MT078705.1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT078705.1>

Spisak objavljenih TEF- $\alpha$  sekvenci *T. harzianum*

42. Nagl, N., Stankov, A., Stojsin, V., Budakov, D., Grahovac, M. (2020): *Trichoderma harzianum* isolate T4 translation elongation factor 1 alpha (tef) gene, partial cds. GenBank: MT090760.1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT090760.1>
43. Nagl, N., Stankov, A., Stojsin, V., Budakov, D., Grahovac, M. (2020): *Trichoderma harzianum* isolate T5 translation elongation factor 1 alpha (tef) gene, partial cds. GenBank: MT090761.1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT090761.1>

## Prilog 3

Rezultati BLAST analize ispitivanih ITS sekvenci izolata *M. phaseolina*

> *Macrophomina phaseolina* izolat ŠR1/11

TTACCGAGTTGATTCGGGCTCCGTCCCGATCCTCCCACCCTTTGTATACCTACCTCTG  
 TTGCTTTGGCGGGCCGCGGTCTTCCGCGGCCGCCCGGATTTTGGGGGGTGGCTAG  
 TGCCCGCCAGAGGACTATCAAACCTCCAGTCAGGAAACGTTGCAGTCTGAAAAAAA  
 TATTAATAAACTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGA  
 ACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATC  
 TTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT  
 TTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCACCGTCCTTTGCGGGCGCGCCTCAA  
 GACCTCGGCGGTGGCGTCTTGCCTCAAGCGTAGTAGAATACACCTCGCTTCGGAGCG  
 TAAGGCGTCGCCCGCCGGACGAACCTTCTGAACTTTTCTCAAGGTT

GenBank brojevi sa kojima je poklapanje sekvence 100%	<a href="#">KU578313.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP3b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KU578312.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP2b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KU578311.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP1b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

> *Macrophomina phaseolina* izolat ŠR3/09

ATCATTACCGAGTTGATTCGGGCTCCGTCCCGATCCTCCCACCCTTTGTATACCTACC  
 TCTGTTGCTTTGGCGGGCCGCGGTCTTCCGCGGCCGCCCGGATTTTGGGGGGTGG  
 CTAGTGCCCGCCAGAGGACTATCAAACCTCCAGTCAGGAAACGTTGCAGTCTGAAAA  
 AAAATATTAATAAACTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATG  
 AAGAACGCACCGAAAAGCGATAAGCAACGTGAACTGCAGAATTCAAAGAAGCGTC  
 GAATCTTTGTA CTCTCTTTGCGCCCCTTGGTACTCCGGGTGCTATTACTGTACGAGCG  
 TCATTACAACCTCCTTGCTCTGCATGCTATTGTTACCTCCCTTTGTAACCGCACTAA  
 AAAGCACCTCTGCAAGGCGGGTGATCCATCTGTTTAACCACCACCAC

GenBank brojevi sa kojima je poklapanje sekvence 91.73%	<a href="#">KY680345.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain CCTU1656 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene
	<a href="#">KY680344.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain CCTU1689 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene
	<a href="#">KU578313.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP3b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

> *Macrophomina phaseolina* izolat ŠR5/09

CATTACCGAGTTGATTCGGGCTCCGTCCCGATCCTCCCACCCTTTGTATACCTACCTC  
 TGTTGCTTTGGCGGGCCGCGGTCTTCCGCGGCCGCCCGGATTTTGGGGGGTGGCT  
 AGTGCCCGCCAGAGGACTATCAAACCTCCAGTCAGTAAACGTTGCAGTCTGAAAAA



ATATTAATAAACTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAG  
 AACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAAT  
 CTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCA  
 TTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTATTGTGCACCGTCCTTTGCGGGCGCGCCTCAA  
 GACCTCGGCGGTGGCGTCTTGCTCAAGCTTACTAGAATACACCTCGTTTCGGAGC

GenBank brojevi sa kojima je poklapanje sekvence 99.12%	<a href="#">MK614772.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain CFE-13 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">MK614771.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain CFE-9 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">MK573366.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> isolate MPHOPVA16 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

> *Macrophomina phaseolina* izolat ŠR23/11

CGAGTTGATTCGGGCTCCGTCCCGATCCTCCCACCCTTTGTATACCTACCTCTGTTGC  
 TTTGGCGGGCCGCGGTCTTCCGCGGCCGCCCCCGATTTTGGGGGGTGGCTAGTGCC  
 CGCCAGAGGACTATCAAACCTCCAGTCAGGAAACGTTGCAGTCTGAAAAAAAAATATT  
 AAATAAACTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGC  
 ACCGAAATGCTATAAGTAATGCGAATTGCAGAATTCATAGAAGCATCACATCTTTGA  
 ACCACATTGCGCCCCTTGTGTTCAGGGGGGTTCATGCATGCTCACGCGTCACTAAA  
 TACAT

GenBank brojevi sa kojima je poklapanje sekvence 94.96%	<a href="#">KY680345.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain CCTU1656 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KY680344.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain CCTU1689 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KU578313.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP3b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

> *Macrophomina phaseolina* izolat ŠR5/12

CCGAGTTGATTCGGGCTCCGTCCCGATCCTCCCACCCTTTGTATACCTACCTCTGTTG  
 CTTTGGCGGGCCGCGGTCTTCCGCGGCCGCCCCCGATTTTGGGGGGTGGCTAGTGC  
 CCGCCAGAGGACTATCAAACCTCCAGTCAGGAAACGTTGCAGTCTGAAAAAAAAATAT  
 TAAATAAACTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACC  
 CAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTG  
 AACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCA  
 ACCCTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCACCGTCCTTTGCGGGCGCGCCTCAAAGACC  
 TCGGCGGTGGCGTCTTGCTCAAGCGTAGTAGAATACACCTCGCTTCGGAGCGTAAG  
 GCGTCGCCC GCCGACGAACCTTCTGAACTTTTCTCAAGGTTGACCTCGGATCAGGT  
 AGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATAT

GenBank brojevi sa kojima je poklapanje sekvence 100%	<a href="#">KU578313.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP3b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KU578312.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP2b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KU578311.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP1b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

> *Macrophomina phaseolina* izolat ŠR9/10

ATTACCGAGTTGATTCGGGCTCCGTCCCGATCCTCCCACCCTTTGTATACCTACCTCT  
 GTTGCTTTGGCGGGCCGCGGTCTTCCGCGGCCGCCCGGATTTTGGGGGGTGGCTA  
 GTGCCCGCCAGAGGACTATCAAACCTCCAGTCAGGAAACGTTGCAGTCTGAAAAAAA  
 ATATTAATAAACTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAG  
 AACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAAT  
 CTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCA  
 TTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCACCGTCCTTTGCGGGCGCGCCTCAA  
 AGACCTCGGCGGTGGCGTCTTGCCTCAAGCGTAGTAGAATACACCTCGCTTCGGAGC  
 GTAAGGCGTCGCCCCGCGGACGAACCTTCTGAACTTTTCTCAAGGTTGACCTCGGAT  
 CAGGTAGGGA

GenBank brojevi sa kojima je poklapanje sekvence 100%	<a href="#">KU578313.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP3b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KU578312.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP2b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KU578311.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP1b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

> *Macrophomina phaseolina* izolat ŠR10/09

CGAGTTGATTCGGGCTCCGTCCCGATCCTCCCACCCTTTGTATACCTACCTCTGTGTC  
 TTTGGCGGGCCGCGGTCTTCCGCGGCCGCCCGGATTTTGGGGGGTGGCTAGTGCC  
 CGCCAGAGGACTATCAAACCTCCAGTCAGGAAACGTTGCAGTCTGAAAAAAAATATT  
 AAATAAACTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGC  
 AGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGA  
 ACGCACATTGCCCCCTTGTATTCCGGGGGTCTTGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAAC  
 CCTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCACCGTCCTTTGCGGGCCGCGCCTCAAAGACCTC  
 ATCGGTGGCGTTCGTGCCTCATGCGTAACAGAATCCACCTATTTTT

GenBank brojevi sa kojima je poklapanje sekvence 100%	<a href="#">KY680345.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain CCTU1656 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KY680344.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain CCTU1689 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

	<a href="#">KU578313.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP3b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
--	----------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

> *Macrophomina phaseolina* izolat ŠR14/09

CCGAGTTGATTCGGGCTCCGTCCCGATCCTCCCACCCTTTGTATACCTACCTCTGTTG  
 CTTTGGCGGGCCGCGGTCTTCCGCGGGCCGCCCCCGATTTTGGGGGGTGGCTAGTGC  
 CCGCCAGAGGACTATCAAACCTCCAGTCAGGAAACGTTGCAGTCTGAAAAAAATAT  
 TAAATAAGCTCCTATATAATAAATAAGATGCCGCTATAAGTTAAGAAAAAATAGC  
 GCGCCCTACTAACTTACTTCTTGAGCTACGCATCCTGAAAAAAGGAGGTAAATTATT  
 CCACCGGGTACTAATCCTTCTTCTACTAAACCTCTTATTAATAAATAAAGGAAAGGAA  
 AGGGGTTAAAATTCAAATTTTAAATTAATTAACATGGAAATGCTTTAATCAGGCT  
 TCCCAATTTAAAAGGAAACAGATCATTTACCAAACCCCAATTAACATAGGCTTAAC  
 TATTAATAAATAATTATTATCAAGGG

GenBank brojevi sa kojima je poklapanje sekvence 100%	<a href="#">KY680345.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain CCTU1656 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KY680344.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain CCTU1689 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KU578313.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP3b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

> *Macrophomina phaseolina* izolat ŠR38/12

CATTACCGAGTTGATTCGGGCTCCGTCCCGATCCTCCCACCCTTTGTATACCTACCTC  
 TGTTGCTTTGGCGGGCCGCGGTCTTCCGCGGGCCGCCCCCGATTTTGGGGGGTGGCT  
 AGTGCCCGCCAGAGGACTATCAAACCTCCAGTCAGGAAACGTTGCAGTCTGAAAAAA  
 AATATTAATAAACTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAA  
 GAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAA  
 TCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTC  
 ATTTACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCACCGTCCTTTGCGGGCCCGCCTTAA  
 AGA

GenBank brojevi sa kojima je poklapanje sekvence 99%	<a href="#">KY680345.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain CCTU1656 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KY680344.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain CCTU1689 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KU578313.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP3b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

> *Macrophomina phaseolina* izolat ŠR34/12

TACCGAGTTGATTTCGGGCTCCGTCCCGATCCTCCCACCCTTTGTATACCTACCTCTGT  
 TGCTTTGGCGGGCCGCGGTCTTCCGCGGCCGCCCCCGATTTTGGGGGGTGGCTAGT  
 GCCCGCCAGAGGACTATCAAACCTCCAGTCAGGAAACGTTGCAGTCTGAAAAAAAT  
 ATTAATAAACTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAA  
 CGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTT  
 TGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTT  
 CAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCACCGTCCTTTGCGGGGCGCGCCTCAAAGA  
 CCTCGGCGGTGGCGTCTTGCCCTCAAGCGTAGTAGAATACACCTCGCTTCGGAGCGTA  
 AGGCGTCGCCCCGCGGACGAACCTTCTGAACTTTTCTCAAGGTTGACCTCGGATCAG  
 GTAGGGAT

GenBank brojevi sa kojima je poklapanje sekvence 100%	<a href="#">KU578313.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP3b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KU578312.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP2b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KU578311.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP1b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

> *Macrophomina phaseolina* izolat ŠR15/11

CATCTACCGAGTTGATTTCGGGCTCCGTCCCGATCCTCCCACCCTTTGTATACCTACCT  
 CTGTTGCTTTGGCGGGCCGCGGTCTTCCGCGGCCGCCCCCGATTTTGGGGGGTGGC  
 TAGTGCCCGCCAGAGGACTATCAAACCTCCAGTCAGGAAACGTTGCAGTCTGAAAA  
 AAATATTAATAAACTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGA  
 AGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGA  
 ATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT  
 CATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCACCGTCCTTTGCGGGGCGCGCCTC  
 AAAGACCTCGGCGGTGGCGTCTTGCCCTCAAGCGTAGTAGAATACACCTCGCTTCCGA  
 CCGTAAGGAGTCACCCGGCAGACGAACCTTCTGACCTTTTCTCAATGTTGACCT

GenBank brojevi sa kojima je poklapanje sekvence 98.23%	<a href="#">KU578313.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP3b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KU578312.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP2b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KU578311.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP1b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

> *Macrophomina phaseolina* izolat ŠR30/12

TTACCGAGTTGATTTCGGGCTCCGTCCCGATCCTCCCACCCTTTGTATACCTACCTCTG  
 TTGCTTTGGCGGGCCGCGGTCTTCCGCGGCCGCCCCCGATTTTGGGGGGTGGCTAG  
 TGCCCGCCAGAGGACTATCAAACCTCCAGTCAGGAAACGTTGCAGTCTGAAAAAAA  
 TATTAATAAACTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGA  
 ACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATC

TTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT  
 TTCAACCTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCACCGTCCTTTGCGGGGCGCGCCTCAA  
 GACCTCGGCGGTGGCGTCTTGCCTCAAGCGTAGTAGAATACACCTCGCTTCGGAGCG  
 TAAGGCGTCGCCC GCCGGACGAACCTTCTGAACTTTTCTCAAGGTTGACCTCGGATC  
 AGGTAGGGATACCCGCTGAACTTA

GenBank brojevi sa kojima je poklapanje sekvence 100%	<a href="#">KU578313.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP3b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KU578312.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP2b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KU578311.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP1b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

> *Macrophomina phaseolina* izolat ŠR45/12

TCATTACCGAGTTGATTCGGGCTCCGTCCCGATCCTCCCACCCTTTGTATACCTACCT  
 CTGTTGCTTTGGCGGGCCGCGGTCTTCCGCGGCCGCCCCCGATTTTGGGGGGTGGC  
 TAGTGCCCGCCAGAGGACTATCAAACCTCCAGTCAGGAAACGTTGCAGTCTGAAAA  
 AAATATTAATAAACTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGA  
 AGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGA  
 ATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT  
 CATTTC AACCTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCACCGTCCTTTGCGGGGCGCGCCTC  
 AAAGACCTCGGCGGGGGCGTCTTGCCTCAACCGTAGTAGAATACACCTCGCTTCAG  
 AGCGTAAGGCGTCCCCCGCGGGACAAACCTTCTGAACTTTTCTCAGGGGTGACCTCG  
 GATCAGGTGGGGATACCTTTAAGCTT

GenBank brojevi sa kojima je poklapanje sekvence 98.30%	<a href="#">KU578313.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP3b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KU578312.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP2b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KU578311.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP1b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

> *Macrophomina phaseolina* izolat ŠR39(2)/09

CCGAGTTGATTCGGGCTCCGTCCCGATCCTCCCACCCTTTGTATACCTACCTCTGTTG  
 CTTTGGCGGGCCGCGGTCTTCCGCGGCCGCCCCCGATTTTGGGGGGTGGCTAGTGC  
 CCGCCAGAGGACTATCAAACCTCCAGTCAGGAAACGTTGCAGTCTGAAAAAAATAT  
 TAAATAAACTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACG  
 CAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTG  
 AACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCA  
 ACCCTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCACCGTCCTTTGCGGGGCGCGCCTCAAAGACC  
 TCGGCGGTGGCGTCTTGCCTCAAGCGTAGTAGAATACACCTCGCTTCGGAGCGTAAG  
 GCGTCGCCC GCCGGACGAACCTTCTGAACTTTTCTCAAGGTTGACCTCGGATCAGGT  
 AGGGATA

GenBank brojevi sa kojima je poklapanje sekvence 100%	<a href="#">KU578313.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP3b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KU578312.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP2b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KU578311.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP1b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

> *Macrophomina phaseolina* izolat ŠR49(5)/09

CATTACCGAGTTGATTCCGGGCTCCGTCCCGATCCTCCCACCCTTTGTATACCTACCTC  
 TGTTGCTTTGGCGGGCCGCGGTCTTCCGCGGCCGCCCGGATTTTGGGGGGTGGCT  
 AGTGCCCGCCAGAGGACTATCAAACCTCCAGTCAGGAAACGTTGCAGTCTGAAAAA  
 AATATTAATAAACTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAA  
 GAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAA  
 TCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTC  
 ATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCACCGTCCTTTGCGGGCGCGCCTCA  
 AAGACCTCGGCGGTGGCGTCTTGCCTCAAGCGTAGTAGAATACACCTCGCTTCGGAG  
 CGTAAGGCGTCGCCCGCCGGACGAACCTTCTGAACTTTTCTCA

GenBank brojevi sa kojima je poklapanje sekvence 100%	<a href="#">KU578313.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP3b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KU578312.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP2b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KU578311.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP1b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

> *Macrophomina phaseolina* izolat ŠR45(4)/09

AGTTGATTCGGGCTCCGTCCCGATCCTCCCACCCTTTGTATACCTACCTCTGTTGCTT  
 TGGCGGGCCGCGGTCTTCCGCGGCCGCCCGGATTTTGGGGGGTGGCTAGTGCCCG  
 CCAGAGGACTATCAAACCTCCAGTCAGTAAACGTTGCAGTCTGAAAAAATATTTAA  
 TAACTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGC  
 GAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACG  
 CACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCC  
 TCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCACCGTCCTTTGCGGGCGCGCCTCAAAGACCTCGG  
 CGGTGGCGTCTTGCCTCAAGCGTAGTAGAATACACCTCGCTTCGGAGCGTAAGGCGT  
 CGCCCGCCGGACGAACCTTCTGAACTTTTCTCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG  
 ATACCCGCTG

GenBank brojevi sa kojima je poklapanje sekvence 100%	<a href="#">MK614785.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain CFE-68 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">MK573366.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> isolate MPHOPSVA16 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

	<a href="#">MH104708.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> isolate Mp29 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence
--	----------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

> *Macrophomina phaseolina* izolat ŠR62(5)/09

TACCGAGTTGATTCGGGCTCCGTCCCGATCCTCCCACCCTTTGTATACCTACCTCTGT  
 TGCTTTGGCGGGCCGCGGTCTTCCGCGGCCGCCCGGATTTTGGGGGGTGGCTAGT  
 GCCCGCCAGAGGACTATCAAACCTCCAGTCAGGAAACGTTGCAGTCTGAAAAAAAT  
 ATTAATAAACTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAA  
 CGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTT  
 TGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTT  
 CAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCACCGTCCTTTGCGGGCGCGCCTCAAAGA  
 CCTCGGCGGTGGCGTCTTGCTCAAGCGTAGTAGAATACACCTCGCTTCGGAGCGTA  
 AGGCGTCCCCCGCCGGACGATCCTTCTGAACTTTT

GenBank brojevi sa kojima je poklapanje sekvence 99.59%	<a href="#">KU578313.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP3b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KU578312.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP2b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KU578311.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP1b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

> *Macrophomina phaseolina* izolat ŠR55(3)/09

CCGAGTTGATTCGGGCTCCGTCCCGATCCTCCCACCCTTTGTATACCTACCTCTGTTG  
 CTTTGGCGGGCCGCGGTCTTCCGCGGCCGCCCGGATTTTGGGGGGTGGCTAGTGC  
 CCGCCAGAGGACTATCAAACCTCCAGTCAGGAAACGTTGCAGTCTGAAAAAAATAT  
 TAAATAAACTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACG  
 CAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTG  
 AACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCA  
 ACCCTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCACCGTCCTTTGCGGGCGCGCCTCAAAGACC  
 TCGGCGGTGGCGTCTTGCTCAAGCGTAGTAGAATACACCTCGCTTCGGAGCGTAAG  
 GCGTCGCCCGCCGGACGAACCTTCTGAACTTTTCTCAAGGTTGAC

GenBank brojevi sa kojima je poklapanje sekvence 100%	<a href="#">KU578313.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP3b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KU578312.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP2b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KU578311.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP1b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

> *Macrophomina phaseolina* izolat ŠR62(4)/09

CATTACCGAGTTGATTCGGGCTCCGTCCCGATCCTCCCACCCTTTGTATACCTACCTC  
 TGTTGCTTTGGCGGGCCGCGGTCTTCCGCGGCCGCCCGGATTTTGGGGGGTGGCT

AGTGCCCGCCAGAGGACTATCAAACCTCCAGTCAGTAAACGTTGCAGTCTGAAAAA  
 ATATTAATAAACTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAG  
 AACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAAT  
 CTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCA  
 TTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCACCGTCCTTTGCGGGCGCGCCTCAA  
 AGACCTCGGCGGTGGCGTCTTGCCTCAAGCGTAGTAGAATACACCTCGCTTCGGAGC  
 GTAAGGCGTCCCCCGCCGGACGAACCTTCTGAACT

GenBank brojevi sa kojima je poklapanje sekvence 100%	<a href="#">KF951778.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain CPC 21517 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
GenBank brojevi sa kojima je poklapanje sekvence 99.8%	<a href="#">MK614772.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain CFE-13 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">MK614771.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain CFE-9 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

> *Macrophomina phaseolina* izolat ŠR24/10

CGCAGAGTTGATTCGGGCTCCGTCCTCCGATCCTCCCACCCTTTGTATACCTACCTCTGT  
 TGCTTTGGCGGGCCGCGGTCTTCCGCGGCCGCCCGGATTTTGGGGGGTGGCTAGT  
 GCCCGCCAGAGGACTATCAAACCTCCAGTCAGGAAACGTTGCAGTCTGAAAAAAT  
 ATTAATAAACTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGTCTTCTGGCATCGATGACTAA  
 CCTTCTCGAATCGCGATAAGAAATGAGAATTGCTGAATTCAGGGAATCCTCGAATCT  
 TTAGAGTCCCCTCTTCTTCTTGAAGTCTGGGGGGCATGCCTAGGCGAGGGTAAG  
 TTCAAATATCCAGCTC

GenBank brojevi sa kojima je poklapanje sekvence 94.72%	<a href="#">KY680345.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain CCTU1656 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KY680344.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain CCTU1689 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KU578313.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP3b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

> *Macrophomina phaseolina* izolat ŠR65(2)/09

CATTACCGAGTTGATTCGGGCTCCGTCCTCCGATCCTCCCACCCTTTGTATACCTACCTC  
 TGTTGCTTTGGCGGGCCGCGGTCTTCCGCGGCCGCCCGGATTTTGGGGGGTGGCT  
 AGTGCCCGCCAGAGGACTATCAAACCTCCAGTCAGGAAACGTTGCAGTCTGAAAAA  
 AATATTAATAAACTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAA  
 GAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAA  
 TCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTC  
 ATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCACCGTCCTTTGCGGGCGCGCCTCA  
 AAGACCTCGGCGGTGGCGTCTTGCCTCAAGCGTAGTAGAATACACCTCGCTTCAGAG  
 CGTAGGGCGTCGCCCGCCGGACGAACCTTCTGAACTTTTCTCAAGGTTGACCTC



GenBank brojevi sa kojima je poklapanje sekvence 99.61%	<a href="#">KU578313.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP3b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KU578312.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP2b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KU578311.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP1b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

> *Macrophomina phaseolina* izolat ŠR85/12

AGTTGATTCGGGCTCCGTCCCGATCCTCCCACCCTTTGTATACCTACCTCTGTTGCTT  
 TGGCGGGCCGCGGTCTTCCGCGGCCGCCCGGATTTGGGGGGTGGCTAGTGCCCG  
 CCAGAGGACTATCAAACCTCCAGTCAGGAAACGTTGCAGTCTGAAAAAAATATTA  
 AATAACTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAG  
 CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC  
 GCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTCAAGCGTCATTTCAACC  
 CTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCACCGTCCTTTGCGGGCGCGCCTCAAAGACCTCG  
 GCGGTGGCGTCTTGCCTCACGCGTAGTAGAATACACCTCGCTTCAGAGCGTAGGGCG  
 TCCCCCGCCGGACGAACCTTCTGAATTTTTCTCAGGGTTCACCT

GenBank brojevi sa kojima je poklapanje sekvence 98.4%	<a href="#">KU578313.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP3b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KU578312.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP2b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KU578311.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP1b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

> *Macrophomina phaseolina* izolat ŠR97/12

CTGCGGAAGGATCATTACCGAGTTGATTCGGGCTCCGTCCCGATCCTCCCACCCTTT  
 GTATACCTACCTCTGTTGCTTTGGCGGGCCGCGGTCTTCCGCGGCCGCCCGGATTT  
 TGGGGGGTGGCTAGTGCCCGCCAGAGGACTATCAAACCTCCAGTCAGGAAACGTTGC  
 AGTCTGAAAAAAATATTAATAAACTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCT  
 GGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAG  
 TGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCC  
 TGTTGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCACCGTCCTTTGCG  
 GGCGCGCCTCAAAGACCTCGGCGGTGGCGTCTTGCCTCAAGCGTAGTAGAATACAC  
 CTCGCTTCGGAGCGTAAGGCGTCGCCCCGCCGGACGAACCTTCTGAACTTTTCTCAAG  
 GTTGACCTC

GenBank brojevi sa kojima je poklapanje sekvence 100%	<a href="#">KU578313.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP3b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KU578312.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP2b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

	<a href="#">KU578311.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP1b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
--	----------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

> *Macrophomina phaseolina* izolat MPHKU

TTACCGAGTTGATTCGGGCTCCGTCCCGATCCTCCCACCCTTTGTATACCTACCTCTG  
 TTGCTTTGGCGGGCCGCGGTCTTCCGCGGGCCGCCCCCGATTTTGGGGGGTGGCTAG  
 TGCCCGCCAGAGGACTATCAAACCTCCAGTCAGGAAACGTTGCAGTCTGAAAAAAA  
 TATTAAATAAACTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGA  
 ACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATC  
 TTTGAACGCACATTGCGCCCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCAT  
 TTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCACCGTCCTTTGCGGGCGCGCCTCAA  
 GACCTCGGCGGTGGCGTCTTGCTCAAGCGTAGTAGAATACACCTCGCTTCGGAGCG  
 TAAGGCGTCGCCCGCCGGACGAACCTTCTGAACTTTTCTCAAGGTTGACCTCGG

GenBank brojevi sa kojima je poklapanje sekvence 100%	<a href="#">KU578313.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP3b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KU578312.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP2b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KU578311.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP1b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

> *Macrophomina phaseolina* izolat ŠR16/13

TCCAGTAGTGAGAATTTACGAGAGAGTCGGTACCAGAATTGATTCGGGCTCCGTCCC  
 GATCCTCCCACCCTTTGTATACCTACCTCTGTTGCTTTGGCGGGCCGCGGTCTTCCGC  
 GGCCGCCCCCGATTTTGGGGGGTGGCTAGTGCCCGCCAGAGGACTATCAAACCTCC  
 AGTCAGGAAATGTTGCAGT

GenBank brojevi sa kojima je poklapanje sekvence 98.12%	<a href="#">KY680345.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain CCTU1656 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KY680344.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain CCTU1689 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KU578313.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP3b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

> *Macrophomina phaseolina* izolat ŠR15/11

CGGCGGATGGACATAACCGAGTTGATCGGGCTCGTCTCGATCCTTCTCTTGTAACCT  
 ACCTCTGTTGTTTGGCGGGCCGCGGTCTTCCGCGGGCCGCCCCCGATTTTGGGGGGT  
 GGCTAGTGCCCGCCAGAGGACTATCAAACCTCCAGTCAGGAAACGTTGCAGTCTGAA  
 AAAAAATATTAATAAACTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGA  
 TGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT  
 CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTCGAG

CGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCACCGTCCTTTGCGGGGCGCGC  
 CTCAAAGACCTCGGGCGGTGGCGTCTTGCCCTCAAGCGTAGTAGAATACACCTCGCTTC  
 GGAGCGTAAGGCGTCGCCCCGCCGGACGAACCTTCTGAACTTTTCTCAAGGTTGACCT  
 CGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAG

GenBank brojevi sa kojima je poklapanje sekvence 97.67%	<a href="#">KP784426.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain 39R(3) 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KJ744350.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain PM19 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">GU046908.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> isolate MPI22 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

> *Macrophomina phaseolina* izolat ŠR32/13

GCGAGAGGGATCATTACCGAGTTGATTTCGGGCTCCGTCCTCCGATCCTCCCACCCTTTG  
 TATACCTACCTCTGTTGCTTTGGCGGGCCGCGGTCTTCCGCGGCCGCCCCCGATTTT  
 GGGGGGTGGCTAGTGCCCGCCAGAGGACTATCAAACCTCCAGTCAGGAAACGTTGCA  
 GTCTGAAAAAAAATATTAATAAACTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTG  
 GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCTATAAGTAATGTGTATTGCATACTTTTTT  
 AATCATAAGAATCGATGAACCATCATTGCTCTTCTTGGA

GenBank brojevi sa kojima je poklapanje sekvence 94.92%	<a href="#">KY680345.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain CCTU1656 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KY680344.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain CCTU1689 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KU578313.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP3b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

> *Macrophomina phaseolina* izolat ŠR36/12

TCGGGCTCCGTCGATCCTCCCACCCTTTGTATACCTACCTCTGTTGCTTTGGCGGGC  
 CGCGGTCTTCCGCGGCCGCCCGGATTTTGGGGGGTGGCTAGTGCCCGCCAGAGGA  
 CTATCAAACCTCCAGTCAGGAAACGTTGCAGTCTGAAAAAAAATATTAATAAACTA  
 AAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGC  
 GATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTG  
 CGCCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCT  
 CTGCTTGGTATTGGGCACCGTCCTTTGCGGGCGCGCCTCAAAGACCTCGGCGGTGGC  
 GTCTTGCCCTCAAGCGTAGTAGAATACACCTCGCTTCGGAGCGTAAGGCGTCGCCCCG  
 CGGACGAACCTTCTGAACTTTTCTCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG  
 CTGA

GenBank brojevi sa kojima je poklapanje sekvence 100%	<a href="#">KF453967.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> isolate Mp-1350 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
GenBank brojevi sa kojima je poklapanje sekvence 99.8%	<a href="#">KU578313.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP3b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KU578312.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP2b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

> *Macrophomina phaseolina* izolat ŠR40/12

TACCGAAGTTGATTCCGGGCTCCCGTCCCGATCCTCCCACCCTTTGTATACCTACCTC  
TGTTGCTTTGGCGGGCCGCGGTCTTCCGCGGCCGCCCGGATTTTGGGGGGTGGCT  
AGTGCCCGCCAGAGGACTATCAAACCTCCAGTCAGGAAACGTTGCAGTCTGAAAAA  
AATATTAATAAACTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAA  
GAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAA  
TCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTC  
ATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCACCGTCCTTTGCGGGGCCCGCTCA  
AAGGCCTCGGCGGTGGCGTCTTGCCTCAACCCTAGAAAAATACACCTCGCTTCAGAA  
CGTGGGGCGTCCCCCGCCGGA AAAACCTTCAA AATTTTCAAAGGGTTCCCC

GenBank brojevi sa kojima je poklapanje sekvence 96.19%	<a href="#">GU046895.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> isolate MP91 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">GU046864.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> isolate MAC37 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
GenBank brojevi sa kojima je poklapanje sekvence 95.99%	<a href="#">KU578313.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP3b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

> *Macrophomina phaseolina* izolat ŠR51/12

TTACCGAGTTGATTCCGGGCTCCCGTCCCGATCCTCCCACCCTTTGTATACCTACCTCTG  
TTGCTTTGGCGGGCCGCGGTCTTCCGCGGCCGCCCGGATTTTGGGGGGTGGCTA  
GTGCCCGCCAGAGGACTATCAAACCTCCAGTCAGGAAACGTTGCAGTCTGAAAAA  
ATATTAATAAACTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAG  
AACGCAGCGAAATGCGATAATTAATGTGAATTGCAGAATTC AATGAATCATCGAAT  
CTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGATAAAGCGTGA  
TTTCACTTAATCAGGCTCTGATTAATCTTAGGCACGGTCTTTGCCGCCGCA

GenBank brojevi sa kojima je poklapanje sekvence 95.08%	<a href="#">KY680345.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain CCTU1656 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KY680344.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain CCTU1689 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

	<a href="#">KU578313.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP3b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
--	----------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

> *Macrophomina phaseolina* izolat ŠR52/12

GATCATTACCGAGTTGATTCGGGCTCCGTCCCGATCCTCCCACCCCTTTGTATACCTAC  
CTCTGTTGCTTTGGCGGGCCGCGGTCTTCCGCGGCCGCCCCCGATTTTGGGGGGTG  
GCTAGTGCCCGCCAGAGGACTATCAAACCTCCAGTCAGGAAACGTTGCAGTCTGAAA  
AAAAATATTAATAAACTAAA

GenBank brojevi sa kojima je poklapanje sekvence 100%	<a href="#">KY680345.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain CCTU1656 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KY680344.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain CCTU1689 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KU578313.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP3b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

> *Macrophomina phaseolina* izolat ŠR52/13

TGATTCGGGCTCCGTCCCGATCCTCCCACCCCTTTGTATACCTACCTCTGTTGCTTTGG  
CGGGCCGCGGTCTTCCGCGGCCGCCCCCGATTTTGGGGGGTGGCTAGTGCCCGCCA  
GAGGACTATCAAACCTCCAGTCAGGAAACGTTGCAGTCTGAAAAAAAATATTAATA  
AACTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGA  
AATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA  
CATTGCGCCCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCTC  
AAGCTCTGCTTGGTATTGGGCACCGTCCTTTGCGGGCGCGCCTCAAAGACCTCGGCG  
GTGGCGTCTTGCCTCAAGCGTAGTAGAATACACCTCGCTTCGGAGCGTAAGGCGTGC  
CCCGCCGGACGAACCTTCTGAACCTTTTCTCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGAT  
ACCCGCTGAACCTTAAGC

GenBank brojevi sa kojima je poklapanje sekvence 100%	<a href="#">KU578313.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP3b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KU578312.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP2b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KU578311.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP1b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

> *Macrophomina phaseolina* izolat ŠR75/13

GCGGAAGGACATTACCGAGTTGATTCGGGCTCCGTCCCGATCCTCCCACCCCTTTGTA  
TACCTACCTCTGTTGCTTTGGCGGGCCGCGGTCTTCCGCGGCCGCCCCCGATTTTGG  
GGGGTGGCTAGTGCCCGCCAGAGGACTATCAAACCTCCAGTCAGTAAACGTTGCAGT  
CTGAAAAAAAATATTAATAAACTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA  
TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAA

TCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTT  
 CGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCACCGTCCTTTGCGGGC  
 GCGCCTCAAAGACCTCGGCGGTGGCGTCTTGCCTCAAGCGTAGTAGAATACACCTCG  
 CTTCGGAGCGTAAGGCGTCGCCCCGCCGACGAACCTTCTGAACTTTTCTCAAGGTTG  
 ACCTCGGATCAGGTAGGGATAACCCGCT

GenBank brojevi sa kojima je poklapanje sekvence 100%	<a href="#">GU046873.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> isolate MAC72 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
GenBank brojevi sa kojima je poklapanje sekvence 99.8%	<a href="#">MK573366.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> isolate MPHOPSVA16 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">MH864176.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain CBS 126630 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

> *Macrophomina phaseolina* izolat ŠR80/13

ATTCGGGCTCCGTCCTCCGATCCTCCCACCCTTTGTATACTACCTCTGTTGCTTTGGCG  
 GGCCGCGGTCTTCCGCGGCCGCCCCCGATTTTGGGGGGTGGCTAGTGCCCGCCAGA  
 GGACTATCAAACCTCCAGTCAGGAAACGTTGCAGTCTGAAAAAAAAATATTAATAAAA  
 CTAACACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA  
 TCGGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACA  
 TTGCGCCCCTTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAA  
 GCTCTGCTTGGTATTGGGCACCGTCCTTTGCGGGCGCGCCTCAAAGACCTCGGCGGT  
 GCGTCTTGCCTCAAGCGTAGTAGAATACACCTCGCTTCGGAGCGTAAGGCGTCGCC  
 CGCCGGACGAACCTTCTGAACTTTTCTCAAGGTTGACCTCGGATCAGG

GenBank brojevi sa kojima je poklapanje sekvence 100%	<a href="#">KU578313.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP3b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KU578312.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP2b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KU578311.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP1b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

> *Macrophomina phaseolina* izolat ŠR82/13

CCAGAGTTGATTCGGGCTCCGTCCTCCGATCCTCCCACCCTTTGTATACTACCTCTGTT  
 GCTTTGGCGGGCCGCGGTCTTCCGCGGCCGCCCCCGATTTTGGGGGGTGGCTAGTG  
 CCCGCCAGAGGACTATCAAACCTCCAGTCAGGAAACGTTGCAGTCTGAAAAAAAAATTA  
 TT

GenBank brojevi sa kojima je poklapanje sekvence 99.41%	<a href="#">KY680345.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain CCTU1656 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
---------------------------------------------------------	----------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

	<a href="#">KY680344.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain CCTU1689 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KU578313.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP3b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

> *Macrophomina phaseolina* izolat ŠR84/13

AGTTGATTCGGGCTCCGTCCCGATCCTCCCACCCTTTGTATACCTACCTCTGTTGCTT  
 TGGCGGGCCGCGGTCTTCCGCGGCCGCCCGGATTTTGGGGGGTGGCTAGTGCCCG  
 CCAGAGGACTATCAAACCTCCAGTCAGGAAACGTTGCAGTCTGAAAAAAATATTTAA  
 ATAAACTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAG  
 CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC  
 GCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACC  
 CTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCACCGTCCTTTGCGGGCGCGCCTCAAAGACCTCG  
 GCGGTGGCGTCTTGCCTCAAGCGTAGTAGAATACACCTCGCTTCGGAGCGTAAGGCG  
 TCGCCCGCCGGACGAACCTTCTGAACTTTTCTCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG  
 GATACCCGCTG

GenBank brojevi sa kojima je poklapanje sekvence 100%	<a href="#">KU578313.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP3b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KU578312.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP2b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KU578311.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP1b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

> *Macrophomina phaseolina* izolat ŠR95/13

AGTTGATTCGGGCTCCGTCCCGATCCTCCCACCCTTTGTATACCTACCTCTGTTGCTT  
 TGGCGGGCCGCGGTCTTCCGCGGCCGCCCGGATTTTGGGGGGTGGCTAGTGCCCG  
 CCAGAGGACTATCAAACCTCCAGTCAGTAAACGTTGCAGTCTGAAAAAAATATTTAA  
 TAAACTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGC  
 GAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACG  
 CACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCC  
 TCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCACCGTCCTTTGCGGGCGCGCCTCAAAGACCTCGG  
 CGGTGGCGTCTTGCCTCAAGCGTAGTAGAATACACCTCGCTTCGGAGCGTAAGGCGT  
 CGCCCGCCGGACGAACCTTCTGAACTTTTCTCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG  
 ATACCCGCTGAACTTAA

GenBank brojevi sa kojima je poklapanje sekvence 100%	<a href="#">MK614785.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain CFE-68 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">MK573366.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> isolate MPHOPVA16 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">MH104708.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> isolate Mp29 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene,

		and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence
--	--	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

> *Macrophomina phaseolina* izolat MPHSO

ATCCTCCCACCCTTTGTATACCTACCTCTGTTGCTTTGGCGGGCCGCGGTCTTCCGCG  
 GCCGCCCCCGATTTTGGGGGGTGGCTAGTGCCCGCCAGAGGACTATCAAACCTCCA  
 GTCAGGAAACGTTGCAGTCTGAAAAAAAATATTAATAAACTAATACTTTCAACAA  
 CGGATCTCTTGTCTTCAGGCATCGATGAATAACG

GenBank brojevi sa kojima je poklapanje sekvence 97.55%	<a href="#">MH496040.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KY680345.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain CCTU1656 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KY680344.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain CCTU1689 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

> *Macrophomina phaseolina* izolat MPHSU

TCGGGCTCCGTCCCGATCCTCCCACCCTTTGTATACCTACCTCTGTTGCTTTGGCGGG  
 CCGCGGTCTTCCGCGGCCGCCCCCGATTTTGGGGGGTGGCTAGTGCCCGCCAGAGG  
 ACTATCAAACCTCCAGTCAGTAAACGTTGCAGTCTGAAAAAAAATATTAATAAACTA  
 AAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGC  
 GATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTG  
 CGCCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCT  
 CTGCTTGGTATTGGGCACCGTCCTTTGCGGGCGCGCCTCAAAGACCTCGGCGGTGGC  
 GTCTTGCTCAAGCGTAGTAGAATACACCTCGCTTCGGAGCGTAAGGCGTCGCCCGC  
 CGGACGAACCTTCTGAACTTTTCTCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG  
 CTGAACTTAAGCATAT

GenBank brojevi sa kojima je poklapanje sekvence 100%	<a href="#">MK614785.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain CFE-68 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">MH104708.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> isolate Mp29 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">MH191216.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> isolate L1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

> *Macrophomina phaseolina* izolat ŠR45/13

ATTTGATTCGGGCTCCGTCCCGATCCTCCCACCCTTTGTATACCTACCTCTGTTGCTTT  
 GGCGGGCCGCGGTCTTCCGCGGCCGCCCCCGATTTTGGGGGGTGGCTAGTGCCCGC  
 CAGAGGACTATCAAACCTCCAGTCAGGAAACGTTGCAGTCTGAAAAAAAATATTA  
 TAACTAAACTCTTCAACAACGCGATCTCTTGTGTTCTGGCATCGAGTGAAGAACG



CAGCCGAAATGCGATAAGTTAATGTGTAATTGCATTAATTCAGTTTAATCGTGCGAA  
 TCTTTAGAACGCACATTGCTACCCCTTGGATATTCGGGGTGGGAATGCCTGTAAGGA  
 ACGTCATTTTAAACCCTCAAGCTTCTCCTTGGTATTGGGGCACCGATCCTATGCGGC  
 GCGCGCCTCAAAG

GenBank brojevi sa kojima je poklapanje sekvence 92.21%	<a href="#">KY680345.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain CCTU1656 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KY680344.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain CCTU1689 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
	<a href="#">KU578313.1</a>	<i>Macrophomina phaseolina</i> strain TP3b internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Овај Образац чини саставни део докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта који се брани на Универзитету у Новом Саду. Попуњен Образац укоричити иза текста докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта.

## План третмана података

<b>Назив пројекта/истраживања</b>
<i>Trichoderma harzianum</i> – биоагенс у контроли проузроковача угљенасте трулежи корена шећерне репе
<b>Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање</b>
а) Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет б) Институт за ратарство и повртарство, Нови Сад
<b>Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање</b>
Докторске академске студије, Агрономија, ужа научна област Фитопатологија
<b>1. Опис података</b>
1.1 Врста студије Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају <b>Експериментална студија, докторска дисертација</b>
1.2 Врсте података а) <b>квантитативни</b> б) квалитативни
1.3. Начин прикупљања података а) анкете, упитници, тестови б) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи в) генотипови: навести врсту <i>Macrophomina phaseolina</i> , <i>Trichoderma harzianum</i> , <b>šećerna repa</b> г) административни подаци: навести врсту _____ д) узорци ткива: навести врсту <b>корен шећерне репе</b> ђ) снимци, фотографије: навести врсту <b>фотографије узорака и микроскопски прикази узорака</b> е) текст, навести врсту <b>литература</b>

ж) мапа, навести врсту \_\_\_\_\_

з) остало: описати \_\_\_\_\_

### 1.3 Формат података, употребљене скале, количина података

#### 1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:

- a) Excel фајл, датотека **.xls**
- b) SPSS фајл, датотека \_\_\_\_\_
- c) PDF фајл, датотека **.pdf**
- d) Текст фајл, датотека **.doc**
- e) JPG фајл, датотека **.jpg, .jpeg**
- f) Остало, датотека **Statistica 13.5, FinchTV 1.4.0, GenAIEx 6.502**

#### 1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

**Све анализе су урађене у три понављања, изузев у тесту утврђивања патогености изолата и *in vivo* огледу где је испитиван утицаја примене биолошког агенса и комерцијалних препарата на појаву угљенасте трулежи корена шећерне репе, где је по третману је коришћено 16 биљака, од којих је свака представљала једно понављање.**

- a) број варијабли **велики број**
- б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.) **велики број**

#### 1.3.3. Поновљена мерења

- a) да
- б) не

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

- a) временски размак између поновљених мера је **1-60 минута**
- б) варијабле које се више пута мере односе се на **испитивање патогености изолата, морфолошких одлика репродуктивних структура, испитивање одгајивачких одлика, испитивање утицаја *Trichoderma harzianum*, *Bacillus* sp. и комерцијалних препарата у *in vitro* и *in vivo* огледима**
- в) нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване као **нису именовани нови фајлови**

Напомене: \_\_\_\_\_

Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?

а) Да

б) Не

Ако је одговор не, образложити \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## 2. Прикупљање података

### 2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

а) експеримент, навести тип **биолошка анализа, молекуларна и статистичка анализа**

б) корелационо истраживање, навести тип **ANOVA и AMOVA**

ц) анализа текста, навести тип **преглед доступне литературе из области, дефинисање начина извођења истраживања, дискусија резултата и поређење са литературним подацима, извођење закључака**

д) остало, навести шта \_\_\_\_\_

2.1.2 Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).

**Светлосни микроскоп Krüss MBL 2100 (Germany)**

**PCR апарат Biometra – Thermocycler**

### 2.2 Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података

а) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да **Не**

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

а) Колики је број недостајућих података? \_\_\_\_\_

б) Да ли се кориснику матрице препоручује замена недостајућих података? Да Не

в) Ако је одговор да, навести сугестије за третман замене недостајућих података

\_\_\_\_\_

2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

Квалитет података је контролисан извођењем вишеструких мерења и применом статистичких алата за евалуацију њиховог квалитета. Статистичка обрада и провера квалитет података извршене су помоћу програмског пакета Statistica 13.5 (TIBCO Software, USA) и GenAIEx 6.502.

2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

Контрола уноса података је извршена упоређивањем добијених података са литературним подацима. Унос података је контролисан филтрирањем података у програму MS Excel.

### 3. Третман података и пратећа документација

3.1. Третман и чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани у Репозиторијуму докторских дисертација Универзитета у Новом Саду (CRIS UNS) и Заједничком порталу свих докторских дисертација и извештаја комисија о њиховој оцени, на универзитетима у Србији (NaRDUS).

3.1.2. URL адреса <https://www.cris.uns.ac.rs/searchDissertations.jsf> <https://nardus.mpn.gov.rs>

3.1.3. DOI \_\_\_\_\_

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

- a) Да
- б) Да, али после ембарга који ће трајати до \_\_\_\_\_
- в) Не

Ако је одговор не, навести разлог \_\_\_\_\_

3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани.

Образложење

---

---

3.2. Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен? \_\_\_\_\_

3.2.1. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум.

---

---

*Ако је потребно, навести методе које се користе за преузимање података, аналитичке и процедуралне информације, њихово кодирање, детаљне описе варијабли, записа итд.*

---

---

---

---

### 3.3 Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму? **Неограничено**

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром? Да **Не**

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача? Да **Не**

3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена?

Да **Не**

Образложити

---

---

## 4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

### 4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити података о личности ([https://www.paragraf.rs/propisi/zakon\\_o\\_zastiti\\_podataka\\_o\\_licnosti.html](https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html)) и одговарајућег институционалног кодекса о академском интегритету.

4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? Да **Не**

Ако је одговор Да, навести датум и назив етичке комисије која је одобрила истраживање

---

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Да **Не**

Ако је одговор да, наведите на који начин сте осигурали поверљивост и сигурност информација везаних за испитанике:

- а) Подаци нису у отвореном приступу
- б) Подаци су анонимизирани
- ц) Остало, навести шта

---

---

## 5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити

а) **јавно доступни**

б) *доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области*

ц) *затворени*

*Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести под којим условима могу да их користе:*

---

---

*Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести на који начин могу приступити подацима:*

---

---

5.4. *Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.*

**Ауторство – некомерцијално – без прераде**

## 6. Улоге и одговорност

*6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података*

**Александра Станков Петреш**

**aleksandra.stankov@ifvcns.ns.ac.rs**

**saskastankov@gmail.com**

*6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима*

**Александра Станков Петреш**

**aleksandra.stankov@ifvcns.ns.ac.rs**

**saskastankov@gmail.com**

*6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима*

**Александра Станков Петреш**

**aleksandra.stankov@ifvcns.ns.ac.rs**

**saskastankov@gmail.com**

©