



UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET



**MORFOLOŠKO - MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA
PATOGENA IZ ASCOCHYTA SPP. KOMPLEKSA**

-Doktorska disertacija-

Mentor: Prof. dr Vera Stojšin

Kandidat: dipl. inž. - master Dalibor Živanov

Novi Sad, 2018.

UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Dalibor Živanov
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	dr Vera Stojšin, redovni profesor, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad
Naslov rada: NR	Morfološko - molekularna karakterizacija patogena iz <i>Ascochyta</i> spp. kompleksa
Jezik publikacije: JP	Srpski
Jezik izvoda: JI	Srpski/Engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	AP Vojvodina

Godina: GO	2018.
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Univertytet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Departman za fitomedicinu i zaštitu životne sredine, Trg Dositeja Obradovića 8, 21000 Novi Sad
Fizički opis rada: FO	(broj poglavlja 10/ stranica 177/ tabela 33 / grafikona 21/ slika 46/ referenci 145/ priloga 2)
Naučna oblast: NO	Biotehničke nauke
Naučna disciplina: ND	Fitopatologija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	<i>Didymella pinodes</i> , <i>Didymella pinodella</i> , <i>Ascochyta pisi</i> , ITS, TEF _{1-α} , IGS1, morfologija, patogenost
UDK	576.385.5:616-094(043.3)
Čuva se: ČU	Biblioteka, Poljoprivredni fakultet, Trg Dositeja Obradovića 8, 21000 Novi Sad
Važna napomena: VN	-
Izvod: IZ	<p>Poslednjih godina u različitim delovima Srbije zapažena je manja ili veća pojava patogena iz <i>Ascochyta</i> spp. kompleksa, kako na stočnom, tako i na konzumnom grašku. Navedeni kompleks čine tri fitopatogene gljive: <i>Didymella pinodes</i>, <i>Didymella pinodella</i> i <i>Ascochyta pisi</i>. Kompleksno oboljenje prouzrokovano gljivama iz <i>Ascochyta</i> spp. kompleksa se naziva Crna pegavost graška.</p> <p>Cilj istraživanja je bio da se prouče morfološke, molekularne i odgajivačke odlike gljiva <i>D. pinodes</i>, <i>D. pinodella</i> i <i>A. pisi</i>, kao i njihova patogenost i</p>

rasprostranjenost na teritoriji Republike Srbije, kao i da se ispita tolerantnost domaćeg sortimenta stočnog graška prema navedenim patogenima.

U periodu od 2013. do 2015. godine, utvrđeno je prisustvo *Ascochyta* spp. na 27 različitih lokaliteta u Srbiji, kao i na po jednom lokalitetu u Bosni i Hercegovini, Turskoj i Francuskoj. Morfološko - molekularnim analizama sakupljenih izolata, prvi put je potvrđeno prisustvo *D. pinodes* i *D. pinodella* na teritoriji Srbije, kao i prisustvo *A. pisi* na teritoriji BiH. Od ukupnog broja izolata poreklom iz Srbije, 48 izolata (62%) pripada vrsti *D. pinodes*, 26 izolata (34%) vrsti *A. pisi* i 3 izolata (4%) vrsti *D. pinodella*. Molekularna identifikacija svih 89 izolata sprovedena je na osnovu ITS i TEF_{1-α} sekvenci, kao i na osnovu dužine amplikona IGS1 prajmera. IGS1 prajmeri su omogućili pouzdanu i nedvosmislenu identifikaciju pojedinačnih vrsta *D. pinodes*, *D. pinodella* i *A. pisi*. Navedeni prajmerski par je po prvi put uspešno primenjen na vrsti *A. pisi*.

Sagledavanjem interakcija između različitih uslova gajenja i testiranih izolata *Ascochyta* spp., uočene su statistički značajne intraspecijske varijacije u pogledu porasta kolonija. Kod ispitivanih izolata *D. pinodes*, *D. pinodella* i *A. pisi*, u zavisnosti od svetlosno-temperaturnog režima i hranljive podloge uočena je velika varijabilnost u boji supstratne i vazdušne micelije. Kod pojedinih izolata vrste *D. pinodella* registrovano je formiranje belih kristala lepezastog, pahuljastog i paperjastog oblika na PDA hranljivoj podlozi pri temperaturi od 20°C. Peritecije gljive *D. pinodes* su se formirale samo na Conn's hranljivoj podlozi na 15°C u tami, kao i na 20°C pri oba svetlosna režima. Izolati *D. pinodes*, *D. pinodella* i *A. pisi* ispoljili su veliku varijabilnost u dužini i širini obrazovanih askospora i piknospora kao i hlamidospora u različitim uslovima gajenja. U ovom radu je po prvi put zabeleženo formiranje sklerocija kod izolata vrsta *D. pinodes* i *D. pinodella* u ispitivanim laboratorijskim uslovima.

Veštačkom inokulacijom uočena je i velika varijabilnost u patogenosti između izolata *D. pinodes*, *D. pinodella* i *A. pisi*, prema domaćim sortama stočnog graška. Sorta Dukat je bila najosetljivija na ispitivane patogene *Ascochyta* spp. kompleksa, dok je sorta Kosmaj bila najtolerantnija.

Datum prihvatanja teme od strane Senata:	21. 04. 2016.
DP	
Datum odbrane:	

DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	Mentor: _____ Dr Vera Stojšin, redovni profesor, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad Predsednik: _____ Dr Stevan Maširević, redovni profesor, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad Članovi: _____ Dr Radivoje Jevtić, naučni savetnik, Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad _____ Dr Đura Karagić, naučni savetnik, Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad _____ Dr Nevena Nagl, naučni savetnik, Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad

UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF AGRICULTURE

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD thesis
Author: AU	Dalibor Živanov
Mentor: MN	Dr Vera Stojšin, professor Faculty of Agriculture, Novi sad
Title: TI	Morphological and molecular characterization of Ascochyta species
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	Serbian/English
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	AP Vojvodina

Publication year: PY	2018.
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	University of Novi Sad, Faculty of Agriculture, Department for Environmental and Plant Protection, Dositeja Obradovića sq. 8, 21000 Novi Sad
Physical description: PD	10 chapters and attachment/ 177 pages/ 33 tables/ 21 graphs/46 photos/ 145 references/ biography
Scientific field SF	Biotechnical Sciences
Scientific discipline SD	Phytopathology
Subject, Key words SKW	<i>Didymella pinodes</i> , <i>Didymella pinodella</i> , <i>Ascochyta pisi</i> , ITS, TEF _{1-α} , IGS1, morphology, pathogenicity
UDC	576.385.5:616-094(043.3)
Holding data: HD	Library of the Faculty of Agriculture, Novi Sad
Note: N	-
Abstract: AB	<p>The presence of pathogens from the complex <i>Ascochyta</i> spp., either in low or high levels, has been confirmed on both forage pea and field pea in different regions of Serbia in the previous several years. This complex consists of three phytopathogenic fungi: <i>Didymella pinodes</i>, <i>Didymella pinodella</i> and <i>Ascochyta pisi</i>. <i>Ascochyta</i> blight (blackspot) of field pea is a composite disease caused by the fungi belonging to <i>Ascochyta</i> spp. complex.</p> <p>The aim of this dissertation was to study the morphological, molecular and selection characteristics of the fungi <i>D. pinodes</i>, <i>D. pinodella</i> and <i>A. pisi</i>, and their</p>

pathogenicity and distribution on the territory of the Republic of Serbia, as well as to test the tolerance of domestic forage pea cultivars to the given pathogens.

In the period 2013-2015, the presence of *Ascochyta* spp. was confirmed on 27 different sites in Serbia, as well as on one site in Bosnia and Herzegovina, one in Turkey, and one in France. Morphological and molecular analyses of the collected isolates confirmed the first appearance of *D. pinodes* and *D. pinodella* in Serbia, and *A. pisi* in Bosnia and Herzegovina. Out of the total number of isolates that originated from Serbia, 48 isolates (62%) belong to the species *D. pinodes*, 26 isolates (34%) belong to *A. pisi* and 3 isolates (4%) belong to *D. pinodella*. Molecular identification of all 89 isolates was based on ITS and TEF₁- α sequences and amplicon length of IGS1 primer. IGS1 primers enabled reliable and unambiguous identification of individual species of *D. pinodes*, *D. pinodella* and *A. pisi*. The mentioned primer pair was successfully applied to *A. pisi* for the first time.

The interactions between different growing conditions and the tested isolates of *Ascochyta* spp. were studied, and statistically significant intraspecies variations in colony growth were found. Depending on the light-temperature regime and growth medium, the tested isolates of *D. pinodes*, *D. pinodella* and *A. pisi* showed high variability in the colour of substrate and aerial mycelia. Certain isolates of *D. pinodella* formed white fan-shaped, dendritic and plumose crystals on PDA growth medium at 20°C. Perithecia of *D. pinodes* formed only on Conn's medium at 15°C in the dark, and at 20°C in both lights regimes. Isolates of *D. pinodes*, *D. pinodella* and *A. pisi* showed high variability in length and width of the formed ascospores and picnospores, as well as chlamydospores under different growing conditions. This study is the first report on the formation of sclerotia in isolates of *D. pinodes* and *D. pinodella* under the tested laboratory conditions.

Artificial inoculation also showed a high variability in pathogenicity among the isolates of *D. pinodes*, *D. pinodella* and *A. pisi* to domestic cultivars of forage pea. The cultivar Dukat was the most susceptible to the tested pathogens of *Ascochyta* spp. complex, and the cultivar Kosmaj was the most tolerant.

Accepted on Senate on:	21. 04. 2016.
AS	
Defended:	

DE	
Thesis Defend Board: DB	<p>Mentor:</p> <hr/> <p>Vera Stojšin, PhD, Professor, Faculty of Agriculture, Novi Sad</p> <p>President:</p> <hr/> <p>Stevan Maširević, PhD, Professor, Faculty of Agriculture, Novi Sad</p> <p>Members:</p> <hr/> <p>Radivoje Jevtić, PhD, Principal Research Fellow, Institute of Field and Vegetable Crops, Novi Sad</p> <hr/> <p>Đura Karagić, PhD, Principal Research Fellow, Institute of Field and Vegetable Crops, Novi Sad</p> <hr/> <p>Nevena Nagl, PhD, Principal Research Fellow, Institute of Field and Vegetable Crops, Novi Sad</p>

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
2.	PREGLED LITERATURE	3
2.1.	Klasifikacija gljiva iz <i>Ascochyta</i> spp. kompleksa	4
2.2.	Simptomi oboljenja graška uzrokovani gljivama iz <i>Ascochyta</i> spp. kompleksa	5
2.2.1.	Simptomi oboljenja graška uzrokovani vrstama <i>Didymella pinodes</i> i <i>Didymella pinodella</i>	5
2.2.2.	Simptomi oboljenja graška uzrokovani vrstam <i>Ascochyta pisi</i>	7
2.3.	Ciklus razvoja patogena iz <i>Ascochyta</i> spp. kompleksa	8
2.4.	Molekularna identifikacija vrsta <i>Ascochyta</i> kompleksa	10
2.5.	Mere kontrole patogena iz <i>Ascochyta</i> spp. kompleksa	11
3.	CILJ ISTRAŽIVANJA	12
4.	RADNA HIPOTEZA	13
5.	MATERIJAL I METODE RADA	14
5.1.	Izolacija patogena i zasnivanje radne kolekcije	14
5.2.	Izolacija patogena i dobijanje čistih kultura	16
5.3.	Izolacija DNK patogena	18
5.3.1.	Identifikacija izolata <i>Ascochyta</i> spp. molekularnim metodama	20
5.4.	Određivanje morfoloških i odgajivačkih karakteristika izolata	23
5.5.	Veštačka inokulacija genotipova stočnog graška patogenima <i>Ascochyta</i> spp. kompleksa	25
5.6.	Statistička analiza podataka	28
6.	REZULTATI ISTRAŽIVANJA	29
6.1.	Simptomi bolesti	29
6.2.	Amplifikacija ITS regiona ispitivanih izolata <i>Didymella pinodes</i>, <i>Didymella pinodella</i> i <i>Ascochyta pisi</i>	33
6.2.1.	Analiza sekvenci ITS regiona izolata <i>Ascochyta</i> spp.	33
6.3.	Amplifikacija TEF_{1-α} gena ispitivanih izolata <i>Didymella pinodes</i>, <i>Didymella pinodella</i> i <i>Ascochyta pisi</i>	38
6.3.1.	Analiza sekvenci TEF _{1-α} gena izolata <i>Ascochyta</i> spp.	38
6.4.	Primena IGS1 markera u identifikaciji izolata <i>Ascochyta</i> spp.	41
6.5.	Filogenetska analiza ITS i TEF sekvenci izolata <i>Ascochyta</i> spp.	45
6.6.	Zastupljenost <i>Ascochyta</i> vrsta u prikupljenim uzorcima	48
6.7.	Uticaj svetlosti, temperature i hranljivih podloga na brzinu porasta izolata <i>Ascochyta</i> spp.	49
6.7.1.	Uticaj svetlosti, temperature i hranljivih podloga na brzinu porasta izolata vrste <i>Didymella pinodes</i>	49
6.7.2.	Uticaj svetlosti, temperature i hranljivih podloga na brzinu porasta izolata vrste <i>Didymella pinodella</i>	52
6.7.3.	Uticaj svetlosti, temperature i hranljivih podloga na brzinu porasta izolata vrste <i>Ascochyta pisi</i>	54
6.8.	Makroskopske morfološke karakteristike izolata <i>Ascochyta</i> spp.	56
6.8.1.	Makroskopske morfološke karakteristike izolata vrste <i>Didymella pinodes</i>	56
6.8.2.	Makroskopske morfološke karakteristike izolata vrste <i>Didymella pinodella</i>	67
6.8.3.	Makroskopske morfološke karakteristike izolata vrste <i>Ascochyta pisi</i>	78
6.9.	Varijabilnost porasta izolata vrste <i>Didymella pinodes</i> u različitim uslovima gajenja	88
6.9.1.	Uticaj svetlosti, temperature i hranljivih podloga na prosečan porast izolata <i>Didymella pinodes</i>	89

6.10.	Varijabilnost porasta izolata vrste <i>Didymella pinodella</i> u različitim uslovima gajenja	92
6.10.1	Uticaj svetlosti, temperature i hranljivih podloga na prosečan porast izolata <i>Didymella pinodella</i>	93
6.11.	Varijabilnost porasta izolata vrste <i>Ascochyta pisi</i> u različitim uslovima gajenja	95
6.11.1.	Uticaj svetlosti, temperature i hranljivih podloga na prosečan porast izolata <i>Ascochyta pisi</i>	97
6.12.	Mikroskopske morfološke karakteristike izolata vrste <i>Didymella pinodes</i>	100
6.12.1.	Sporulacija izolata	100
6.12.2.	Morfologija peritecija i askospora	101
6.12.3.	Morfologija piknida i piknospora	102
	<i>Prosečne dimenzije askospora i piknospora</i>	103
6.12.4.	Morfologija i dimenzije hlamidospora	103
	<i>Uticaj svetlosti, temperature i hranljivih podloga na prosečne veličine hlamidospora</i>	105
6.12.5.	Morfologija sklerocija	106
6.13.	Mikroskopske morfološke karakteristike izolata vrste <i>Didymella pinodella</i>	107
6.13.1	Sporulacija izolata	107
6.13.2.	Morfologija piknida i piknospora	109
	<i>Prosečne dimenzije piknospora</i>	110
	<i>Uticaj svetlosti, temperature i hranljivih podloga na prosečnu dužinu i širinu piknospora</i>	112
6.13.3.	Morfologija i prosečne dimenzije hlamidospora	114
	<i>Uticaj pojedinačnih faktora na prosečnu veličinu hlamidospora</i>	116
6.13.4.	Morfologija sklerocija	117
6.14.	Mikroskopske morfološke karakteristike izolata vrste <i>Ascochyta pisi</i>	118
6.14.1.	Morfologija piknida i piknospora	119
	<i>Prosečne dimenzije piknospora</i>	121
	<i>Uticaj svetlosti, temperature i hranljivih podloga na prosečnu dužinu i širinu piknospora</i>	124
6.14.2.	Morfologija i prosečne dimenzije hlamidospora	126
6.15.	Patogenost <i>Ascochyta</i> spp. na različitim genotipovima stočnog graška	126
6.15.1.	Patogenost izolata vrste <i>Didymella pinodes</i>	131
6.15.2.	Patogenost izolata vrste <i>Didymella pinodella</i>	132
6.15.3.	Patogenost izolata vrste <i>Ascochyta pisi</i>	134
6.15.4.	Patogenost grupa izolata vrsta <i>Didymella pinodes</i> , <i>Didymella pinodella</i> i <i>Ascochyta pisi</i>	135
7.	DISKUSIJA	137
	<i>Simptomi bolesti</i>	137
	<i>Molekularna identifikacija</i>	137
	<i>Zastupljenost <i>Ascochyta</i> vrsta</i>	138
	<i>Makroskopske morfološke karakteristike vrsta <i>Ascochyta</i> spp.</i>	140
	<i>Mikroskopske morfološke karakteristike <i>Ascochyta</i> spp.</i>	143
	<i>Patogenost izolata <i>Ascochyta</i> spp. kompleksa</i>	147
8.	ZAKLJUČAK	149
9.	LITERATURA	152
10.	PRILOZI	164
	Prilog 1	164
	Prilog 2	165
	Biografija	176

1. UVOD

Grašak (*Pisum sativum* L.) je jednogodišnja biljna vrsta iz porodice *Fabaceae*, i jedna je od najstarijih gajenih biljaka na svetu (Zeven i Zhukovsky, 1975). Prema literaturnim navodima najstariji nalazi okamenjenih zrna graška (9750. p.n.e.) pronađeni su u arheološkom nalazištu "Spirit Cave" na granici između Burme i Tajlanda.

Grašak zauzima veoma značajno mesto u ishrani ljudi i domaćih životinja, pre svega zbog visokog sadržaja nutritivnih (Trinidad i sar., 2010; Guillon i Champ, 2002; USDA, 2016) kao i niskog sadržaja antinutritivnih materija (Liener, 1982). U ishrani ljudi grašak se koristi kao zeleno i suvo zrno (proteinski grašak) ili u mahunama (šećerac), dok se u ishrani životinja koristi u obliku krmnog i proteinskog graška.

Procenjuje se da se grašak gaji u Srbiji na 30 000-35 000 ha, od čega stočni grašak zauzima oko 20 000 ha (Mihailović i sar., 2005). Najveći svetski proizvođač graška je Kanada sa preko 3 334 000 tona, zatim slede Ruska Federacija, SAD, Indija, Francuska, Etiopija, Australija, dok se Srbija nalazi na 17. mestu sa proizvedenih 32 697 tona (FAOSTAT, 2012).

Veliki broj različitih fitopatogenih mikroorganizama poput gljiva, bakterija, virusa i nematoda parazitira grašak (Hagedorn, 1984). U toku prilagođavanja na parazitski način života na grašku, ovi mikroorganizmi su razvili veliku genetsku varijabilnost tokom evolucije. Pospešivanju varijabilnosti populacije patogena doprinosi i čovek koji, svojom težnjom da poveća prinos i sadržaj proteina kroz razne vidove selekcije graška, ujedno dovodi do gubljenja gena rezistencije prema poznatom patogenu, kao i do pojave novih parazita na ovoj biljci. Velike promene u tehnologiji gajenja (monokultura, velike količine đubriva, veći sklop biljaka) takođe utiču na povećanje virulentnosti i štetnosti pojedinih parazita graška.

Fitopatogene gljive izazivaju najveće štete na grašku i najznačajnije su za njegovu proizvodnju u svim zemljama gde se ova biljna vrsta gaji (Hagedorn, 1984), pa i u našoj zemlji (Ivanović i Ivanović, 2001; Živanov i sar., 2013). Prema Hagedornu (1984) oko 29 vrsta gljiva parazitira grašak, među kojima najveće štete pričinjavaju gljive iz *Ascochyta* spp. kompleksa. Navedeni kompleks čine tri fitopatogene gljive: *Mycosphaerella pinodes*, *Phoma medicaginis* var. *pinodella*, i *Ascochyta pisi*. Prema najnovijim istraživanjima, u Južnoj Australiji otkrivena je još jedna gljiva koja egzistira unutar *Ascochyta* kompleksa - *Phoma koolunga* (Davidson i sar., 2009), a potvrđena je i u drugim delovima Australije (Davidson i sar., 2011).

Smanjenje prinosa semena stočnog graška može iznositi i preko 50% u povoljnim vremenskim uslovima za razvoj patogena (Wallen, 1974). Gljive iz *Ascochyta* kompleksa samo u Australiji na godišnjem nivou izazivaju smanjenje prinosa graška u vrednosti od 16 000 000 € (Davidson, 2012). Štete koje prouzrokuje ovo oboljenje graška pre svega zavise od njihove epifitocije, regiona gajenja graška, sorte i primene agrotehničkih mera.

Poslednjih godina u različitim delovima Srbije zapažena je manja ili veća pojava patogena iz *Ascochyta* spp. kompleksa, kako na stočnom, tako i na konzumnom grašku. S obzirom da su ovi patogeni kod nas slabo proučavani i da ne postoje podaci o njihovim morfološkim i odgajivačkim karakteristikama, o varijabilnosti patogena i otpornosti sorti koje se gaje na teritoriji Srbije, nameće se potreba za njihovim detaljnijim proučavanjem.

2. PREGLED LITERATURE

Kompleksno oboljenje prouzrokovano gljivama iz *Ascochyta* spp. kompleksa se naziva Crna pegavost graška (eng. *Ascochyta* Blight (Blackspot) of Field Pea). Simptomi bolesti izazvani pojedinačnim gljivama iz *Ascochyta* spp. kompleksa, prvi put su opisani 1927. godine od strane Jones, na osnovu kojih su im dodeljeni nazivi oboljenja koje prouzrokuju: *Didymella pinodes* - Pegavost (eng. Blight); *Didymella pinodella* - Trulež prizemnog dela stable (eng. Foot rot); *Ascochyta pisi* - Pegavost lista i mahuna (eng. Leaf and pod spot).

Crna pegavost graška je rasprostranjena u svim delovima sveta gde se ova kultura gaji. Ekonomski najznačajnije štete pričinjava u Australiji, Severnoj Americi, Novom Zelandu i umerenim klimatskim oblastima Evrope (Bretag i Ramsey, 2001). Štete prouzrokovane od strane gljiva iz *Ascochyta* spp. kompleksa se pre svega ogledaju u smanjenju prinosa i kvaliteta semena (Boros i Marcinkowska, 2010), kao i u smanjenju prinosa i kvaliteta zelene mase (Tivoli i sar., 1996). Gubici izazvani gljivama iz *Ascochyta* kompleksa, variraju iz godine u godinu, kao i od regiona gajenja graška. U povoljnim vremenskim uslovima, prosečan gubitak prinosa izazvan ovim patogenima se procenjuje na više od 50% (Xue i sar., 1996; McDonald i Peck, 2009).

Prvobitno se smatralo da crnu pegavost graška izaziva jedna gljiva – *Ascochyta pisi* (Libert, 1830), međutim, kasnijim istraživanjima Jones (1927), otkriveno je da se radi o kompleksnom oboljenju prouzrokovanom od strane tri gljive: *Didymella pinodes* (Berk. & Blox.) Jones, (sin. *Mycosphaerella pinodes* (Berk. & Blox.) Vesterg, anamorf *Ascochyta pinodes* L.K. Jones); *Didymella pinodella* (sin. *Phoma medicaginis* var. *pinodella* (L.K. Jones) Boerema); i *Ascochyta pisi* Lib. Patogeni koji egzistiraju unutar *Ascochyta* kompleksa, se pojavljuju pojedinačno ili u kombinaciji prilikom izolacije iz obolelih delova biljaka (Onfroy i sar., 1999; Davidson i sar., 2009). Među napred navedenim gljivama iz *Ascochyta* kompleksa najznačajnija je gljiva *D. pinodes* (Bretag i sar. 2006; Gossen i sar., 2011), koja u povoljnim agroklimatskim uslovima može prouzrokovati smanjenje prinosa i do 75% (Wallen, 1974; Gorf, 2000).

Prema najnovijim literaturnim navodima, u okviru navedenog kompleksa mogu se naći i sledeći patogeni: *Phoma koolunga* (Davidson i sar., 2009), *Phoma herbarum* Westend (Li i sar., 2011), *Boeremia exigua* var. *exigua* (Li i sar., 2012), *Phoma glomerata* (Corda) Wollenw.

i Hochapfel (Tran i sar., 2014) i *Peyronellaea lethalis* (Ellis i Barthol.) Aveskamp, Gruyter i Verkley (Petrović i sar., 2017).

2.1. Klasifikacija gljiva iz *Ascochyta* spp. kompleksa

Prvobitni naziv anamorfnog stadijuma za vrstu *Mycosphaerella pinodes* je bio *Ascochyta pisi* (Stone, 1915). Desetak godina kasnije, istraživanjima Jones (1927), došlo se do zaključka da je anamorfnu stadijum zapravo *Ascochyta pinodes*.

White i Morgan-Jones (1987) su na osnovu morfološke sličnosti sa vrstom *Phoma medicaginis* Malbr. i Roum, vrstu *Ascochyta pinodella* (Jones) Boerema, preimenovali u *Phoma medicaginis* (Malbr. i Roum) var. *pinodella* (Jones) Boerema. Međutim, zbog značajnijih morfoloških razlika sa vrstom *Phoma medicaginis*, Morgan-Jones i Burch (1987) su je rangirali kao vrstu *Phoma pinodella* (L.K Jones), čiji naziv je i danas u upotrebi.

Na osnovu DNK sekvenci ITS regiona, vrste *Mycosphaerella pinodes* i *Phoma pinodella* su prebačene u rod *Didymella* i preimenovane u *Didymella pinodes* i *Didymella pinodella* (Peever i sar., 2007). Aveskamp i sar. (2010) su na osnovu DNK analize patogena *Didymella pinodes* i *Phoma medicaginis* var. *pinodella* predložili da se navedeni patogeni preimenuju u *Peyronellaea pinodes* i *Peyronellaea pinodella*.

Na osnovu Nacionalnog Centra za Biotehnološke Informacije (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov) gljive iz *Ascochyta* spp. kompleksa, klasifikovane su na sledeći način:

Carstvo: ***Fungi***

Tip: ***Ascomycota***

Podtip: ***Pezizomycotina***

Klasa: ***Dothideomycetes***

Podklasa: ***Pleosporomycetidae***

Red: ***Pleosporales***

Familija: ***Didymellaceae***

Rod: ***Didymella***

Vrsta: ***Didymella pinodes*; *Didymella pinodella***

Rod: ***Ascochyta***

Vrsta: ***Ascochyta pisi***

S obzirom da su napred navedeni nazivi patogena podjednako zastupljeni u literaturnim navodima, u disertaciji će se koristiti nazivi koji se koriste u NCBI: *Didymella pinodes*, *Didymella pinodella* i *Ascochyta pisi*.

2.2. Simptomi oboljenja graška uzrokovani gljivama iz *Ascochyta* spp. kompleksa

Na ozimom i jarom grašku, simptomi crne pegavosti graška se pojavljuju u različitim periodima i vremenskim uslovima tokom godine (Le May i sar., 2012). Na ozimom grašku, zapažena je prva pojava simptoma tokom decembra meseca, kada temperatura vazduha padne ispod 10°C, a kod jarih formi graška u maju mesecu, kad je temperatura vazduha oko 18°C (Schoeny i sar., 2007). Tokom zimskog perioda ozime forme graška mogu biti oštećene mrazom i samim tim bivaju podložnije napadu patogena iz *Ascochyta* spp. kompleksa (Banniza i Vandenberg, 2003).

2.2.1. Simptomi oboljenja graška uzrokovani vrstama *Didymella pinodes* i *Didymella pinodella*

Didymella pinodes je patogen umerenih i subtropskih klimata, dok je *Didymella pinodella* kosmopolit (Skoglund i sar., 2011). *D. pinodes* parazitira na više od 35, a *D. pinodella* na više od 20 biljnih vrsta (USDA, 2018). Ekonomski najznačajnije štete pričinjavaju na različitim biljnim vrstama iz roda *Pisum*, *Vicia*, *Lathyrus* i dr. Takođe, *D. pinodes* značajne štete pričinjava i na vrstama iz roda *Phaseolus* (Peregrine i Kassim, 1982) i *Vigna* (Ebbels i Allen, 1979; Peregrine i Ahmad, 1982), dok je *D. pinodella* patogen i na *Glycine max* (L.) Merr. (Irinji i sar., 2009; Aveskamp i sar., 2010), *Trifolium pratense* L. (Muļenko i sar., 2008; Chen i sar., 2017; Valenzuela-Lopez i sar., 2018), *Daucus carota* L. (Muļenko i sar., 2008) i *Hordeum vulgare* L. (Irinji i sar., 2009).

Simptome bolesti prouzrokovane od strane *D. pinodes* i *D. pinodella* nemoguće je razlikovati jedne od drugih, te se njihova identifikacija obavlja isključivo laboratorijskim metodama (Kraft i Pflieger 2001; Turo, 2016). Međutim, ako se infekcija ispolji u velikom obimu na stablu, lišću i mahunama, može se pretpostaviti da su izazvani od strane *D. pinodes*, dok se simptomi prouzrokovani od strane *D. pinodella* češće ispoljavaju u zoni korenovog vrata

(Lawyer, 1984; Pag, 1998). Početni simptomi infekcije se javljaju u vidu sitnih, ljubičastih pega, nepravilnog oblika na svim nadzemnim delovima biljke (Jones, 1927). U kasnijim faza razvoja infekcije, pege menjaju boju iz tamno ljubičaste u tamnobraon ili crnu sa jasno definisanim ivicama (Roger i Tivoli, 1996a; Tivoli i Banniza, 2007), međusobno se spajaju i zahvataju veći deo lisne površine, često dovodeći do sušenja celog lista, koji ostaje pričvršćen na biljci (Bretag i sar., 2006). U centralnom delu pega formiraju se koncentrični krugovi piknida. Piknidi su različitih nijansi smeđe boje, vidljivi golim okom. Na mestu spoja lista i stabla, dolazi do obrazovanja plavičasto-crnih do ljubičastih pega, koje se vremenom šire zahvatajući veći deo stabla (Bretag i sar., 2006). Punithalingham i Holiday (1972a), navode da usled dezintegracije tkiva stabla na mestu infekcije dolazi do poleganja biljaka, dok se inficirani cvetvi suše i otpadaju (Garry i sar., 1996). Mlade zaražene mahune se zakrivljuju, a ponekad suše i otpadaju (Wallen i sar., 1967).

Zaražena semena su sitna, smrežurana, tamnosmeđe boje, često i bez vidljivih simptoma (Jones, 1927). Iz ovakvih semena obrazuju se klijanci sa simptomima truleži prizemnog dela stabla koji ubrzo propadaju (Kraft i Pflieger, 2001).

D. pinodes je homotalusna gljiva. Gljiva u telemorfnom stadijumu obrazuje peritecije (pseudotecije), u kojima se formiraju cilindrični, malo povijeni bitunikatni askusi veličine 50-80 x 10-15 μm (Lawyer, 1984). U askusima se nalazi po osam askospora. Askospore su hijalne, dvoćelijske, povijene, nepravilno zadebljale na krajevima u kojim se uočavaju kapljice ulja, prosečne veličine 11-18 x 4-8 μm (Skoglund i sar., 2011).

Piknidi su sferičnog oblika, tamno smeđe do crne boje, veličine 60-200 μm (Mel'nik, 2000; Skoglund i sar., 2011). Piknospore su hijalne, prave ili blago povijene sa zaobljenim krajevima na kojima se uočavaju brojne uljane kapljice (Lawyer, 1984), sa jednom, a ređe sa dve (Ahmed i sar., 2015) ili tri septe (Lawyer, 1984), sužene na mesu obrazovanja septi. Prosečne veličine 8-20 μm x 3-6 μm (Mel'nik, 2000; Liu i sar., 2016).

D. pinodella je heterotalusna gljiva. Piknidi su tamno smeđe do crne boje, ovalnog oblika, veličine 50-200 μm (Watanabe, 2010; Skoglund i sar., 2011). Piknospore su hijalne, sa ili bez septi, ovalnog do cilindričnog oblika, zaobljene na krajevima, veličine 3,5-8 x 1,2-3,5 μm (Iryni i sar., 2009; Watanabe, 2010). Lawyer (1984) navodi da su piknospore značajno manje od piknospora koje obrazuje *A. pisi*. Autor, takođe navodi da se prosečne dimenzije pinkospora, preklapaju sa dimenzijama piknospora *D. pinodes*.

Hlamidospore *D. pinodes* i *D. pinodella* se obilato formiraju, terminalno ili intercelularno na hifama, pojedinačno ili u lancima, svetlo do tamno žute ili braon boje, veličine 7-20 μm (Irinjić i sar., 2009; Watanabe, 2010). Sferičnog su do jajstog oblika, obavijene debelim ćeliskim zidom, sa krupnim uljanim kapima, maslinasto zelene boje (Irinjić i sar., 2009).

D. pinodes na OAT i V8 hranljivim podlogama, obrazuje kolonije od svetlo do tamno sive boje, za razliku od *D. pinodella* kod koje su kolonije tamno sive do crne boje (Onfroy i sar., 1999; Khani, 2015). Pri svetlosnom režimu 12/12h svetlo-tama, na temperaturi od 20°C oko isečaka se formiraju koncentrični krugovi piknida (Onfroy i sar., 1999). Isti autori navode da na V8 hranljivoj podlozi, *D. pinodella* ima veću brzinu porasta kolonije u odnosu na *D. pinodes*.

2.2.2. Simptomi oboljenja graška uzrokovani vrstom *Ascochyta pisi*

Ascochyta pisi je kosmopolitski biljni patogen (Skoglund i sar., 2011), koji parazitira na više od 50 biljnih vrsta iz 20 rodova (USDA, 2018). Ekonomski najznačajnije štete pričinjava na vrstama roda *Pisum*, *Phaseolus*, *Lupinus*, *Lathyrus*, *Trifolium*, *Vicia*, *Astragalus* i dr. (USDA, 2018). Prema literaturnim navodima, *A. pisi* je prvi put konstatovana u našoj zemlji, početkom dvadesetog veka (Jovićević i Milošević, 1990).

Simptomi izazvani gljivom *A. pisi* se ispoljavaju na svim nadzemnim delovima biljke (Smith i sar., 1988; Ivanović i Ivanović, 2001; Mijatović i sar., 2007). Simptomi pegavosti prouzrokovani od strane *Ascochyta pisi* se jasno razlikuju od onih koje prouzrokuju *D. pinodes* i *D. pinodella* (Pag, 1998; Wang i sar., 2000; Tivoli i Banniza, 2007). Karakteristični simptomi se uočavaju na mahunama, u vidu tamnih pega, u okviru kojih se nalazi micelija gljive koja razara tkivo mezokarpa i endokarpa. Pege su blago ulegnute, sivomrke do mrkožute boje, jasno oivičene tamnobraon bojom (Mijatović i sar., 2007; Sivachandrakumar, 2016). U centralnom delu pega uočavaju se razbacana ili koncentrično raspoređena mrka telašca - piknidi. Na listu se obrazuju mrke pege sa koncentričnim krugovima. U početnim fazama razvoja infekcije, pege su sitne i okruglaste, međutim, u kasnijim fazama sa daljim širenjem infekcije, pege se međusobno spajaju, dobijajući nepravilan oblik i pri tome zahvataju veći deo lisne površine. Za razliku od listova, pege na stablu i lisnim drškama su izduženije i ulegnutije (Lawyer, 1984). Zaraženo seme je često bez vidljivih simptoma, a kada se ispolje, oni su u vidu ulegnutih tamnosmeđih pega (Jovićević i Milošević, 1990).

Ascochyta pisi je heterotalusna gljiva. Do skora se smatralo da gljiva ne obrazuje teleomorfni stadijum, međutim, jedino u istraživanjima Chilvers i sar. (2009), ovaj stadijum je dobijen u laboratorijskim uslovima.

Piknidi su ovalnog oblika, svetlo smeđe (Lawyer, 1984) do tamno smeđe boje, prečnika od 100-200 μm (Davidson, 2012), vidljivi golim okom. Piknospore su hijalne, prave ili blago povijene sa zaobljenim krajevima, na kojima se uočavaju pojedinačne uljane kapljice (Jovičević i Milošević, 1990). Piknospore su dvoćelijske (Tadja, 2012), ređe tro- ili četvero-ćelijske (Jovičević i Milošević, 1990; Tadja, 2012), blago ulegnute na mestu obrazovanja septi, veličine od 10-19 x 2,5-5 μm (Punithalingham i Holliiday, 1972b; Lawyer, 1984; Mel'nik, 2000; Tadja, 2012; Davidson 2012).

Za razliku od ostalih patogena iz *Ascochyta* kompleksa, *A. pisi* veoma retko obrazuje hlamidospore (Punithalingham i Holliiday, 1972b; Bretag i sar., 2006). Kod ovog patogena je utvrđeno prisustvo najmanje 6 fizioloških rasa (Vad i sar., 1993). Rasa 1 se smatra najvirulentnijom, dok je rasa 6 najmanje virulentna (Jamali i sar., 2005). Takođe, stvaranje askohitina je svojstveno samo za ovu vrstu (Marcinkowska i sar., 1991).

Na OAT i PDA hranljivim podlogama pri temperaturama od 20°C do 24°C *A. pisi* obilato formira piknide, kao i miceliju svetlije boje (Punithalinghami Holliiday, 1972b; Sivachandrakumar, 2016). Terbeche i sar. (2015) u svojim istraživanjima navode da pri temperaturama od 4 i 37°C dolazi do potpune inhibicije porasta kolonije gljive.

2.3. Ciklus razvoja patogena iz *Ascochyta* spp. kompleksa

Patogeni *D. pinodes* i *D. pinodella* se održavaju micelijom na semenu i zaraženim biljnim ostacima, kao i hlamidosporama i sklerocijama u zemljištu (Bretag i sar., 2006). U zemljišnim uslovima, hlamidospore takođe nastaju preobražavanjem piknospora (Bretag i Ramsey, 2001), i svoju vitalnost u zemljištu mogu da zadrže i do 18 meseci (Bowness, 2013).

Pri visokoj vlažnosti vazduha i temperaturi iznad tačke mržnjenja na zaraženim biljnim ostacima se formiraju askusi iz kojih se pod pritiskom oslobađaju askospore *D. pinodes* (Lawyer, 1984). Askospore se oslobađaju sukcesivno i u zavisnosti od perioda vlaženja (Turo, 2016). Prema istraživanjima Davidson (2012) u laboratorijskim uslovima, askospore se oslobađaju pri temperaturi od 15°C do 20°C, i periodom vlažnosti od 4 do 6h. Nakon

oslobađanja, askospore nošene vetrom dospevaju na udaljenosti i preko 1500 m (Lawyer, 1984), dok one nošene kišnim kapima vrše infekcije obližnjih biljaka. Tokom kišnih perioda, koncentracija oslobođenih askospora može iznositi i preko 125 askospora/cm² (Davidson, 2012). *D. pinodes* kao i većina nekrotrofičnih patogena ima sposobnost da formira anamorfni i teleomorfni stadijum na istoj biljci domaćina (Roger i Tivoli, 1996a; Le May i sar, 2014). Takođe, Roger i Tivoli (1996a) u svojim istraživanjima navode da se piknidi i peritecije mogu istovremeno naći na istoj stipuli ili internodiji.

Prvi vidljivi simptomi pegavosti na nadzemnim delovima biljke nastaju 24h nakon infekcije askosporama (Sivachandrakumar, 2016), i u roku od par dana dolazi do formiranja piknida iz kojih se oslobađaju piknospore koje vrše sekundarne infekcije (Heath i Wood, 1969).

U uslovima velike vlažnosti, iz piknida se oslobađa želatinozna masa piknospora, koje se primarno raznose kišnim kapima, i vrše infekcije lokalnog karaktera (Lawyer, 1984). One se takođe raznose vetrom, insektima i oruđem. U nedostatku vlage, one mogu da zadrže svoju vitalnost i do 3 nedelje (Davidson, 2012). Piknospore kliju u kapi vode, pri optimalnoj temperaturi od 20-21°C (Ivanović i Ivanović, 2001), obrazujući apresoriju koja direktno prodire kroz kutikulu do epidermalnih ćelija domaćina. Micelija se dalje širi intercelularno, izazivajući karakteristične simptome pegavosti. U okviru pega, patogeni iz *Ascochyta* spp. kompleksa formiraju novu generaciju piknida sa piknosporama, koje ponovo vrše infekcije. Simptomi bolesti izazvani piknosporama *D. pinodes* i *D. pinodella* se pojavljuju nakon 24h i 72h (Davidson i sar., 2009; Carrillo i sar., 2013), a *A. pisi* od 6 do 8 dana nakon ostvarene infekcije (Lawyer, 1984).

D. pinodella vrši infekcije korena i prizemnog dela stabla. Značajnije štete pričinjava jedino u zabarenim zemljištima (Onfroy i sar, 1999).

Kod *A. pisi* osnovni izvor zaraze predstavlja zaraženo seme (Pag, 1998; Bretag i sar., 2006), u kome patogen zadržava vitalnost 4-7 godina (Ivanović i Ivanović, 2001). Gljiva se takođe održava i u zaraženim biljnim ostacima u obliku micelije i piknida (Stojšin i sar., 2008; Balaž i sar., 2010). Za razliku od ostalih patogena iz *Ascochyta* kompleksa, *A. pisi* ne može dugo da preživi u zemljištu (Gossen i sar., 2011; Bretag i sar., 2001). Kao uzrok tome navodi se slaba saprofitska i kompetitivna aktivnost sa drugim mikroorganizmima iz zemljišta (Dickinson i Sheridan, 1968). Takođe, postoje i podaci koji ukazuju na jako antagonističko dejstvo *D. pinodes* i *D. pinodella* prema *A. pisi* u zemljištu (Wallen i Jeun, 1968).

2.4. Molekularna identifikacija vrsta *Ascochyta* kompleksa

Morfološka identifikacija vrsta iz *Ascochyta* kompleksa je nepouzdana zbog njihove međusobne sličnosti u morfološkim osobinama kao što su veličina piknida, oblik i veličina konidija, kao i prisustvu ili odsustvu hlamidospora (Faris-Mokaiesh i sar., 1996), te je stoga neophodno njihovu identifikaciju uraditi na nivou DNK. Woudenberg i sar. (2012) smatraju da postoji rizik od pogrešne identifikacije na molekularnom nivou bez predhodnog poznavanja biologije i načina života patogena.

ITS (eng. Internal Transcribed Spacer) region je deo nefunkcionalne RNK smešten između strukturalne rRNK na zajedničkom transkriptu prekursora. Geni koji kodiraju rRNK su organizovani u nizovima koji sadrže ponavljajuće transkribovane subjedinice ribozoma: 18S (mala subjedinica – SSU), 5.5S i 28S (velika subjedinica – LSU). ITS region se sastoji iz tri dela: ITS1 i ITS2 i visoko konzervativnog 5.8S rDNK egzona smeštenog između (Wheeler i Honeycutt, 1988). Subjedinice rDNK su razdvojene netranskribovanim intergenskim delom IGS (eng. Intergenic spacer).

Od prve primene, pa do danas, ITS region je našao široku primenu u filogenetskim i taksonomskim istraživanjima fitopatogenih gljiva (Porter i Collins, 1991; Poczai i Hyvönen, 2010). Padder i sar., (2012) navode važnost primene ITS regiona kao osnovni kriterijum prilikom određivanja taksonomskog statusa vrsta iz *Ascochyta* kompleksa. Između regiona ribozomalnog cistrona, ITS region ima najveću verovatnoću uspešne identifikacije velikog broja gljiva, sa najjasnije definisanim bar kodom između inter i intraspecifičnim varijacijama (Schoch i sar., 2012). Ribozomalni geni su takođe pogodni u molekularnim probama pre svega zbog velikog broja kopija (>250) (Taylor i Ford, 2007).

Prema istraživanjima Peever i sar. (2007) ITS sekvence *D. pinodes*, *D. pinodella* i *A. pisi* su visoko konzervativne, kako unutar pojedinačnih vrsta, tako i za izolate iste vrste poreklom iz različitih zemalja. Iako ITS region pruža visok nivo tačne identifikacije (>70%) sama primena ITS markera, u identifikaciji pojedinih rodova često je nepouzdana (Schoch i sar., 2012), te se stoga preporučuje i primena TEF1- α gena (O'Donnell i sar., 1998; Peever i sar., 2007). TEF1- α (eng. translation elongation factor 1-alpha) je visoko konzervativni kodirajući gen, koji se koristi u filogenetskim analizama prilikom razdvajanja na nivou vrsta (Roger i sar., 1999).

2.5. Mere kontrole patogena iz *Ascochyta* spp. kompleksa

S obzirom da se patogeni iz *Ascochyta* spp. kompleksa prenose semenom, semenske useve graška treba zasnivati u sušnijim regionima (Lawyer, 1984), kao i onemogućiti prenošenje inokuluma sa zaraženih, na nezaražene parcele prostornom izolacijom, kao i dubokim zaoravanjem žetvenih ostataka odmah nakon žetve (Lawyer, 1984; McDonald i Peck, 2009; Salam i sar., 2011a). Četvorogodišnjim polodoredom, infekcioni materijal u zemljištu se smanjuje i do 60% (McDonald i Peck, 2009). Isti autori u svojim istraživanjima takođe navode da odlaganjem jesenje setve 3 do 4 nedelje nakon optimalnog roka, broj obolelih biljaka se smanjio na više od 50%. Takođe, jedna od mera zaštite je i setva sertifikovanog i dezinfikovanog semena (Ivanović i Ivanović, 2001; Stojanović, 2004), kao i smanjenje gustine setve sa 100 na 30 biljaka po m² (Hwang i sar., 2006).

Združenom setvom stočnog graška i ovsa u odnosu 50:50%, smanjuje se intezitet oboljenja prouzrokovanog od strane gljiva iz *Ascochyta* spp. kompleksa od 19 do 45% (Fernández-Aparicio i sar., 2010; Živanov i sar., 2014).

Pravovremena aplikacija fungicida daje delimično dobre rezultate u kontroli oboljenja prouzrokovanim patogenima iz *Ascochyta* spp. kompleksa (Warkentin i sar., 1996; Česnulevičienė i sar., 2014; Tegegn i Teshome, 2017). Prema literaturnim navodima, u odnosu na cenu koštanja fungicidnih tretmana, primena fungicida je opravdana u semenskim usevima, kao i usevim graška čiji prinos zrna prelazi 3 t/ha.

U zavisnosti od geografske distribucije patogena iz *Ascochyta* spp. kompleksa, Lawyer (1984), kao jednu od mere borbe, ističe važnost u gajenju lokalnih sorti graška, čija je otpornost prethodno testirana na lokalne populacije patogena. Tivoli i sar. (1996) su ustanovili vezu između smanjenja prinosa u odnosu na procent zaraženosti internodija i stipula. Ako je zaraženost biljaka ≤ 2 na skali od 0 do 5, onda se može očekivati potencijalni gubitak prinosa za 20% (Salam i sar., 2001b). Istraživanja velikog broja autora su dokazala da sorte koje nisu sklone poleganju i imaju afila tip lista, manje oboljevaju od patogena iz *Ascochyta* spp. kompleksa (Tar'an i sar, 2003; Boros i Marcinkowska, 2010; Conner i sar., 2012). Najpoželjniji vid kontrole oboljenja jeste gajenje otpornih sorti. Međutim, samo umeren nivo otpornosti prema *D. pinodes* je do sada utvrđen kod komercijalnih sorti graška (Nasir i Hoppe, 1997; Khan i sar., 2013). U dosadašnjim istraživanjima otpornost prema ovom patogenu, iako nepotpuna, identifikovana je uglavnom u divljim formama graška (Wroth, 1998; Fondevilla i sar., 2005).

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

S obzirom na oskudne literaturne podatke o prisustvu vrste *A. pisi*, kao i odsustvo literaturnih podataka o prisustvu vrsta *D. pinodes* i *D. pinodella* u Republici Srbiji, osnovni ciljevi istraživanja su:

Proučavanje morfoloških, molekularnih i odgajivačkih odlika *Ascochyta* vrsta, kao i njihova patogenost i rasprostranjenost na teritoriji Republike Srbije.

Ispitivanje tolerantnosti različitih sorti stočnog graška prema dominantnim patogenima iz *Ascochyta* spp. kompleksa, ima za cilj izdvajanje efikasnih izvora otpornosti i njihovo dalje korišćenje u procesu opolemenjivanja na otpornost prema *Ascochyta* spp.

4. RADNA HIPOTEZA

Na osnovu navedenih ciljeva, postavljena je radna hipoteza:

Posljednjih godina u različitim delovima Srbije zapažena je manja ili veća pojava patogena iz *Ascochyta* spp. kompleksa, kako na stočnom, tako i na konzumnom grašku. Pretpostavlja se da su pored vrste *Ascochyta pisi*, prisutne i vrste *D. pinodes* i *D. pinodella* na teritoriji Republike Srbije.

Na osnovu morfoloških i molekularnih metoda identifikacije utvrdiće se prisustvo vrsta *D. pinodes*, *D. pinodella* i *A. pisi* u prikupljenim uzorcima graška.

Morfološke i odgajivačke odlike izolata *D. pinodes*, *D. pinodella* i *A. pisi* razlikovaće se međusobno u zavisnosti od uslova gajenja, kao što su: hranljive podloge i svetlosno-temperaturni režim.

Pretpostavlja se i postojanje razlika u patogenosti testiranih izolata *D. pinodes*, *D. pinodella* i *A. pisi* prema ispitivanom sortimentu stočnog graška, kao i različita osetljivost domaćeg sortimenta stočnog graška prema ispitivanim patogenima.

Rezultati ovih istraživanja će pored teorijskog imati i veliki praktičan značaj.

5. MATERIJAL I METODE RADA

5.1. Izolacija patogena i zasnivanje radne kolekcije

Uzorci graška su prikupljeni sa 27 različitih lokaliteta u Republici Srbiji, kao i po jednim lokalitetom u Bosni i Hercegovini (BiH), Turskoj i Francuskoj u periodu od 2013. do 2015. godine (Tabela 1). Na osnovu prikupljenih uzoraka (stabla, lista, cveta, mahuna) stočnog i konzumnog graška sa karakterističnim simptomima pegavosti, prouzrokovanih od strane gljiva (*Didymella pinodes*, *Didymella pinodella* i *Ascochyta pisi*) iz *Ascochyta* spp. kompleksa formirana je radna kolekcija patogena. Pored navedenih izolata u istraživanje su uključeni i referentni izolati iz CBS (*Westerdijk Fungal Biodiversity Institute*) i DSMZ (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*) kolekcije, poreklom iz Bugarske, Holandije i Nemačke.

Tabela 1. Radna kolekcija izolata

Redni broj izolata	Šifra izolata	Lokalitet / Zemlja porekla	Biljni organ	Godina izolacije
1	K379	Žabalj / Srbija	List	2013
2	K388	Lukićevo / Srbija	List	2013
3	K390	Sajan / Srbija	List	2013
4	K469	Rimski šančevi / Srbija	Vitica	2014
5	K489	Čenej / Srbija	List	2014
6	K490	Srbobran / Srbija	Stablo	2014
7	K491	Srbobran / Srbija	Stablo	2014
8	K492	Srbobran / Srbija	Vitica	2014
9	K496	Lukićevo / Srbija	List	2014
10	K497	Lukićevo / Srbija	List	2014
11	K498	Lukićevo / Srbija	List	2014
12	K499	Rimski šančevi / Srbija	List	2014
13	K500	Rimski šančevi / Srbija	List	2014
14	K501	Velika Ilova / BiH	Stablo	2014
15	K502	Velika Ilova / BiH	Cvet	2014
16	K503	Velika Ilova / BiH	Cvet	2014
17	K504	Velika Ilova / BiH	Cvet	2014
18	K505	Rimski šančevi / Srbija	Cvet	2014
19	K506	Rimski šančevi / Srbija	Stablo	2014
20	K507	Tovariševo / Srbija	List	2014
21	K508	Rimski šančevi / Srbija	List	2014
22	K509	Beška / Srbija	List	2014
23	K511	Kanjiža / Srbija	List	2014

Tabela 1. (nastavak)

24	K512	Kanjiža / Srbija	List	2014
25	K513	Kanjiža / Srbija	List	2014
26	K514	Kanjiža / Srbija	List	2014
27	K515	Lukićevo / Srbija	List	2014
28	K516	Lukićevo / Srbija	List	2014
29	K517	Lukićevo / Srbija	List	2014
30	K518	Lukićevo / Srbija	List	2014
31	K521	Apatin / Srbija	List	2014
32	K522	Apatin / Srbija	List	2014
33	K523	Sonta / Srbija	Stablo	2014
34	K524	Vršac / Srbija	List	2014
35	K525	Đurđevo / Srbija	List	2014
36	K526	Sonta / Srbija	Stablo	2014
37	K527	Temerin / Srbija	List	2014
38	K528	Beška / Srbija	List	2014
39	K529	Đurđevo / Srbija	List	2014
40	K530	Novi Bečej / Srbija	List	2014
41	K531	Rimski šančevi / Srbija	Mahuna	2014
42	K532	Šabac / Srbija	List	2014
43	K533	Rimski šančevi / Srbija	Mahuna	2014
44	K534	Rimski šančevi / Srbija	Mahuna	2014
45	K535	Senta / Srbija	List	2014
46	K536	Senta / Srbija	List	2014
47	K537	Vršac / Srbija	List	2014
48	K538	Pivnice / Srbija	List	2014
49	K540	Despotovo / Srbija	List	2014
50	K541	Perlez / Srbija	List	2014
51	K542	Beška / Srbija	List	2014
52	K543	Čortanovci / Srbija	List	2014
53	K544a	Despotovo / Srbija	List	2014
54	K544b	Despotovo / Srbija	List	2014
55	K545	Rimski šančevi / Srbija	Mahuna	2014
56	K546	Kanjiža / Srbija	Vitica	2014
57	K547	Kanjiža / Srbija	Vitica	2014
58	K548	Cerovo / Srbija	List	2014
59	K549	Plavna / Srbija	List	2014
60	K550	Srpski Itebej / Srbija	Mahuna	2014
61	K551	Rimski šančevi / Srbija	List	2014
62	K554	Futog / Srbija	Vitica	2014
63	K555	Plavna / Srbija	List	2014
64	K1	Gévezé / Francuska	---	2014
65	K2	Gévezé / Francuska	---	2014
66	K3	Gévezé / Francuska	---	2014
67	K4	Gévezé / Francuska	---	2014
68	K5	Gévezé / Francuska	---	2014
69	K6 *	--- / Bugarska	---	1992
70	K17 *	--- / Holandija	Stablo	---

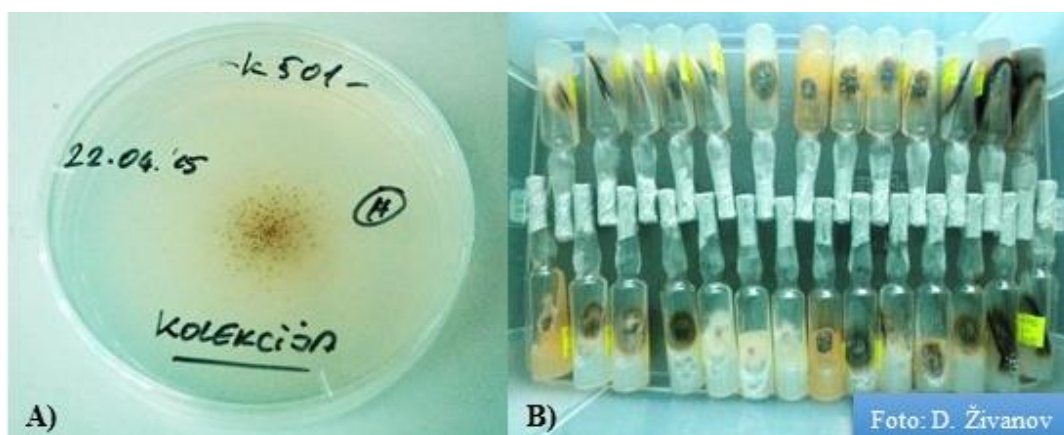
Tabela 1. (nastavak)

71	K18 *	--- / Nemačka	Stablo	---
72	K21	Rimski šančevi / Srbija	Mahuna	2014
73	K22	Rimski šančevi / Srbija	Seme	2014
74	K36	Rimski šančevi / Srbija	Stablo	2015
75	K34	Rimski šančevi / Srbija	Stablo	2015
76	K43	Čurug / Srbija	List	2015
77	K44	Pačir / Srbija	List	2015
78	K45	Pačir / Srbija	Stablo	2015
79	K48	Pačir / Srbija	Stablo	2015
80	K52	Pačir / Srbija	Stablo	2015
81	K56	Kanjiža / Srbija	Stablo	2015
82	K60	Tekirdağ / Turska	Stablo	2015
83	K63	Tekirdağ / Turska	Stablo	2015
84	K33	Tekirdağ / Turska	Vitica	2015
85	K168	Rimski šančevi / Srbija	List	2015
86	K169	Rimski šančevi / Srbija	List	2015
87	K170	Rimski šančevi / Srbija	Stablo	2015
88	K171	Rimski šančevi / Srbija	Stablo	2015
89	K182	Rimski šančevi / Srbija	List	2015
90	K184	Rimski šančevi / Srbija	Stablo	2015
91	K186	Rimski šančevi / Srbija	Stablo	2015
92	K190	Rimski šančevi / Srbija	List	2015

* referentni izolati (K6 – CBS 122748; K 17- DSMZ 63393/ATCC 32162; K18 – DSMZ 62763)

5.2. Izolacija patogena i dobijanje čistih kultura

Delovi biljaka sa karakterističnim simptomima su iseckani na sitne fragmente, koji su potom sterilisani u 2% rastvoru NaOCl u trajanju od 5 minuta, a zatim tri puta isprani u sterilnoj destilovanoj vodi (Rapilly, 1968). Nakon sterilizacije, fragmenti su zalepljeni providnom lepljivom trakom za predmetno mikroskopsko staklo. Prilikom postavljanja na predmetno staklo, fragmenti su postavljeni tako da otvori piknida budu okrenuti ka gore (Slika 1A), kako ne bi došlo do prevremenog oslobađanja piknospora prilikom manipulacije piknidima. Zatim je pod stereo mikroskopom (*Leica MZ8*) iz svakog pojedinačnog uzorka, sterilisanom entomološkom iglom, nasumično izvađeno po pet piknida koji su sterilisani u 1% rastvoru NaOCl u trajanju od 5 sekundi (Slika 1B), i tri puta isprani u sterilnoj destilovanoj vodi. Sterilisani piknidi su preneti na PDA podlogu i inkubirani na temperaturi od $20 \pm 1^\circ\text{C}$, sa fotoperiodom od 16h/8h svetlo-tama, u trajanju od 7 do 10 dana. Za inkubaciju gljiva korišćene su neonske sijalice sa crno-plavim spektrom svetlosti (*Philips TLD 30w/08-BLB*).



Slika 2. Monosporni izolati (A); Kolekcija monospornih izolata (B)

5.3. Izolacija DNK patogena

Za potrebe ekstrakcije DNK, svi izolati su gajeni u Petri kutijama Ø 85 mm na PDA hranjivoj podlozi na temperaturi od $20 \pm 1^\circ\text{C}$, 12 do 15 dana. Sa površine PDA podloge, sastrugano je od 300 do 900 mg micelija gljive. DNK ekstrakcija je rađena po protokolu Somma (2004):

- U rashlađene avane staviti po 1,5 ml *cetil-trimetil-amonijum-bromid* (CTAB) ekstrakcionog pufera¹, zatim 3 μl 0,2% β -merkaptetanola i na kraju ubaciti miceliju.
- Sve zajedno izmacerirati dok se ne dobije homogena smeša.
- Homogenu smešu prebaciti u sterilne mikrotube.
- Dodati 20 μl proteaze K (20 mg/ μl), izmešati i inkubirati na 65°C , 45 min.
- Dodati 20 μl RNaze A (10 mg/ μl), staviti na vorteks a zatim inkubirati 10 min na 65°C .
- Centrifugirati 10 min na 11000 o/min.
- Supernatant ($\approx 600 \mu\text{l}$) preneti u novu mikrotubu i dodati istu zapreminu hloroforma ($\approx 600 \mu\text{l}$), i staviti na vorteks u trajanju od 30 s.
- Centrifugirati 15 min na 11000 o/min.
- 400 μl supernatanta prebaciti u novu mikrotubu i dodati 400 μl hloroforma, zatim izmešati na vorteks u trajanju 30 s.
- Centrifugirati 10 min na 11000 o/min.
- Supernatant ($\approx 300 \mu\text{l}$) preneti u novu mikrotubu i dodati 2 vol. (600 μl) CTAB pufera za precipitaciju¹, blago izmešati.
- Inkubirati 60 min na sobnoj temperaturi i potom centrifugirati 10 min na 11000 o/min.

- Odbaciti supernatant, a talog rastvoriti u 350 μ l NaCl (1,2 M).
- Dodati 350 μ l hloroforma i mešati 30 s i na vorteksu a potom centrifugirati 10 min na 11000 o/min.
- Gornji sloj preneti u novu mikrotubu i dodati 0,6 (180 μ l) vol. izopropanola i nakon toga izmešati okretanjem mikrotube nekoliko puta.
- Centrifugirati 10 min na 11000 o/min.
- Odbaciti gornji sloj, a talog isprati dodavanjem 500 μ l 70% etanola.
- Pažljivo prevrnuti nekoliko puta i centrifugirati 10 min na 11000 o/min.
- Prosuti supernatant a talog ostaviti da se osuši na sobnoj temperaturi u trajanju do 30 min.
- Talog rastvoriti u 50 μ l TE pufera ili vode.

¹Sastav CTAB pufera za ekstrakciju i precipitaciju je dat u poglavlju Prilozi, (Prilog 1)

Kvalitet izolovane DNK je potvrđen putem lančane reakcije polimeraze (PCR) sa univerzalnim prajmerima, TR03 i TR04 (Tabela 2), specifičnim za 18S rRNK, deo male ribozomalne subjediniče, primenom odgovarajućeg programa za amplifikaciju (Tabela 3).

Tabela 2. Sekvence oligonukleotidnih prajmera

Lokus	Prajmer	Sekvenca	Referenca
18S	TR03	5'-TCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTA-3'	Allmann i sar.,
rRNK	TR04	5'-AATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTT-3'	(1993)
5,8S	ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	White i sar.,
rRNK	ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	(1990)
TEF_{1-α}	EF ₁ -728	5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3'	Carbone i Kohn,
	EF ₁ -986	5'-TACTTGAAGGAACCCTTACC-3'	(1999)
IGS1	LR12R	5'-GAACGCCTCTAAGTCAGAATCC-3'	Vilgalys, (1994)
	MpPmpRev1	5'-CTTTGTTTGCCCGCTACTTC-3'	Chilvers, (2009)

Tabela 3. 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	45	
Krajnja ekstenzija	68	600	

PCR reakcije su izvedene u ukupnoj zapremini od 25 μ l koja je sadržala: 30 ng izolovane DNK, 0,2 mM dNTP, 2,5 mM MgCl₂, 2 U Taq polimeraze (*Thermo Fisher Scientific*) i 0,25 μ M svakog prajmera (*Metabion*). Lančana reakcija polimeraze izvedena je u PCR aparatima *TPersonal* i *T1* (*Biometra*). 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 poređenjem sa 50 i 100 bp DNK lestvicama (*GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific*).

5.3.1. Identifikacija izolata *Ascochyta* spp. molekularnim metodama

a) Amplifikacija fragmenta ITS regiona

Izolovana DNK je korišćena kao matrica za amplifikaciju fragmenta ITS regiona prajmerima ITS1 i ITS4 (Tabela 2), primenom odgovarajućeg programa amplifikacije (Tabela 4).

Tabela 4. Program amplifikacije ITS fragmenata

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

b) *Amplifikacija fragmenta TEF₁- α gena*

Izolovana DNK je korišćena kao matrica za amplifikaciju fragmenta TEF₁- α gena prajmerima EF₁-728 i EF₁-986 (Tabela 2), primenom odgovarajućeg programa amplifikacije (tabela 5).

Tabela 5. Program za amplifikaciju TEF fragmenata

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

c) *Ekstrakcija i prečišćavanje PCR produkata*

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

- Iseći 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 vol. pufer QX1 jednom volumenu gela sa DNK fragmentom veličine 100 bp - 4000 bp.
- Resuspendovati QIAEX II na vorteksu 30 s. Dodati 10 μ l 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 μ l 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 μ 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 μ 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 μ l QIAEX II suspenzije, talog se suši oko 30 min. Ne sušiti vakumom.
- Za eluciju DNK dodati 20 μ l 10mM Tris-HCl, pH 8,5 ili 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%.

d) *Sekvenciranje i BLAST analiza*

Produkti amplifikacije prajmerima ITS i TEF su poslani na sekvenciranje u Macrogen Inc. (Amsterdam, Holandija), koje je rađeno na aparatu *ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems)*.

Dobijene sekvence ITS regiona i TEF₁- α gena, su primenom BLAST algoritma upoređivane sa odgovarajućim sekvencama u NCBI bazi GeneBank. Smatrano je da je identitet sekvenci potvrđen kada su poklapanja između zadate sekvence i sekvence iz baze podataka bile $\geq 99\%$.

e) *Amplifikacija fragmenta IGS1 regiona*

U cilju identifikacije *Didymella pinodes*, *Didymella pinodella* i *Ascochyta pisi* pomoću različitih PCR profila, izolovana DNK je takođe korišćena kao matrica za amplifikaciju fragmenta IGS1 regiona prajmerima LR12R i MpPmpRev1 (Tabela 2), primenom odgovarajućeg programa amplifikacije dr C. Le May (lična komunikacija) (Tabela 6).

Tabela 6. Program amplifikacije IGS1 fragmenata

Faza	Temperatura (°C)	Vreme (s)	Broj ciklusa
Početna denaturacija	95	120	
Denaturacija	95	15	} 35
Vezivanje prajmera	60	15	
Ekstenzija	72	20	
Krajnja ekstenzija	72	120	

5.4. Određivanje morfoloških i odgajivačkih karakteristika izolata

Radi proučavanja morfoloških karakteristika a na osnovu dobijenih rezultata molekularne karakterizacije svih prikupljenih izolata (92), odabrano je po 5 reprezentativnih izolata *Didymella pinodes* (K530, K528, K514, K517, K18) i *Ascochyta pisi* (K505, K21, K22, K502, K6), odnosno 4 izolata *Didymella pinodella* (K63, K388, K60, K17), uključujući i po jedan referentni izolat iz svake grupe. Odgajivačke karakteristike vrsta iz *Ascochyta* kompleksa proučavane su na šest vrsta hranjivih podloga:

1. Krompir dekstrozna podloga (PDA – Potato Dextrose Agar, *HiMedia – M096*)
2. Vodeni agar podloga (WA – Water Agar, *HiMedia – RM026*)
3. Ovseni agar podloga (OAT – Oat Meal Agar, *HiMedia - M397*)
4. Konsov agar podloga (Conn's Agar, *HiMedia - M730*)
5. Podloga od osam vrsta povrća (V8 Juice Agar, *HiMedia – M638*)
6. Kvaščeva podloga (Yeast Exstrac Agar, *HiMedia – M456*)

Sve podloge su pripremljene prema preporuci proizvođača i sterilisane 15 minuta u autoklavu na temperaturi od 121°C i pritisku od 1,2 bara (Atlas, 2010). Nakon autoklaviranja i hlađenja pripremljenih podloga, pri temperaturi od 40°C, dodati su sledeći antibiotici: Penicillin G sodium salt (*Sigma-Aldrich*) u količini od 100 mg kao i Streptomycin sulfate salt (*Sigma-Aldrich*) u količini od 50 mg na 1000 ml pripremljene podloge. U Petri kutije veličine Ø 85 mm razlivano je 30 ml odgovarajuće podloge, uz dodatak antibiotika, kako bi se sprečila potencijalna kontaminacija bakterijama.

Za potrebe morfoloških i molekularnih istraživanja, svi izolati gljiva su gajeni i umnožavani na PDA podlozi, pri temperaturi od $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Sa PDA podloge isečeni su diskovi (8 mm²) sa micelijom, koji su potom preneti na centar Petri kutije sa odgovarajućom hranjivom

podlogom u tri ponavljanja. Ovako zasejane Petri kutije su zatvarane parafilm trakom, kako ne bi došlo do kontaminacije.

Kolonije gljiva su gajene 20 dana u politermostatu (*VELP Scientifica FOC 215IL*), pod različitim svetlosno - temperaturnim režimom, na šest različitih hranjivih podloga (PDA, WA, OAT, Conn's, V8, Yeast). Svetlosni režim je iznosio 12/12h svetlo-tama i 24h tama, dok je temperaturni režim iznosio 15°C, 20°C i 25°C. Porast kolonije je praćen u periodu od 20 dana, merenjem prečnika kulture svakog 5. dana. Dvadesetog dana, opisana su makroskopska i mikroskopska svojstva odabranih izolata *in situ*. Za određivanje mikroskopskih svojstava, merene su dimenzije 30 spora svakog izolata, kao i sklerocija ukoliko su ih izolati formirali. Merenja su vršena na binokularnom mikroskopu (*Leica DMLS*) sa digitalnom kamerom uvećanja 5 Mpx (*Leica MC170HD*).

Od makroskopskih svojstva izolata praćeni su sledeći parametri:

1. Prečnik kolonije (mm)
2. Obod kolonije
3. Boja kolonije
4. Izgled lica i naličija kolonije

Od mikroskopskih svojstva izolata mereni su sledeći parametri:

1. Prisustvo/odsustvo piknospora
2. Dužina i širina piknospora (μm)
3. Prisustvo/odsustvo askospora
4. Dužina i širina askospora (μm)
5. Prisustvo/odsustvo hlamidospora
6. Veličina hlamidospora (μm)
7. Prisustvo/odsustvo sklerocija

5.5. Veštačka inokulacija genotipova stočnog graška patogenima *Ascochyta* spp. kompleksa

Priprema biljnog materijala, kao i veštačka inokulacija biljaka stočnog graška rađena je po modifikovanoj metodi Carrillo i sar., (2013) i Fondevilla i sar., (2014). Za potrebe istraživanja otpornosti prema patogenima iz *Ascochyta* spp. kompleksa, uključeno je 6 različitih genotipova stočnog graška: po tri sorte ozimog (NS Mraz, Kosmaj, Zlatar) i tri sorte jarog stočnog graška (NS Junior, Partner, Dukat). Kako bi se ujednačilo klijanje i nicanje biljaka, pre setve je izvršena skarifikacija semena graška. Po izvršenoj skarifikaciji, seme je postavljeno između dva sloja sterilnog filter papira i zaliveno sterilnom destilovanom vodom u Petri kutijama Ø 200 mm. Potom su Petri kutije sa semenom prenete u termostat na naklijavanje narednih 48 sati pri temperaturi od +4°C u mraku. Nakon isteka 48 sati, nastavljeno je naklijavanje semena dodatnih 48 sati u mraku na 20°C. Četvrtog dana izvršena je setva svih genotipova (NS Mraz, Kosmaj, Zlatar, NS Junior, Partner, Dukat) stočnog graška u saksije zapremine 250 cm³ sa mešavinom supstrata: Obogaćeni humus + *Klasmann-Deilmann* TS3 AQUASAVE + *Klasmann-Deilmann* TS1 FINE u odnosu 2:1:1. U svakoj saksiji je posejano po pet biljaka jednog genotipa stočnog graška u tri ponavljanja. Po završenoj setvi, biljke su uzgajane u politermostatu na temperaturi od 20°C, i fotoperiodom od 16h/8h svetlo-tama sve do faze 4 lista (BBCH 13).

Prethodno odabrani izolati gljiva *Didymella pinodes*, *Didymella pinodella* i *Ascochyta pisi*, su revitalizovani na hranljivoj PDA podlozi. Nakon revitalizacije, kulture gljiva su ponovo presejane u Petri kutije Ø 85 mm sa PDA hranljivom podlogom i inkubirane na temperaturi od 20 ± 1°C, i fotoperiodom od 16h/8h svetlo-tama, 10 do 12 dana. Nakon inkubacije, u Petri kutiju sa razvijenom gljivom sipano je 5 ml sterilne destilovane vode, micelija izolata je staklenim štapićem sastrugana i profiltrirana preko dva sloja sterilne gaze. Ceo postupak je ponavljen dva puta, kako bi se obezbedila dovoljna količina inokuluma u suspenziji. Koncentracija piknospora je podešena na 3,5 x 10⁵ spora/ml pomoću hemocitometra (*Neubauer*). Nakon određivanja koncentracije, na 100 ml suspenzije dodato je 120 µl okvašivača Tween 20 (*Sigma-Aldrich*), kako bi se obezbedila bolja pokrovnost biljaka inokulumom prilikom inokulacije. Biljke u kontroli su istretirane mešavinom destilovane vode i okvašivača.

Pored pojedinačnih suspenzija, napravljene su i mešavine suspenzija za svaku grupu: *Didymella pinodes* (DP = K530+ K528+ K514+ K517+ K18), *Didymella pinodella* (PMP = K63+ K388+ K60+ K17), i *Ascochyta pisi* (AP = K505+ K21+ K22+ K502+ K6), kao i



Slika 4. Skala ocene sa simptomima *Ascochyta* spp. na listovima stočnog graška (original)

Tabela 7. Skala ocene i opis simptoma *Ascochyta* spp. na listovima stočnog graška

OCENA	SIMPTOMI
0	Bez vidljivih simptoma
1	Par pega
2	Više sitnih pega
3	10-25% lista nekrotirano i pojava združenih pega
4	26 - 50% lista prekriveno pegama, ili dehidrirano
5	51% - 75% lista prekriveno pegama, ili dehidrirano
6	76 - 100% lista nekrotirano, ili dehidrirano

5.6. Statistička analiza podataka

Statistička obrada kao i grafički prikaz dobijenih rezultata je urađen u programskom paketu MiniTab 17 (trial version), primenom analize varijanse ($p < 0,01$ i $p < 0,05$) i Tukey testa ($p < 0,05$). Deo grafičkog prikaza rezultata koji se odnosi na petodnevni porast izolata, procentualni udeo i zastupljenost *Ascochyta* vrsta, je urađen pomoću programa Microsoft Office Excel 2013.

Nakon identifikacije vrsta, poravnavanje ITS i TEF_{1- α} sekvenci izvršeno je pomoću ClustalW programa, u okviru programskog paketa MEGA 7 (Kumar i sar., 2016). U okviru istog programskog paketa konstruisana su filogenetska stabla, primenom Maximum Likelihood metode, zasnovane na Kimura 2-parametar modelu (Kimura, 1980), upotrebom Neighbor-Join i BioNJ algoritama.

6. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

6.1. Simptomi bolesti

Simptomi pegavosti izazvani gljivama iz *Ascochyta* spp. kompleksa su se ispoljili na svim nadzemnim delovima biljke graška (Slika 5). Na stablu su se javljale izdužene eliptične pege, različitih veličina, tamnomrke boje (Slika 6). Sa napredovanjem bolesti, obim pega se brzo povećavao. Unutar pega dolazilo je do dezintegracije tkiva, a samim tim i do lomljenja i poleganja biljaka (Slika 7). Slični simptomi pegavosti su se ispoljavali na lisnim i cvetnim drškama i viticima (Slika 8). U zavisnosti od faze napredovanja bolesti, na listovima su uočene od svetlo braon do tamno ljubičaste pege sa jasno definisanim ivicama. U početnim fazama razvoja bolesti, na listovima su se javljale pojedinačne pege, čiji se broj kasnije uvećavao. U okviru pega su obrazovani koncentrično ili nepravilno raspoređeni piknidi vidljivi golim okom. Na mestu obrazovanja pega dolazilo je do pucanja i sušenja tkiva, a u nekim slučajevima i do ispadanja pega (Slika 9). Zaraženo lišće se sušilo i ostajalo pričvršćeno na stabljici duži vremenski period.

Na cvetnoj loži i čašičnim listićima pege su bile tamnije i sitnije nego na drugim delovima biljke. Na kruničnim listićima su obrazovani piknidi koji prate nervaturu (Slika 10). Zaraženi cvetovi su se sušili i u većini slučajeva otpadali. Simptomi infekcije su registrovani od početka obrazovanja mahuna (Slika 12A), pa sve do završne faze nalivanja zrna. Na mahunama su se javljale ulegnute, nekrotične pege, sivomrke do mrkožute boje sa tamnim oreolom. Usled jače infekcije dolazilo je do spajanja pega i propadanja većeg dela tkiva perikarpa (Slika 11).

U zavisnosti u kojoj fenološkoj fazi obrazovanja mahuna je došlo do infekcije registrovana je zakržljalost semena, ili prenošenje zaraze sa mahune na seme. Na semenu su uočavane tamne ulegnute pege ili je seme bilo bez vidljivih simptoma (Slika 12B).



Slika 5. Simptomi pegavosti na svim nadzemnim delovima biljke graška prouzrokovani gljivom *D. pinodes*



Slika 6. Simptomi nekrotične pegavosti na stablu graška prouzrokovani gljivom *D. pinodes*



Slika 7. Poleganje biljaka graška izazvano gljivama iz *Ascochyta* spp. kompleksa



Slika 8. Eliptične pege na lisnim i cvetnim drškama graška prouzrokovani gljivama *D. pinodes* i *A. pisi*



Slika 9. Pegavost lista graška prouzrokovana gljivama iz *Ascochyta* spp. kompleksa



Slika 10. Piknidi gljive *A. pisi* na cvetu graška



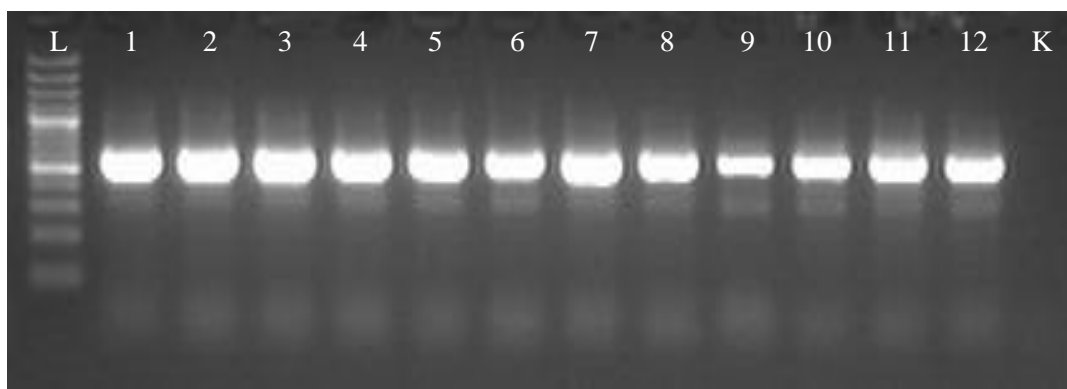
Slika 11. Pegavost mahuna graška izazvana gljivom *A. pisi*



Slika 12. Pegavost na mahunama (A) i semenu graška (B) prouzrokovana gljivom *A. pisi*

6.2. Amplifikacija ITS regiona ispitivanih izolata *Didymella pinodes*, *Didymella pinodella* i *Ascochyta pisi*

PCR reakcija sa prajmerima ITS1 i ITS4 je dovela do umnožavanja fragmenta ITS regiona kod svih ispitivanih izolata, uključujući i referentne (K18, K17 i K6). Dužina produkata amplifikacije, iznosila je od 540 bp, dok kod negativne kontrole nije došlo do amplifikacije (Slika 13). PCR produkti su zatim prečišćeni i poslani na sekvenciranje u Macrogen Inc.



Slika 13. Produkti amplifikacije ITS regiona izolata *D. pinodes* (1 - K18, 2 - K530, 3 - K528, 4 - K514), *D. pinodella* (5 - K17, 6 - K63, 7 - K388, 8 - K60), *A. pisi* (9 - K6, 10 - K505, 11 - K21, 12 - K22). L –100 bp DNK lestvica. K-negativna kontrola

6.2.1. Analiza sekvenci ITS regiona izolata *Ascochyta* spp.

Nakon procene kvaliteta i čistoće dobijenih sekvenci ITS fragmenata testiranih izolata *Ascochyta* spp. (Slika 14), sekvence su stavljene u FASTA format (primer - izolat K21):

>K21

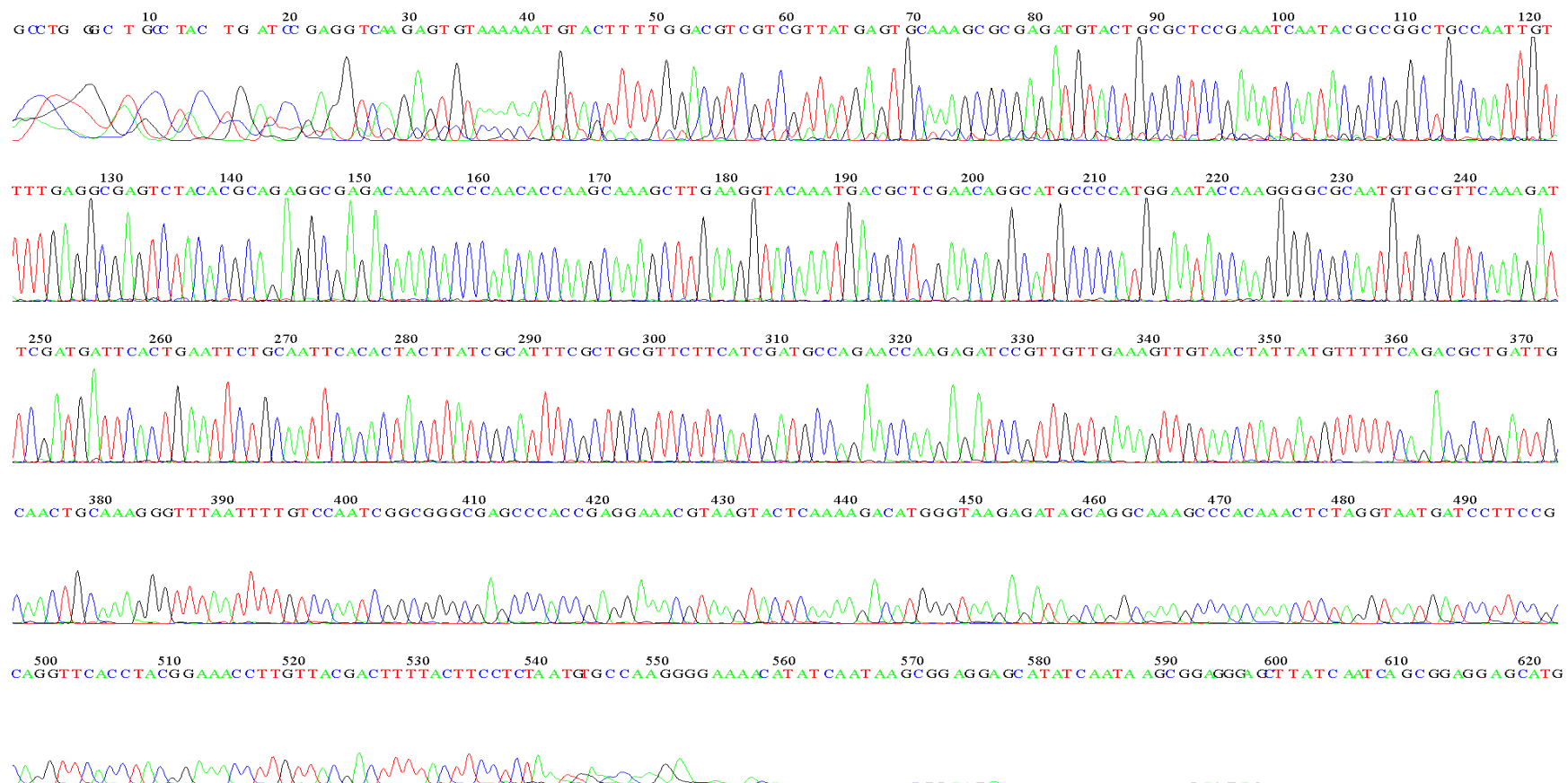
```
TGTACTTTTGGACGTCGTCGTTATGAGTGCAAAGCGCGAGATGTACTGCGCTCCGAAATC
AATACGCCGGCTGCCAATTGTTTTGAGGCGAGTCTACACGCAGAGGCGAGACAAACACC
CAACACCAAGCAAAGCTTGAAGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCATGGAAT
ACCAAGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACAC
TACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAA
GTTGTAACTATTATGTTTTTCAGACGCTGATTGCAACTGCAAAGGGTTTAATTTTGTCCAA
TCGGCGGGGCGAGCCCACCGAGGAAACGTAAGTACTCAAAGACATGGGTAAGAGATAGC
AGGCAAAGCCCACAACTCTAGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAACCTTG
TTACGACTTTTA
```

Zatim su primenom BLAST algoritma (eng. Basic Local Alignment Search Tool) upoređivane sa odgovarajućim sekvencama u međunarodnoj bazi podataka GeneBank (NCBI). Na osnovu procenta poklapanja sa sekvencama u bazi ustanovljen je identitet ITS sekvenci što se može videti na datom primeru kod izolata K21 (Tabela 8). Kod ovog izolata, utvrđen je maksimalan i ukupan rezultat poravnanja od 907 nukleotida sa sekvencom pod GenBank brojem EU167557.1 (*A. pisi*). Takođe, dobijeni rezultati ukazuju da je sekvenca izolata K21 imala pokrivenost kao i identičnost od 100% sa napred navedenom sekvencom. Detaljnije statističko poravnanje izolata K21 sa sekvencom EU167557.1 dato je u Tabeli 9.

Pored poklapanja sa sekvencom EU167557.1, uočena su i poklapanja sa drugim sekvencama, pri čemu su maksimalni i ukupani rezultat poravnanja imali od 5 do 17 nukleotida manje u odnosu na poklapanja sa prvom sekvencom (Tabela 8). Pokrovnost se kretala od 98 do 100%, pri čemu je identičnost bila 99%. Identifikacija izolata *Ascochyta* spp. na osnovu ITS sekvenci je prikazana u Tabeli 12.

ITS sekvence svih izolata, osim referentnih (K18, K17 i K6) i izolata K534 i K33, su prijavljene i prihvaćene u GenBank. ITS sekvence izolata K534 i K33, nisu prijavljene u GenBank zbog nemogućnosti da se dobiju sekvenca dovoljno dobre čistoće.

Spisak priznatih sekvenci se nalazi u Prilogu 2 doktorata.



Slika 14. Grafički prikaz ITS sekvence izolata K21.

Tabela 8. Rezultati BLAST analize, izolat K21

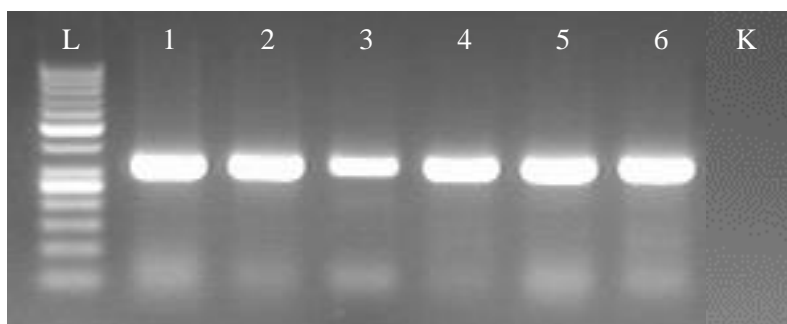
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Ascochyta pisi</i> strain CBS 108.26 small subunit ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	907	907	100%	0.0	100%	EU167557.1
<i>Ascochyta viciae-pannonicae</i> strain CBS 254.92 small subunit ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	902	902	100%	0.0	99%	EU167559.1
<i>Ascochyta viciae-villosae</i> strain CBS 255.92 small subunit ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	896	896	100%	0.0	99%	EU167560.1
<i>Didymella pisi</i> 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	885	885	98%	0.0	99%	GU722316.1
<i>Pleosporales</i> sp. s073 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	880	880	99%	0.0	99%	HQ649950.1

Tabela 9. Statističko poravnanje sekvence izolata K21 sa EU167557.1 sekvencom (*Ascochyta pisi* strain CBS 108.26 small subunit ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence)

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	907 bites (491)	0.0	491/491 (100%)	0/491 (0%)	Plus/Minus
Query 1	TGTACTTTTGGACGTCGTCGTTATGAGTGCAAAGCGCGAGATGTACTGCGCTCCGAAATC				60
Sbjct 2134	TGTACTTTTGGACGTCGTCGTTATGAGTGCAAAGCGCGAGATGTACTGCGCTCCGAAATC				2075
Query 61	AATACGCCGGCTGCCAATTGTTTTGAGGCGAGTCTACACGCAGAGGCGAGACAAACACCC				120
Sbjct 2074	AATACGCCGGCTGCCAATTGTTTTGAGGCGAGTCTACACGCAGAGGCGAGACAAACACCC				2015
Query 121	AACACCAAGCAAAGCTTGAAGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCATGGAATAC				180
Sbjct 2014	AACACCAAGCAAAGCTTGAAGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCATGGAATAC				1955
Query 181	CAAGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACACTA				240
Sbjct 1954	CAAGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACACTA				1895
Query 241	CTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAG				300
Sbjct 1894	CTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAG				1835
Query 301	TTGTAAC TATTATGTTTTTTCAGACGCTGATTGCAACTGCAAAGGGTTAATTTTGTCCAA				360
Sbjct 1834	TTGTAAC TATTATGTTTTTTCAGACGCTGATTGCAACTGCAAAGGGTTAATTTTGTCCAA				1775
Query 361	TCGGCGGGCGAGCCACCGAGGAAACGTAAGTACTCAAAGACATGGGTAAGAGATAGCA				420
Sbjct 1774	TCGGCGGGCGAGCCACCGAGGAAACGTAAGTACTCAAAGACATGGGTAAGAGATAGCA				1715
Query 421	GGCAAAGCCCACAACTCTAGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGT				480
Sbjct 1714	GGCAAAGCCCACAACTCTAGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGT				1655
Query 481	TACGACTTTTA 491				
Sbjct 1654	TACGACTTTTA 1644				

6.3. Amplifikacija TEF₁- α gena ispitivanih izolata *Didymella pinodes*, *Didymella pinodella* i *Ascochyta pisi*

PCR reakcija sa prajmerima EF₁-728 i EF₁-986 je dovela do umnožavanja fragmenata TEF₁- α gena kod svih ispitivanih izolata, uključujući i referentne (K18, K17 i K6). Dužina produkata amplifikacije, iznosila je od 330 bp, dok kod negativne kontrole nije došlo do amplifikacije (Slika 15). PCR produkti su zatim prečišćeni i poslani na sekvenciranje u Macrogen Inc.



Slika 15. Produkti amplifikacije TEF₁- α gena, izolata *D. pinodes* (1 - K18, 2 - K530), *D. pinodella* (3 - K17, 4 - K63), *A. pisi* (5 - K6, 6 - K21). L – 50 bp DNK lestvica. K- negativna kontrola

6.3.1. Analiza sekvenci TEF₁- α gena izolata *Ascochyta* spp.

Kvalitet i čistoća dobijenih TEF sekvenci testiranih izolata *Ascochyta* spp. su provereni (Slika 16), a nakon toga, napravljeni su FASTA formati sekvenci (primer - izolat K21):

```
>K21
ACACGCCCCGCATCTGCGATCTTTGAGCGAGCCGCCTCTCTTGGGGCTTATCGCTCATTGAG
GGGCATTTTTGGTGGGGTTGTGCGAGCTTTTCGCGCACTAGCGCTAGTCCGTTTCGGGCGC
TCGCCAACTCCAACACCATGCCCCACATCGCTTTTTCGATCGCGAGCTTCTTGACTTCAGC
CAAGGGCTGCAGCACCCCTTCGCCACTTCACCACCAGCCTTCACAATGCTAACAACCCTCA
CAGGAAGCCGCCGAACCTCGGTAAGGGTCCCTTCAAGTAA
```

Sekvence u FASTA formatu su zatim primenom BLAST algoritma upoređivane sa odgovarajućim sekvencama u međunarodnoj bazi podataka GeneBank (NCBI). Na osnovu procenta poklapanja sa sekvencama u bazi ustanovljen je identitet TEF sekvenci što se može videti na datom primeru kod izolata K21 (Tabela 11). Kod ovog izolata, utvrđen je maksimalan i ukupan rezultat poravnanja od 503 nukleotida sa sekvencom DQ386494.1 (*A. pisi*). Takođe,

dobijeni rezultati ukazuju da je sekvenca izolata K21 imala pokrivenost od 97% kao i identičnost od 99% sa napred navedenom sekvencom. Detaljnije statističko poravnanje izolata K21 sa sekvencom DQ386494.1 dato je u Tabeli 10.

Pored poklapanja sa sekvencom DQ386494, uočena su i poklapanja sa drugim sekvencama, pri čemu su maksimalni i ukupani rezultat poravnanja imali od 11 do 19 nukleotida manje u odnosu na poklapanja sa prvom sekvencom (Tabela 11). Pokrovnost se kretala od 97 do 100%, pri čemu je identičnost bila od 98 do 99%. Identifikacija izolata *Ascochyta* spp. na osnovu TEF sekvenci je prikazana u Tabeli 12.

TEF sekvence izolata K60, K388, K63 i K504 su prijavljene u GenBank, a njihov spisak se nalazi u Prilogu 2 doktorata. Sekvence ostalih izolata biće prijavljene u narednom periodu.

Tabela 10. Statističko poravnanje sekvence izolata K21 sa DQ386494 sekvencom (*Ascochyta pisi* strain AP2 translation elongation factor 1 alpha gene, partial cds)

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	503 bites (272)	1e-138	274/275 (99%)	0/275 (0%)	Plus/Minus
Query	1	ACACGCCCGCATCTGCGATCTTTGAGCGAGCCGCCTCTCTTGGGGCTTATCGCTCATTGA	60		
Sbjct	31	ACACGCCCGCATCTGCGATCTTTGAGCGAGCCGCCTCTCTTGGGGCTTATCGCTCATTGA	90		
Query	61	GGGGCATT TTTGGTGGGGTTGTGCGAGCTTTTCGCGCACTAGCGCTAGTCCGTTTCGGGC	120		
Sbjct	91	GGGGCATT TTTGGTGGGGTTGTGCGAGCTTTTCGCGCACTAGCGCTAGTCCGTTTCGGGC	150		
Query	121	GCTCGCCA AACTCCAACACCATGCCCCACATCGCTTTTTCGATCGCGAGCTTCTTGACTTC	180		
Sbjct	151	GCTCGCCA AACTCCAACACCATGCCCCACATCGCTTTTTCGATCGCGAGCTTCTTGACTTC	210		
Query	181	AGCCAAGGGCTGCAGCACCTTCGCCACTTCACCACCAGCCTTCACAATGCTAACAACCC	240		
Sbjct	211	AGCCAAGGGCTGCAGCACCTTCGCCACTTCACCACCAGCCTTCACAATGCTAACAACCC	270		
Query	241	TCACAGGAAGCCGCCGA AACTCGGTAAGGGTCCCTT	275		
Sbjct	271	TCACAGGAAGCCGCCGA AACTCGGTAAGGGTCCCTT	305		

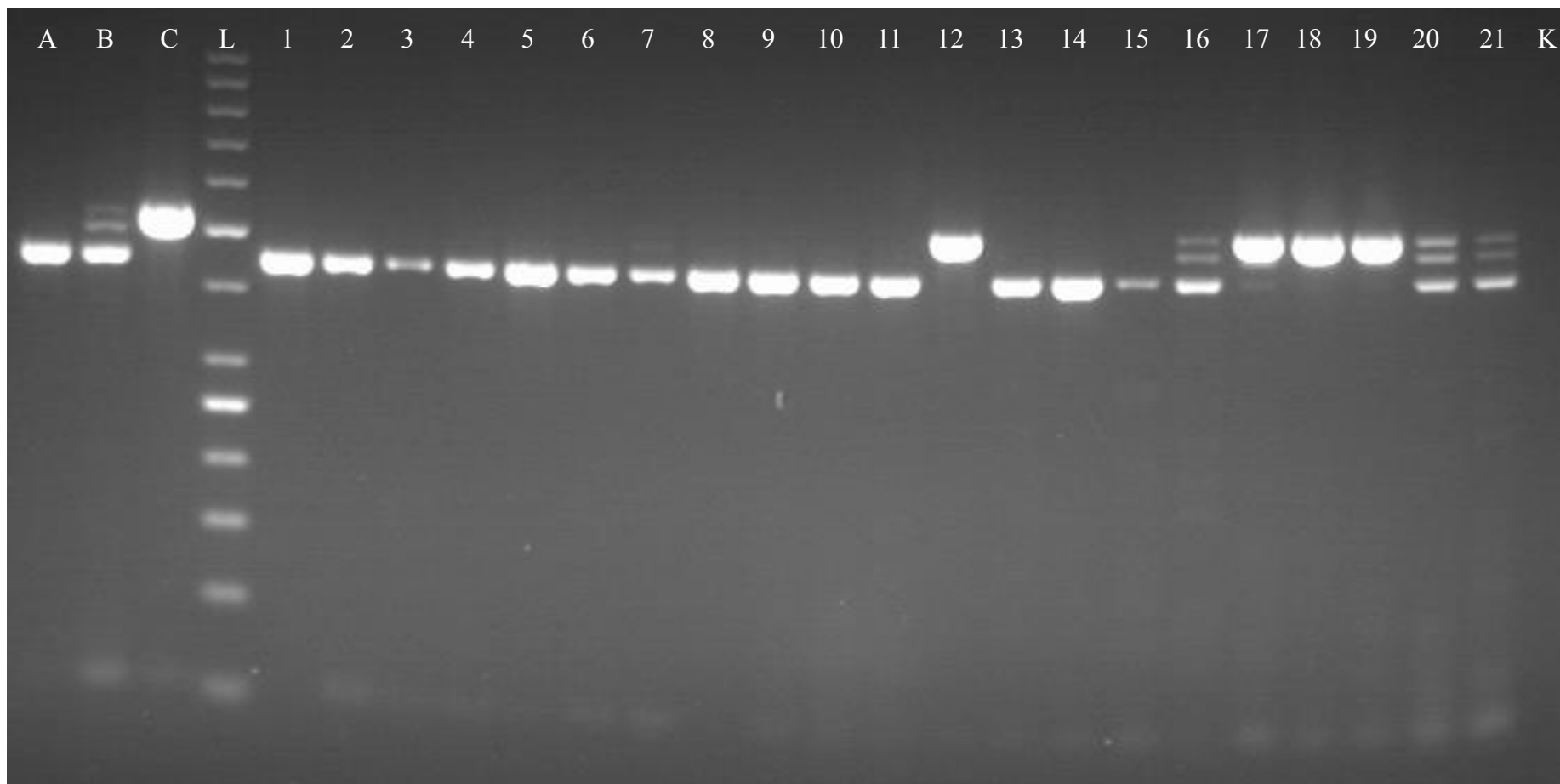
Tabela 11. Rezultati BLAST analize, izolat K21

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Ascochyta pisi</i> strain AP2 translation elongation factor 1 alpha gene, partial cds	503	503	97%	1e-138	99%	DQ386494.1
<i>Ascochyta</i> sp. Georgia12 translation elongation factor 1 alpha gene, partial cds	492	492	97%	3e-135	99%	DQ386496.1
<i>Ascochyta</i> sp. Georgia16 translation elongation factor 1 alpha gene, partial cds	486	486	97%	1e-133	99%	DQ386506.1
<i>Ascochyta pisi</i> strain Iran 2437 C translation elongation factor 1-alpha gene, partial cds	484	484	100%	4e-133	98%	KX033391.1
<i>Ascochyta pisi</i> strain CBS 136887 translation elongation factor 1-alpha gene, partial cds	484	484	100%	4e-133	98%	KX033390.1

6.4. Primena IGS1 markera u identifikaciji izolata *Ascochyta* spp.

Amplifikacijom specifičnim prajmerima izolata *D. pinodes*, *D. pinodella* i *A. pisi*, dobijeni su PCR produkti različitih veličina (Slika 17), usled različitih insercija i delecija u umnoženom genskom fragmentu (dr C. Le May lična komunikacija). Dobijeni su fragmenti sledećih veličina: 450-470bp (*D. pinodes*), 520-530bp (*D. pinodella*), dok su kod vrste *A. pisi* dobijena tri PCR produkta veličine: 450bp, 500bp i 530bp. Kod negativne kontrole nije došlo do amplifikacije.

Poređenjem PCR produkata ispitivanih izolata sa produktima amplifikacije referentnih izolata (K18, K17 i K6) omogućena je njihova nedvosmislena identifikacija (Tabela 12).



Slika 17. Produkti amplifikacije IGS1 markera, izolata *D. pinodes* (1- K45, 2 – K527, 4 – K52, 5 – K497, 6 - K4, 8 – K517, 9 - K-514, 10 - K34, 11- K530, 13 – K528, 14 – K490), *D. pinodella* (12 - K63, 17 - K60, 18 - K388, 19 - K171), *A. pisi* (3 – K500, 15 - K505, 16 – K21, 20 – K22, 21 – K22). Referentni izolati: A- K18, B-K6, C-K17. L – 50 bp DNK lestvica. K-negativna kontrola

Tabela 12. Identifikacija izolata primenom različitih markera

Redni broj izolata	Šifra izolata	ITS	TEF1- α	IGS1
1	K379	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>A. pisi</i>	<i>D. pinodes</i>
2	K388	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>D. pinodella</i>	<i>D. pinodella</i>
3	K390	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>D. pinodes</i>	<i>D. pinodes</i>
4	K469	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>D. pinodes</i>	<i>D. pinodes</i>
5	K489	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>
6	K490	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>D. pinodes</i>	<i>D. pinodes</i>
7	K491	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>D. pinodes</i>	<i>D. pinodes</i>
8	K492	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>D. pinodes</i>	<i>D. pinodes</i>
9	K496	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>A. pisi</i>	<i>D. pinodes</i>
10	K497	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>A. pisi</i>	<i>D. pinodes</i>
11	K498	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>D. pinodes</i>	<i>D. pinodes</i>
12	K499	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>
13	K500	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>
14	K501	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>
15	K502	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>
16	K503	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>
17	K504	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>
18	K505	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>
19	K506	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>
20	K507	<i>A. pisi</i>	<i>D. pinodella</i>	<i>A. pisi</i>
21	K508	<i>D. pinodes</i>	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>
22	K509	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>D. pinodes</i>	<i>D. pinodes</i>
23	K511	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>D. pinodes</i>	<i>D. pinodes</i>
24	K512	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>D. pinodes</i>	<i>D. pinodes</i>
25	K513	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>D. pinodes</i>	<i>D. pinodes</i>
26	K514	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>D. pinodes</i>	<i>D. pinodes</i>
27	K515	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>A. pisi</i>	<i>D. pinodes</i>
28	K516	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>D. pinodes</i>	<i>D. pinodes</i>
29	K517	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>A. pisi</i>	<i>D. pinodes</i>
30	K518	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>D. pinodes</i>	<i>D. pinodes</i>
31	K521	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>D. pinodes</i>	<i>D. pinodes</i>
32	K522	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>D. pinodes</i>	<i>D. pinodes</i>
33	K523	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>
34	K524	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>D. pinodes</i>	<i>D. pinodes</i>
35	K525	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>A. pisi</i>	<i>D. pinodes</i>
36	K526	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>
37	K527	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>A. pisi</i>	<i>D. pinodes</i>
38	K528	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>A. pisi</i>	<i>D. pinodes</i>
39	K529	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>A. pisi</i>	<i>D. pinodes</i>
40	K530	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>A. pisi</i>	<i>D. pinodes</i>
41	K531	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>
42	K532	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>A. pisi</i>	<i>D. pinodes</i>
43	K533	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>
44	K534	---	<i>D. pinodes</i>	<i>A. pisi</i>
45	K535	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>D. pinodes</i>	<i>D. pinodes</i>

Tabela 12. (nastavak)

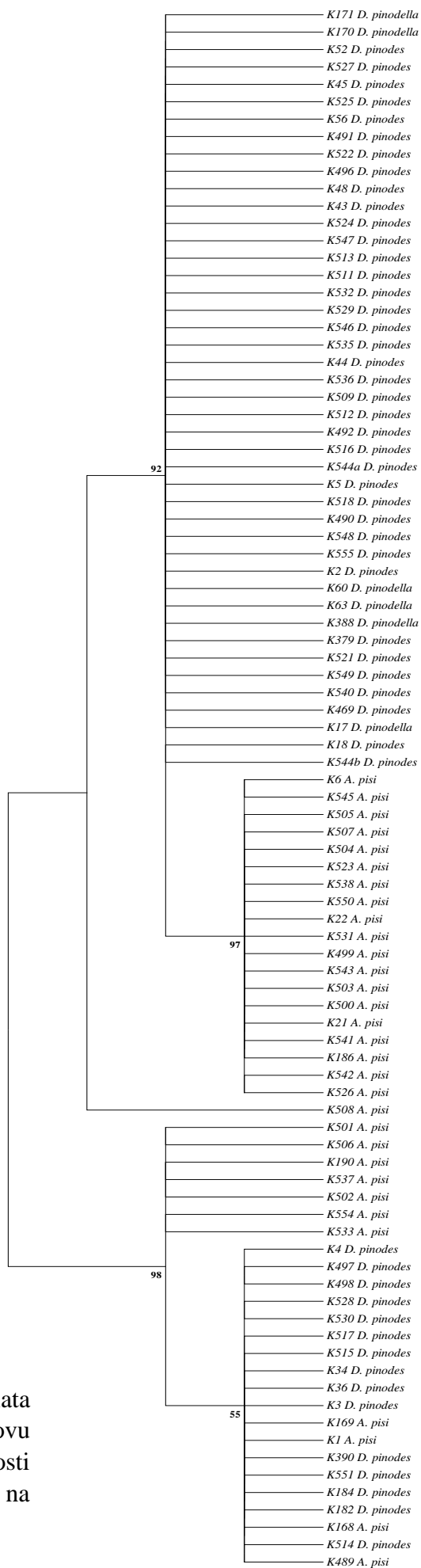
46	K536	<i>D. pinodes/pinodella</i>	---	<i>D. pinodes</i>
47	K537	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>
48	K538	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>
49	K540	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>D. pinodes</i>	<i>D. pinodes</i>
50	K541	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>
51	K542	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>
52	K543	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>
53	K544a	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>D. pinodes</i>	<i>D. pinodes</i>
54	K544b	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>	<i>D. pinodes</i>
55	K545	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>
56	K546	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>A. pisi</i>	<i>D. pinodes</i>
57	K547	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>D. pinodes</i>	<i>D. pinodes</i>
58	K548	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>D. pinodes</i>	<i>D. pinodes</i>
59	K549	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>D. pinodes</i>	<i>D. pinodes</i>
60	K550	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>
61	K551	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>A. pisi</i>	<i>D. pinodes</i>
62	K554	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>
63	K555	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>D. pinodes</i>	<i>D. pinodes</i>
64	K1	<i>D. pinodes /pinodella</i>	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>
65	K2	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>D. pinodes</i>	<i>D. pinodes</i>
66	K3	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>A. pisi</i>	<i>D. pinodes</i>
67	K4	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>A. pisi</i>	<i>D. pinodes</i>
68	K5	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>D. pinodes</i>	<i>D. pinodes</i>
69	K6 *	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>
70	K17 *	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>D. pinodella</i>	<i>D. pinodella</i>
71	K18 *	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>D. pinodes</i>	<i>D. pinodes</i>
72	K21	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>
73	K22	<i>A. pisi</i>	<i>D. pinodes</i>	<i>A. pisi</i>
74	K36	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>A. pisi</i>	<i>D. pinodes</i>
75	K34	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>A. pisi</i>	<i>D. pinodes</i>
76	K43	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>D. pinodes</i>	<i>D. pinodes</i>
77	K44	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>D. pinodes</i>	<i>D. pinodes</i>
78	K45	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>D. pinodes</i>	<i>D. pinodes</i>
79	K48	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>D. pinodes</i>	<i>D. pinodes</i>
80	K52	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>A. pisi</i>	<i>D. pinodes</i>
81	K56	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>D. pinodes</i>	<i>D. pinodes</i>
82	K60	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>A. pisi</i>	<i>D. pinodella</i>
83	K63	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>D. pinodella</i>	<i>D. pinodella</i>
84	K33	---	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>
85	K168	<i>D. pinodella</i>	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>
86	K169	<i>D. pinodella</i>	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>
87	K170	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>D. pinodella</i>	<i>D. pinodella</i>
88	K171	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>D. pinodella</i>	<i>D. pinodella</i>
89	K182	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>D. pinodes</i>	<i>D. pinodes</i>
90	K184	<i>D. pinodes/pinodella</i>	<i>D. pinodes</i>	<i>D. pinodes</i>
91	K186	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>
92	K190	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>	<i>A. pisi</i>

* referentni izolati (K6-CBS 122748; K 17- DSMZ 63393/ATCC 32162; K18-DSMZ 62763)

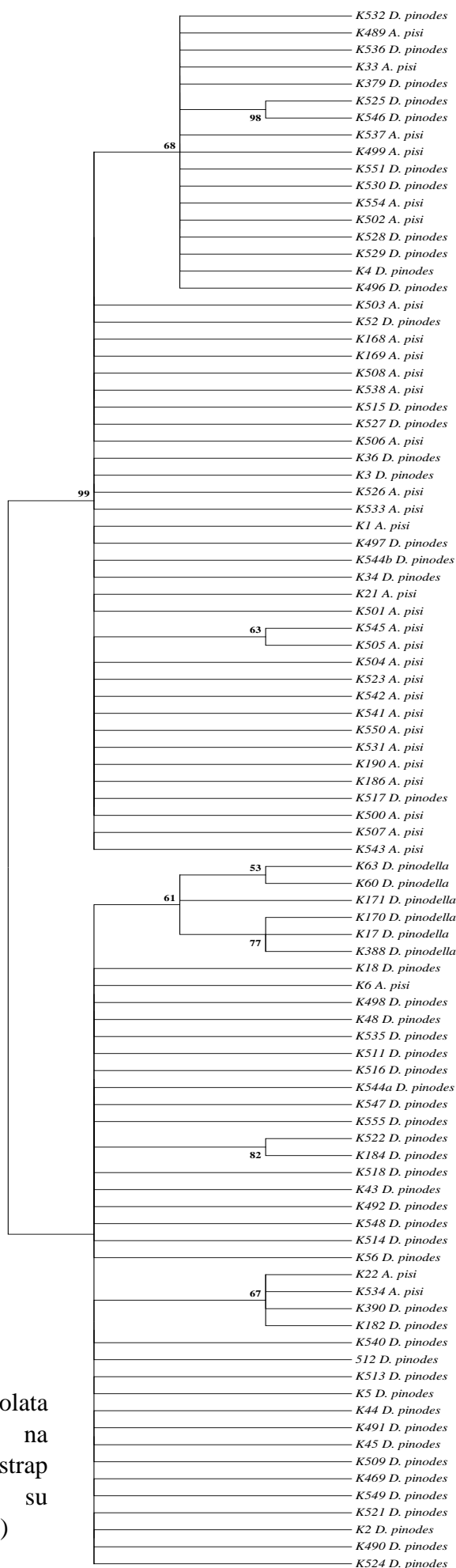
6.5. Filogenetska analiza ITS i TEF sekvenci izolata *Ascochyta* spp.

Dobijene ITS sekvence ispitivanih izolata poslužile su za početnu identifikaciju vrsta u okviru *Ascochyta* kompleksa. Filogenetskom analizom ITS sekvenci rDNK regiona *Ascochyta* spp. dobijene su grane sa visokim bootstrap vrednostima. Između vrsta *D. pinodes*, i *D. pinodella* uočena je filogenetska bliskost. Takođe, većina izolata, *A. pisi* je formirala klastere sa visokim bootstrap vrednostima i jasno se distancirala od *D. pinodes* i *D. pinodella*, sa izuzetkom izolata K169, K1, K168 i K489 koji su pokazali filogenetsku sličnost sa navedenim vrstama (Tabela 12 i Slika 18). Izolati *A. pisi* poreklom iz Bosne i Hercegovine, Francuske i Turske su se grupisali sa izolatima iste vrste poreklom iz Srbije, što je u potpunosti u saglasnosti sa njihovom identifikacijom.

Analiza TEF₁- α sekvenci je omogućila bolju identifikaciju vrsta iz *Ascochyta* kompleksa. Na osnovu filogenetske analize TEF₁- α sekvenci bilo je moguće izdvojiti vrstu *D. pinodella* od *D. pinodes* i *A. pisi*. Međutim, nije bilo moguće razdvojiti *D. pinodes* od *A. pisi* (Tabela 12 i Slika 19). Izolati *D. pinodella* poreklom iz i Turske su se grupisali sa izolatima iste vrste poreklom iz Srbije, što je u potpunosti u saglasnosti sa njihovom identifikacijom.



Slika 18. Filogenetsko stablo izolata *Ascochyta* spp. zasnovano na osnovu ITS sekvenci. (Bootstrap vrednosti (1000 replikacija) su prikazane na mestima grananja).

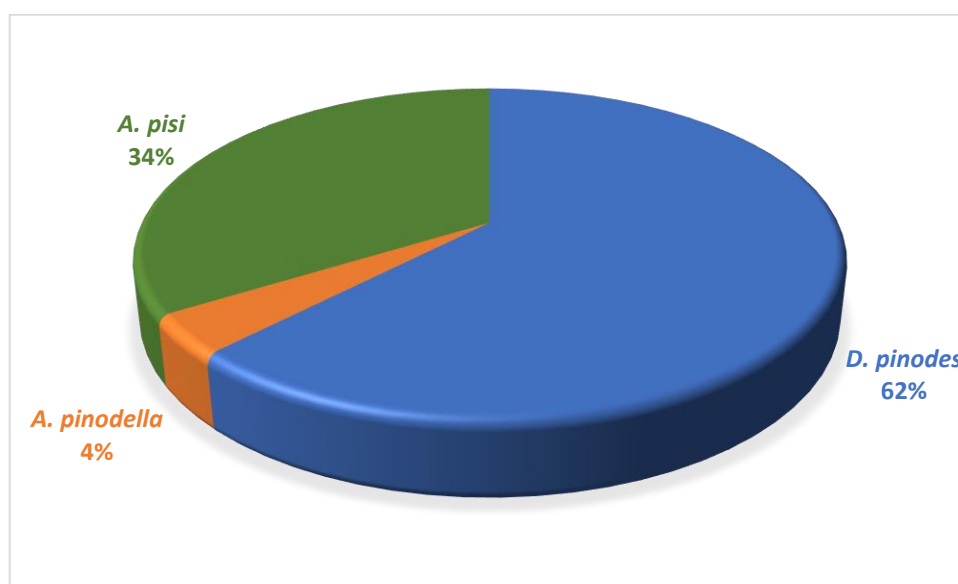


Slika 19. Filogenetsko stablo izolata *Ascochyta* spp. zasnovano na osnovu TEF sekvenci. (Bootstrap vrednosti (1000 replikacija) su prikazane na mestima grananja.)

6.6. Zastupljenost *Ascochyta* vrsta u prikupljenim uzorcima

Tokom trogodišnjeg istraživanja u periodu od 2013. do 2015. godine, na 27 različitih lokaliteta u Srbiji, kao i po jednim lokalitetom u Bosni i Hercegovini, Turskoj i Francuskoj, sakupljeno je i molekularno identifikovano ukupno 89 izolata *Ascochyta* spp., od toga, 77 izolata je poreklom iz Srbije, 4 iz Bosne i Hercegovine, 3 iz Turske i 5 iz Francuske. Od ukupnog broja sakupljenih izolata poreklom iz Srbije, 48 (62%) je identifikovano kao *D. pinodes*, 26 (34%) kao *A. pisi* i 3 (4%) kao *D. pinodella* (Grafikon 1).

Svi izolati (K501, K502, K503 i K504) poreklom iz Bosne i Hercegovine, kao i po jedan izolat iz Turske (K33) i Francuske (K1) pripadaju vrsti *A. pisi*. Ostali izolati (K60 i K63) poreklom iz Turske pripadaju vrsti *D. pinodella*, dok izolati (K2, K3, K4 i K5) iz Francuske pripadaju vrsti *D. pinodes*.

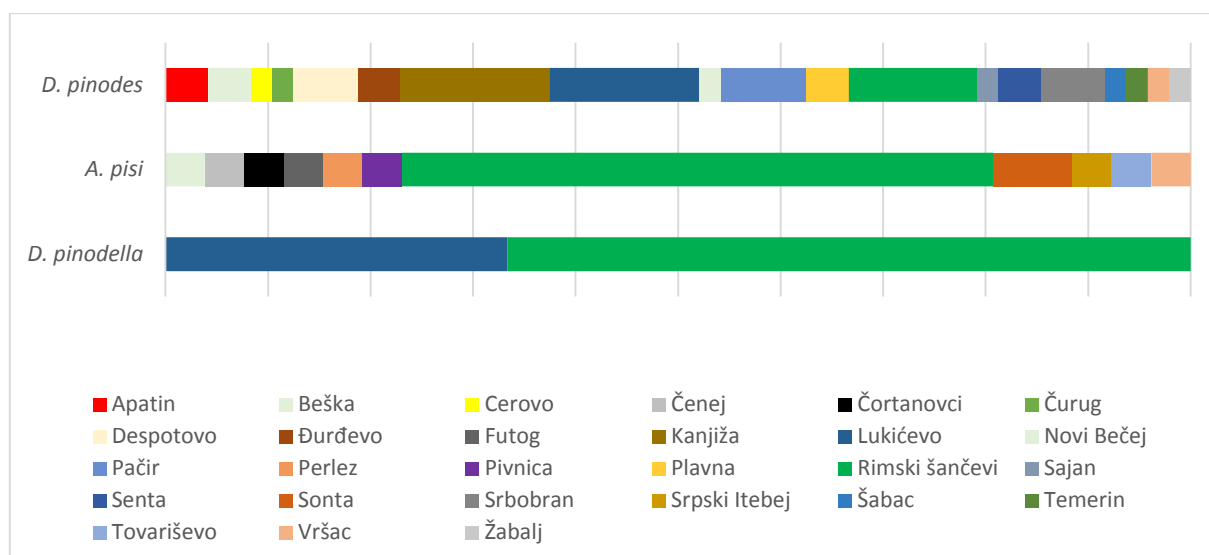


Grafikon 1. Procentualni udeo *Ascochyta* vrsta u ispitivanim izolatima poreklom iz Srbije

Od 27 ispitivanih lokaliteta na teritoriji Srbije, samo na 8 lokaliteta (Čenej, Čortanovci, Futog, Perlez, Pivnica, Sonta, Srpski Itebej i Tovariševo) nije utvrđeno prisustvo *D. pinodes*. Prisustvo vrste *A. pisi* nije utvrđeno na 16 lokaliteta (Apatin, Cerovo, Čurug, Despotovo, Đurđevo, Kanjiža, Lukićevo, Novi Bečej, Pačir, Plavna, Sajjan, Senta, Srbobran, Šabac, Temerin, Žabalj), dok je *D. pinodella* izolovana na dva lokaliteta – Lukićevo i Rimski šančevi.

Jedino je na lokalitetu Rimski šančevi, potvrđeno prisustvo sve tri vrste iz *Ascochyta* kompleksa (Grafikon 2).

Pored napred navedenih vrsta iz *Ascochyta* kompleksa na ispitivanim lokalitetima nije utvrđeno prisustvo vrste *Phoma koolunga*.



Grafikon 2. Zastupljenost *Ascochyta* vrsta na 27 lokaliteta u Srbiji

6.7. Uticaj svetlosti, temperature i hranljivih podloga na brzinu porasta izolata *Ascochyta* spp.

Varijabilnost u brzini porasta je uočena kod svih testiranih izolata *Ascochyta* spp., gajenih na različitim hranljivim podlogama pod različitim svetlosno-temperaturnim režimima.

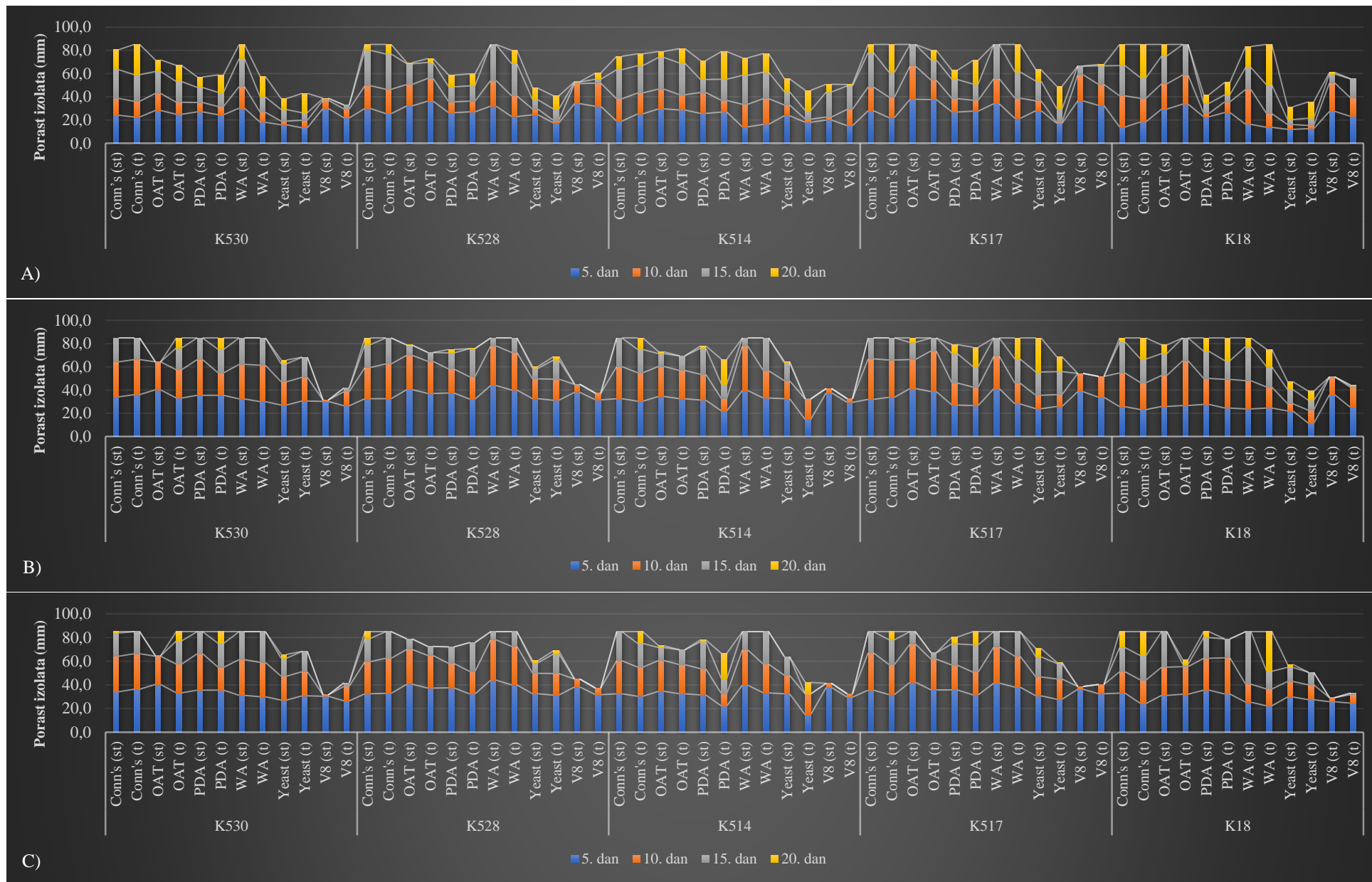
6.7.1. Uticaj svetlosti, temperature i hranljivih podloga na brzinu porasta izolata vrste *Didymella pinodes*

Svi testirani izolati *D. pinodes* su na 15°C ostvarili najveću brzinu porasta od 1-5. dana inkubacije, osim izolata K514 na WA i referentnog izolata K18 na Conn's i WA (st) hranljivim podlogama. Maksimalan porast do 15. dana inkubacije je registrovan kod izolata K528 na WA (st), K517 na OAT (st) i WA (st), i K18 na OAT (t), dok je zaustavljanje razvoja registrovano na V8 podlogama u tami kod K530 i referentnog izolata K18, kao i kod izolata K517 (st).

Većina testiranih izolata nije dostigla maksimalan porast za 20 dana inkubacije, osim K530 na Conn's (t) i WA (st), K528 na Conn's, K517 na Conn's i WA i K18 na Conn's, OAT (st) i WA (Grafikon 3A).

Na 20°C najveća brzina porasta kolonija svih testiranih izolata *D. pinodes* je registrovana od 1-5. dana sa izuzetkom K514 na Yeast (t). Već 10. dana inkubacije je registrovano zaustavljanje razvoja (bez ostvarenog maksimalnog porasta) na V8 hranljivim podlogama kod svih testiranih izolata, kao i na Yeast (t) kod izolata K514. Do 20. dana inkubacije maksimalan porast kolonija nije registrovan na OAT, Yeast i V8 podlogama za izolate K528, K514 i K18, odnosno na Yeast i V8 za izolate K530 i K517 (Grafikon 3B).

Na 25°C je uočeno kao i na 20°C da je najveća brzina porasta kolonija *D. pinodes* bila od 1-5. dana izuzev kod izolata K514 na Yeast (t) hranljivoj podlozi gde je porast od 5-10 dana bio nešto veći. Takođe, kao i na prethodnoj temperaturi, već 10. dana je registrovano zaustavljanje razvoja svih testiranih izolata na V8 podlozi. Slično prethodnoj temperaturi, maksimalan porast do 20. dana inkubacije nije ostvaren na OAT, Yeast i V8 podlogama kod izolata K530, K517 i K18, odnosno na OAT, PDA, Yeast, i V8 kod izolata K528 i K514 (Grafikon 3C).



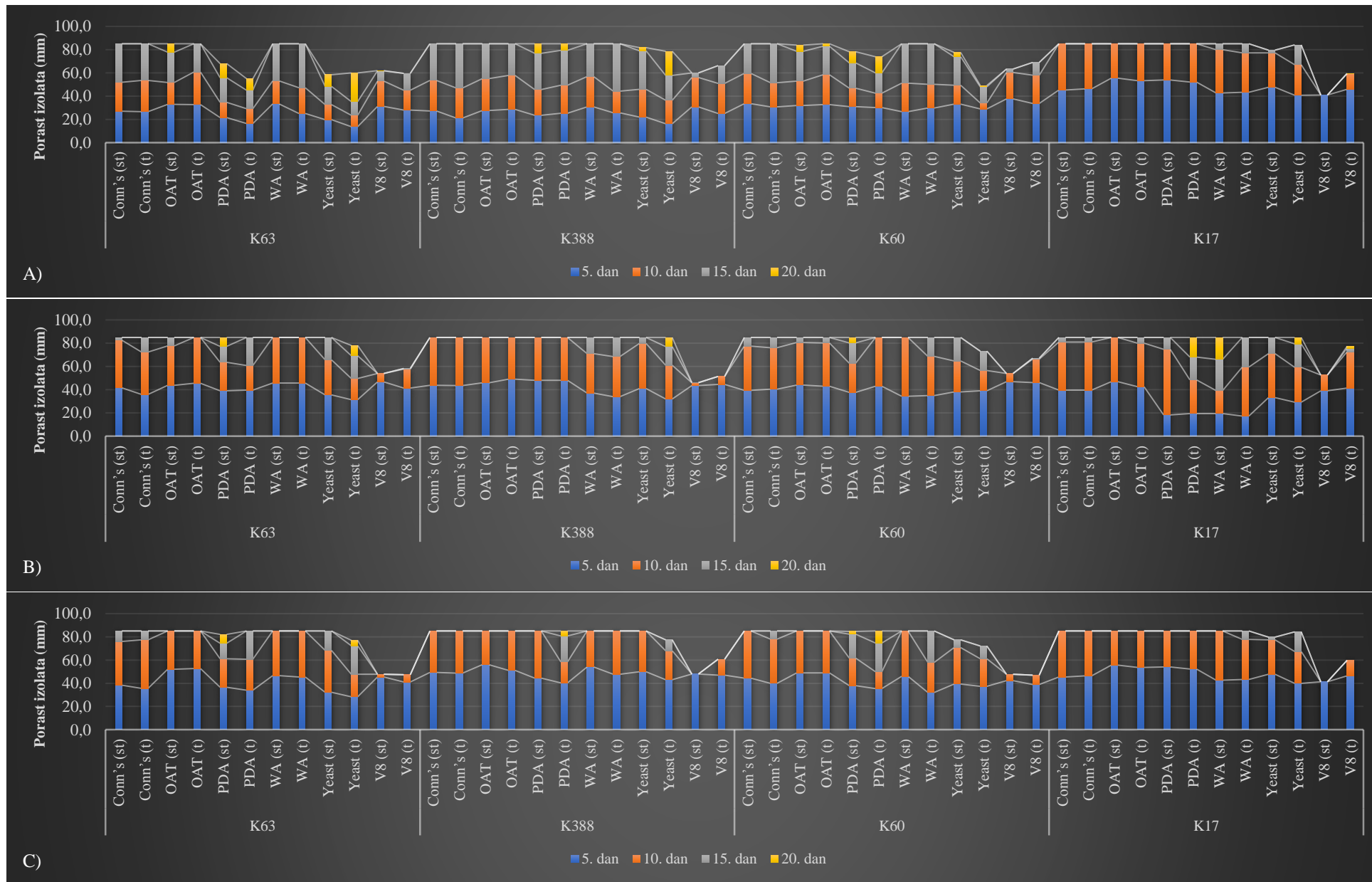
Grafikon 3. Petodnevni porast izolata *D. pinodes* na 15°C (A), 20°C (B), 25°C (C); (st)-12/12h svetlo-tama, (t)-24h tama

6.7.2. Uticaj svetlosti, temperature i hranljivih podloga na brzinu porasta izolata vrste *Didymella pinodella*

Svi testirani izolati *D. pinodella* su na 15°C ostvarili najveću brzinu porasta od 1 do 5. dana, s tim što je referentni izolat K17 ostvario najveći porast u odnosu na ostale testirane izolate. Referentni izolat je na hranljivim podlogama Conn's, OAT i PDA, već 10. dana postigao maksimalan porast, dok su ostali testirani izolati ostvarili maksimalan porast do 15. dana inkubacije na podlogama Conn's, WA i V8. Na podlogama OAT, PDA i Yeast su ovi izolati ostvarili maksimalan porast između 15-20. dana inkubacije (Grafikon 4A).

Na 20°C je najveći porast testiranih izolata *D. pinodella* ostvaren od 1-5. dana, s tim što je referentni izolat K17 na PDA i WA hranljivim podlogama odstupao od ovoga i ostvario najveći porast u periodu od 5-10. dana inkubacije. Slična brzina porasta je registrovana i od 5-10. dana inkubacije, i čak je kod izolata K63 (OAT (t), WA), K388 (Conn's, OAT i PDA), K60 (PDA (t) i WA (st)) i K17 (OAT (st)) ostvaren maksimalan porast do 10. dana inkubacije, dok su na V8 podlogama ovi izolati zaustavili razvoj uključujući i referentni izolat K17 na V8 (st). Porast do 20. dana je registrovan kod izolata K63 na PDA (st) i Yeast (t), K388 na Yeast (t), K60 na PDA (st) i K17 na PDA (t), WA (st), Yeast (t) i V8 (t) hranljivim podlogama (Grafikon 4B).

Na 25°C su svi izolati *D. pinodella* na svim testiranim hranljivim podlogama ostvarili najveću brzinu porasta od 1-5. dana, sa izuzetkom K60 na Conn's (t) i WA (t). Petog dana inkubacije je na V8 podlozi u tami registrovano da su izolati K388 i K17 u potpunosti zaustavili razvoj, dok su svi ostali izolati u oba režima zaustavili razvoj na V8 podlogama do 10. dana inkubacije. Maksimalan porast 10. dana je ostvaren kod izolata K63 na OAT i WA podlogama, K388 na Conn's, OAT, PDA (st), WA i Yeast (st), K60 na Conn's (st), OAT i WA (st), K17 na Conn's, OAT, PDA i WA (st). Izolati K63 na PDA (st) i Yeast (t), K388 na PDA (t) i K60 na PDA su nastavili razvoj do 20. dana inkubacije (Grafikon 4C).



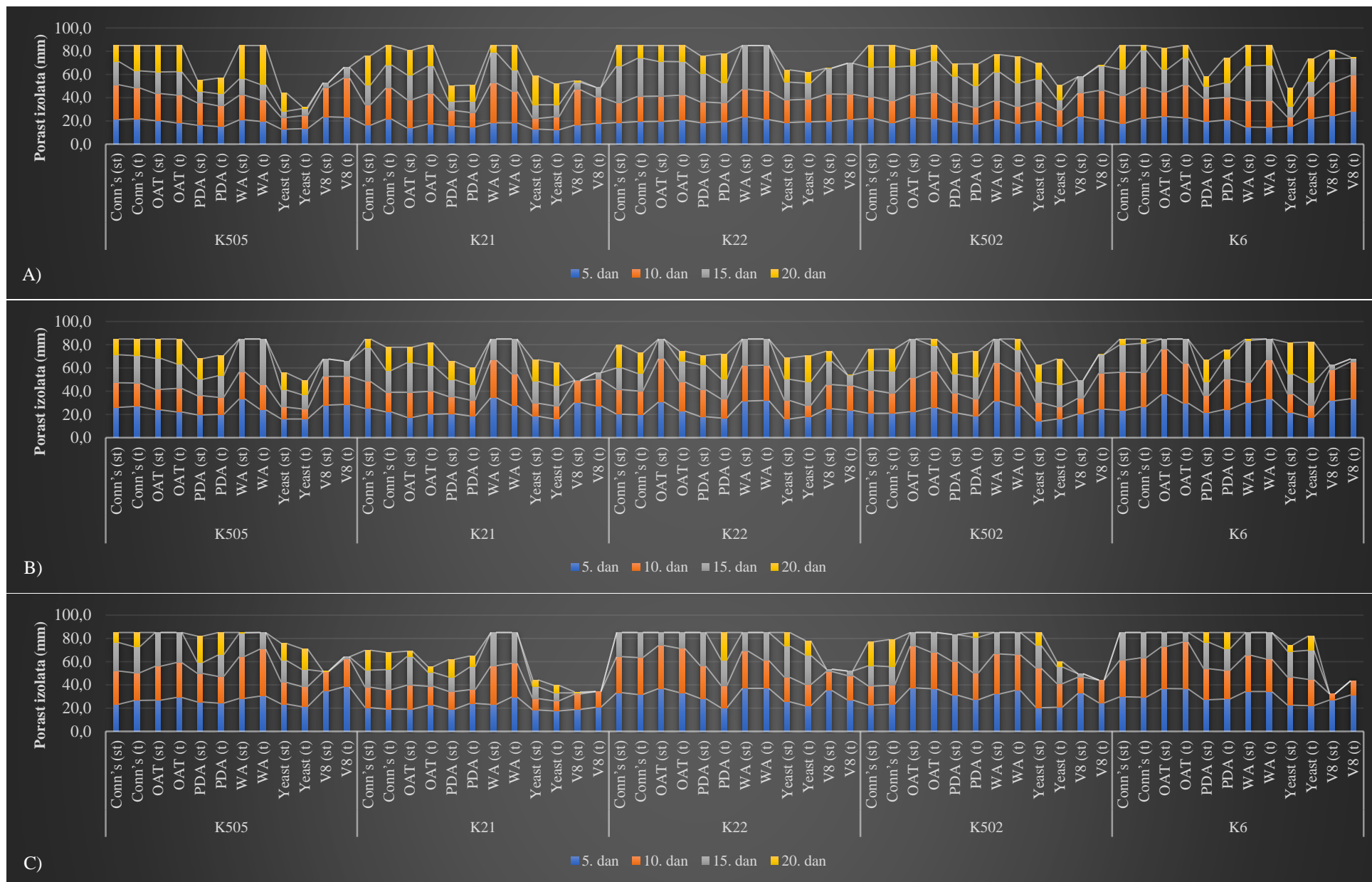
Grafikon 4. Petodnevni porast izolata *D. pinodella* na 15°C (A), 20°C (B), 25°C (C); (st)-12/12h svetlo-tam, (t)-24h tama

6.7.3. Uticaj svetlosti, temperature i hranljivih podloga na brzinu porasta izolata vrste *Ascochyta pisi*

Na 15°C najveća brzina porast izolata *A. pisi* je registrovan do 10. dana inkubacije. Maksimalan porast do 15. dana inkubacije je ostvario samo izolat K22 na WA podlozi, a do 20. dana su maksimalan porast ostvarili na Conn's, OAT i WA hranljivim podlogama izolati K505, K21 i K22. Do 15. dana inkubacije, svi testirani izolati *A. pisi* su obustavili razvoj kolonija na podlogama PDA, Yeast i V8, s tim što je referentni izolat K18 na ovim podlogama razvoj obustavio do 20. dana inkubacije (Grafikon 5A).

Svi testirani izolati *A. pisi* su ostvarili najveći porast do 10. dana inkubacije na temperaturi od 20°C. Do 15. dana inkubacije maksimalan porast je registrovan kod svih testiranih izolata na WA hranljivoj podlozi (izuzev izolata K502 na WA (t)). Kod svih testiranih izolata, osim kod izolata K22 i K502 (t) na V8 hranljivoj podlozi je zaustavljen razvoj do 15. dana inkubacije. Do 20. dana inkubacije maksimalan porast je registrovan kod svih testiranih izolata na WA hranljivoj podlozi, kao i kod K505 na Conn's i OAT podlogama, K21 na Conn's (st), K22 na OAT (st), K502 na OAT, kao i referentnog izolata K6 na Conn's i OAT hranljivim podlogama (Grafikon 5B).

Na 25°C, je takođe najveća brzina porasta izolata *A. pisi* je registrovan do 10. dana inkubacije. Zaustavljanje razvoja je registrovano kod svih testiranih izolata na V8 hranljivim podlogama do 10. dana inkubacije, izuzev kod izolata K22 do 15. dana inkubacije. Do 15. dana inkubacije maksimalan porast kolonija je registrovan kod K505 na OAT i WA (t) podlogama, K21 na WA, K22 i K6 na Conns, OAT i WA, i K502 na OAT, PDA (st) i WA podlogama. Dodatno do 20. dana inkubacije maksimalan porast je registrovan i kod K505 na Conn's i PDA (t), K22 i K502 na PDA (t) i Yeast (st), i K6 na PDA podlogama (Grafikon 5C).



Grafikon 5. Petodnevni porast izolata A. pisi na 15°C (A), 20°C (B), 25°C (C); (st)-12/12h svetlo-tama, (t)-24h tama

6.8. Makroskopske morfološke karakteristike izolata *Ascochyta* spp.

Varijabilnost u boji i gustini vazdušne micelije izolata, kao i pigmentacija u podlozi, je uočena zavisno od tipa hranljive podloge kao i uslova gajenja kod svih testiranih izolata *Ascochyta* spp. Takođe, kod svih ispitivanih izolata *D. pinodes*, *D. pinodella* i *A. pisi* uočene su zajedničke karakteristike kao što su ravan obod kolonije i slabija ili jača koncentrična zoniranost.

6.8.1. Makroskopske morfološke karakteristike izolata vrste *Didymella pinodes*

a) Temperatura 15°C

Izolati *D. pinodes* su na Conn's podlozi, pod svetlosnim režimom 12h/12h, obrazovali kompaktnu, gustu, belu vazdušnu miceliju, dok su u uslovima tame obrazovane zone sa belom vazdušnom micelijom različite gustine. Pigment u agaru je varirao od belog, preko krem, žutog, svetlo roza do tamno ljubičastog, s tim što su tamnije nijanse pigmenta izolati obrazovali u uslovima tame (Slika 20).

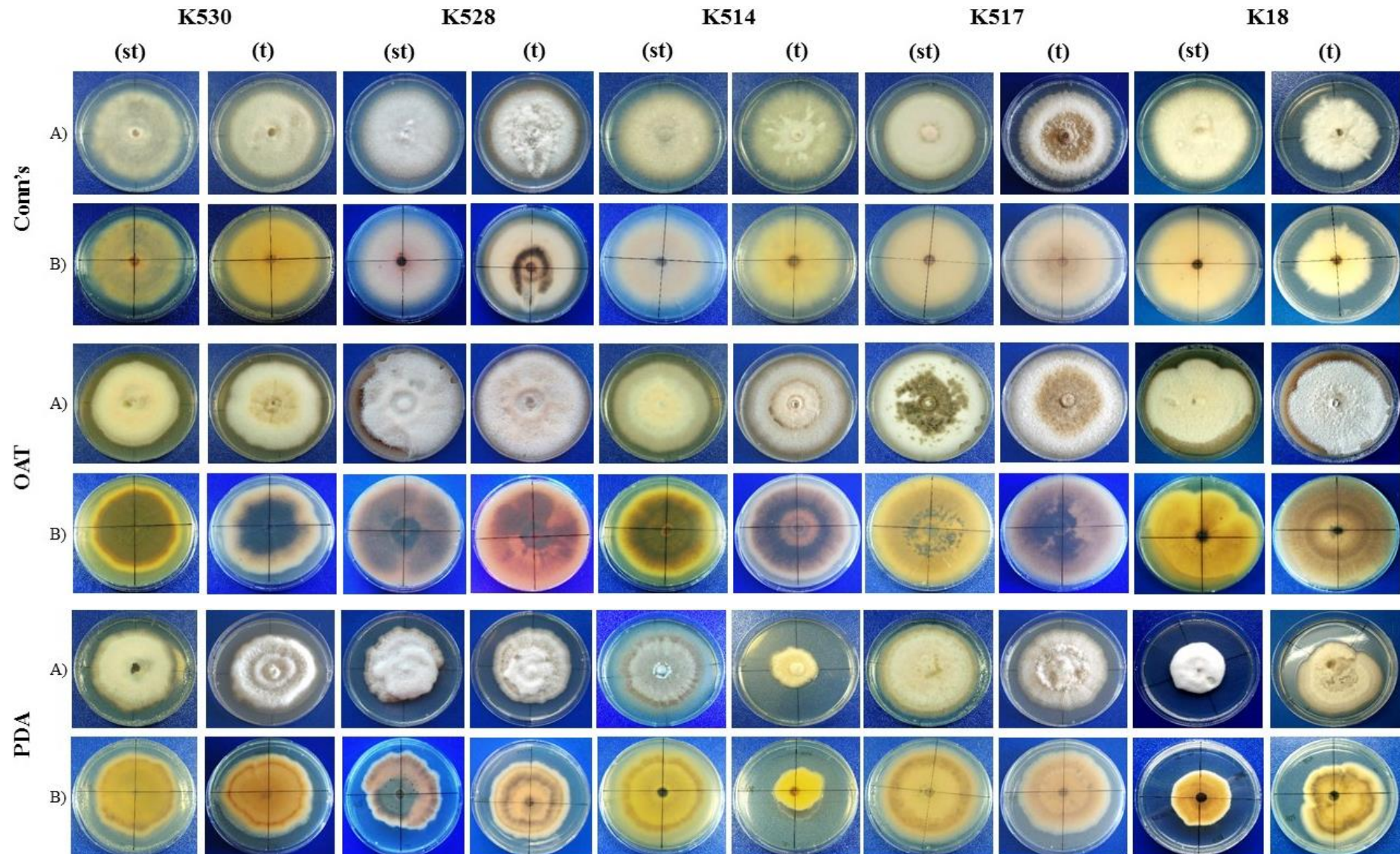
Nešto veća varijabilnost ovih izolata je primećena na OAT podlozi pod istim uslovima. Izolati *D. pinodes* su na ovoj podlozi obrazovali gustu, ujednačenu vazdušnu miceliju bele boje koja je kod nekih izolata poprimila krem do svetlo smeđe nijanse. Pigmentacija u agaru je pod svetlosnim režimom 12/12h bila izraženo žuta sa zonama oker i smeđe boje (K517). U uslovima tame ispitivani izolati su stvarali krem i svetlo do tamno smeđi pigment. Izuzetno, izolat K528 je u oba svetlosna režima stvarao u agaru crvenkasto smeđ do tamno smeđ pigment (Slika 20).

Na PDA podlozi, izolati *D. pinodes* su obrazovali srednje gustu do izrazito gustu vazdušnu miceliju zavisno od svetlosnog režima, pa je tako referentni izolat K18 obrazovao gušću miceliju u 12/12h svetlosnom režimu, izolat K528 je u oba svetlosna režima formirao zone sa gustom i ređom micelijom, dok su ostali izolati formirali gustu miceliju u tami. Vazdušna micelija je pretežno bila bele ili krem boje, dok su u agaru formirani krem, izrazito žuti, oker, svetlo i tamno smeđi pigment. Na naličju kolonija se uočavao spoljašnji najsvetliji (beli ili krem) obod, zatim je ispod njega bio prsten najtamnijeg pigmenta, dok je u centru kolonija bila svetlija pigmentacija (Slika 20).

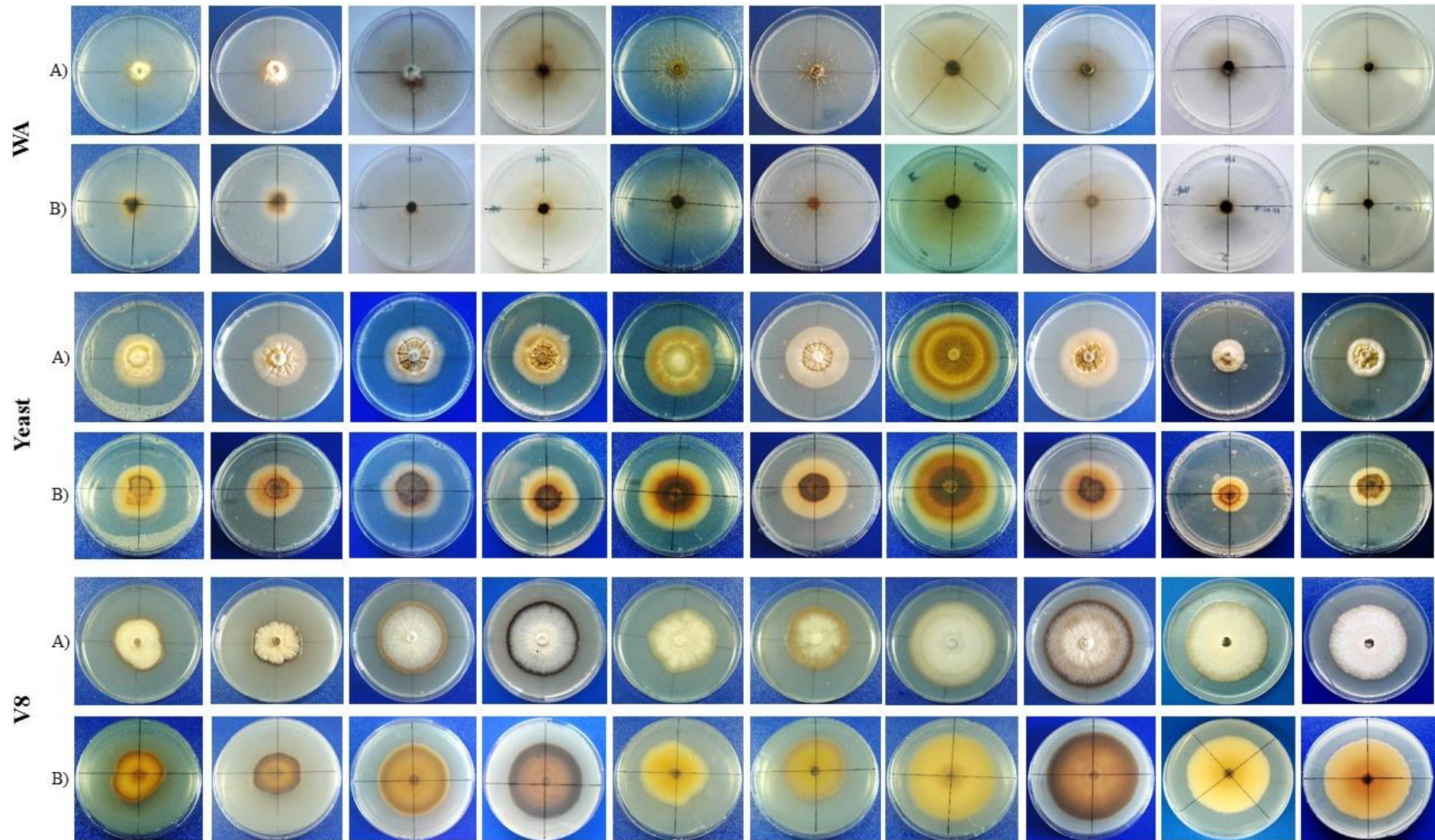
Na WA podlozi, vazдушna micelija izolata *D. pinodes* je bila retka, paučinasta, bele, sive do tamno smeđe boje. Pigmentacija u agaru je odsustvovala kod referentnog izolata K18 i izolata K530 i K514, dok je kod ostalih izolata bila slaba i svetlo smeđa (Slika 20).

Izolati *D. pinodes* su na Yeast podlozi obrazovali kolonije pravilnog oboda, micelija je bila izuzetno kompaktna, „kožasta“ sa naborima u centru kolonije, bele, krem, žućkaste i oker boje. Pigmentacija u podlozi je bila belo-krem na samom obodu kolonija, krem, žuta i oker u prelaznoj zoni, a tamno smeđa u centralnom delu kolonije (Slika 20).

Na V8 hranljivoj podlozi izolati *D. pinodes* su takođe formirali kolonije pravilnog oboda, guste ujednačene micelije bele boje sa ponegde krem nijansama. Pigment u agaru je bio bledo žut, izrazito žut, krem, oker, svetlo i tamno smeđe boje, s tim što su izolati formirali tamniji pigment u odsustvu svetlosti nego u 12/12h svetlosnom režimu (Slika 20).



Slika 20. Varijabilnost vazdušne (A) i supstrate (B) micelije izolata *D. pinodes* na različitim hranljivim podlogama na 15°C u dva svetlosna režima: (st)-12/12h svetlo-tam, (t)-24h tama



Slika 20. (nastavak)

b) Temperatura 20°C

Na Conn's podlozi izolati *D. pinodes* su obrazovali miceliju neujednačene gustine sa „jastučastim“ grupacijama kojih je bilo više u 12/12h svetlosnom režimu nego u tami. Vazdušna micelija je bila bela ali je kod nekih izolata usled pigmentacije u podlozi poprimala nijanse roze, svetlo ljubičaste/lila, i svetlo smeđe boje. Na naličju kolonija su registrovani beli, krem, svetlo roza, svetlo i tamno smeđ pigment uz pojavu pega tamno smeđe do crne boje. Obod kolonija je, kod svih izolata izuzev referentnog, bio tamnije nijanse od ostalog dela kolonije (Slika 21).

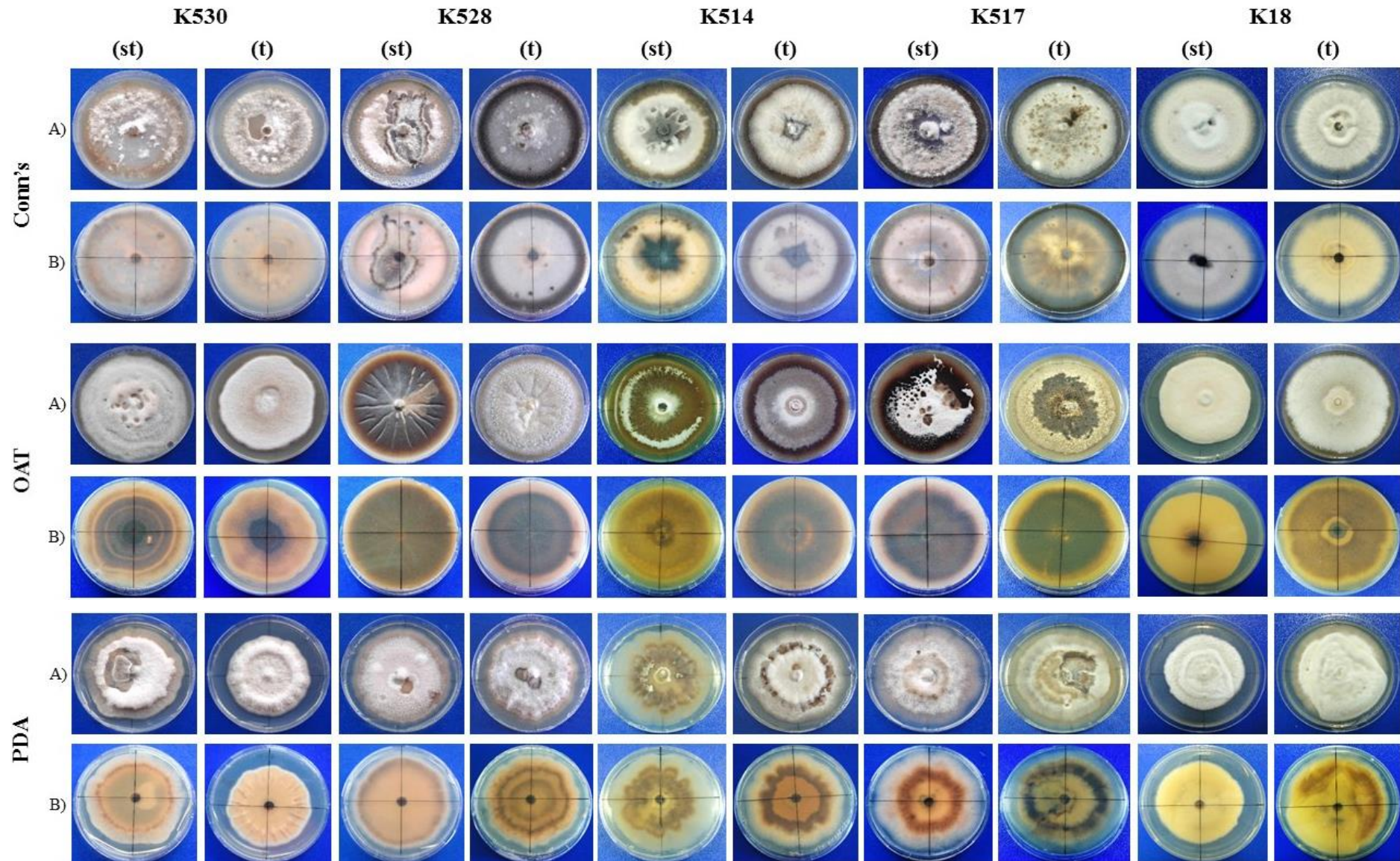
Na OAT podlozi vazdušna micelija je bila bela, gusta, ujednačena kod referentnog izolata K18 i izolata K530, dok je kod ostalih izolata vazdušna micelija bila ređa i razvijena u nejednakim zonama poprimajući oker i lila nijanse supstratne micelije. Izolat K528 je formirao i nabore koji su bili izraženiji u 12/12h svetlosnom režimu. U podlozi su ispitivani izolati stvarali krem, oker, svetlo i tamno smeđi pigment s tim što je obod kolonija kod svih izolata bio svetlije nijanse (Slika 21).

Na PDA podlozi, vazdušna micelija *D. pinodes* je varirala od guste, vunaste micelije do srednje guste micelije paučinaste strukture. Vazdušna micelija je bila bela s tim što je kod nekih izolata poprimala nijanse roza i krem boje usled pigmentacije. U podlozi su ovi izolati stvarali krem, žuti, oker, i različite nijanse svetlo i tamno braon pigmenta (Slika 5c).

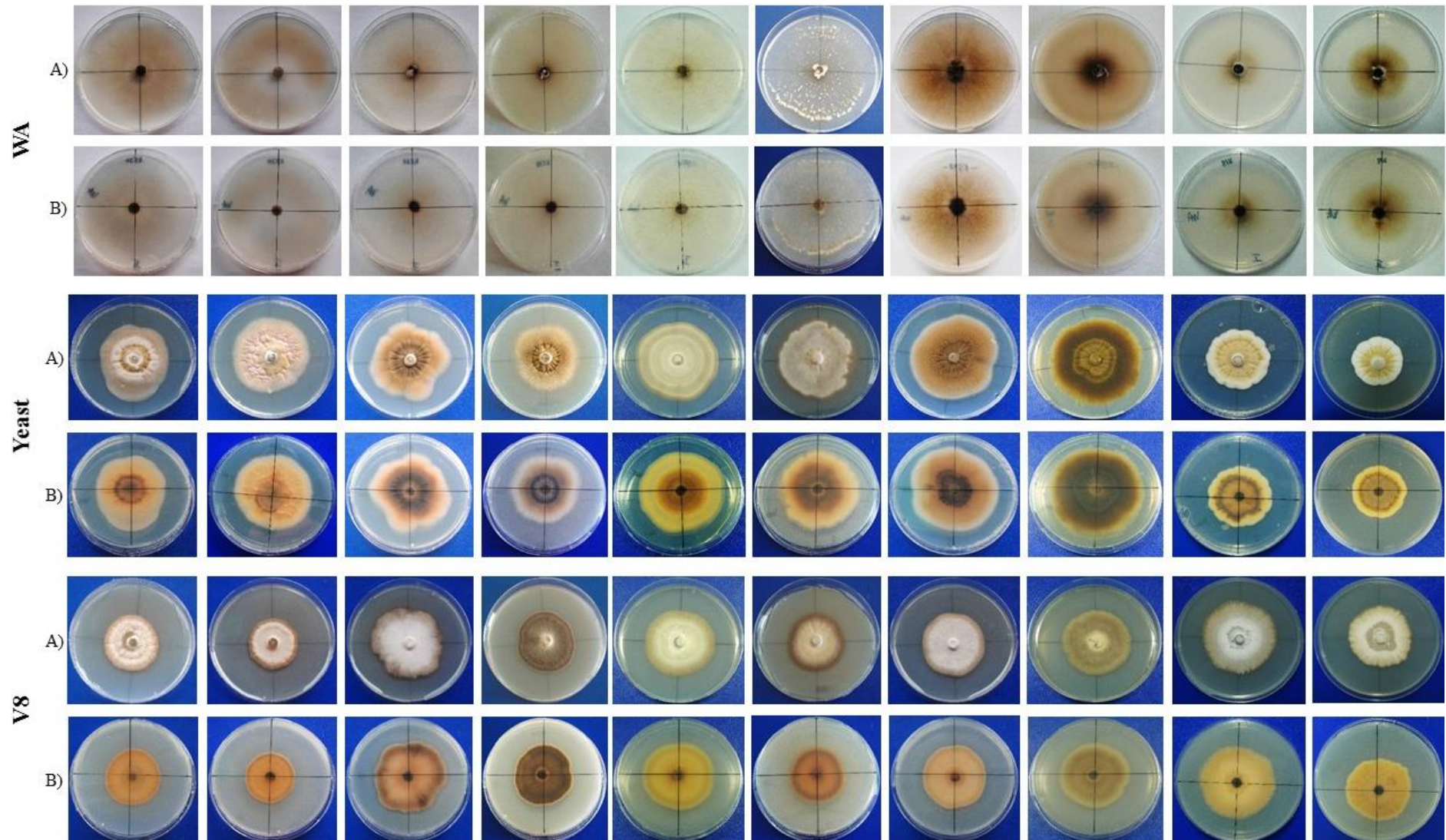
Na WA podlozi, vazdušna micelija izolata *D. pinodes* je bila slabo razvijena, paučinasta, bela ili krem, sa izuzetkom izolata K514 kod koga je u uslovima tame registrovan nešto bolji razvoj vazdušne micelije. U ovoj podlozi izolat K514 nije stvarao pigment, dok su ostali izolati stvarali smeđ pigment različitog intenziteta zavisno od razvoja supstratne micelije (Slika 21).

Na Yeast podlozi, izolati *D. pinodes* su obrazovali kolonije sa retkom paučinastom ili kompaktnom „kožastom“ micelijom sa naborima u centralnom delu kolonija. Micelija je bila bela, krem, oker i svetlo smeđih nijansi, dok je pigmentacija u agaru varirala od krem, preko izrazito žute, oker, do svetlo smeđih, sivo-smeđih i tamno smeđih nijansi (Slika 21).

Izolati *D. pinodes* su na V8 podlozi obrazovali pravilne kolonije srednje guste do guste vazdušne micelije ujednačenog porasta. Vazdušna micelija je bila bela uz pojavu krem nijanse, dok je u agaru stvaran krem, žuti, svetlo i tamno smeđ pigment (Slika 21).



Slika 21. Varijabilnost vazdušne (A) i supstratne (B) micelije izolata *D. pinodes* na različitim hranljivim podlogama na 20°C u dva svetlosna režima: (st)-12/12h svetlo-tam, (t)-24h tama



Slika 21. (nastavak)

c) Temperatura 25°C

Izolati *D. pinodes* su na Conn's hranljivoj podlozi obrazovali izuzetno varijabilne kolonije u pogledu vazdušne i supstratne micelije, kao i pigmentacije u podlozi. Vazdušna micelija je bila izuzetno slabo razvijena kod izolata K514 u oba svetlosna režima, dok su kod ostalih izolata registrovane zone sa dobro razvijenom paučinastom micelijom i zone sa supstratnom micelijom i „jastučastim“ grupacijama vazdušne micelije. Najujednačeniji razvoj vazdušne micelije je registrovan kod referentnog izolata K18. Vazdušna micelija je bila bela do krem boje kod pojedinih izolata, dok je u agaru obrazovan beli, krem i tamno smeđ pigment uz pojavu tamnosmeđih do crnih pega. Tamnije nijanse određenog pigmenta su izolati obrazovali u uslovima tame (Slika 22).

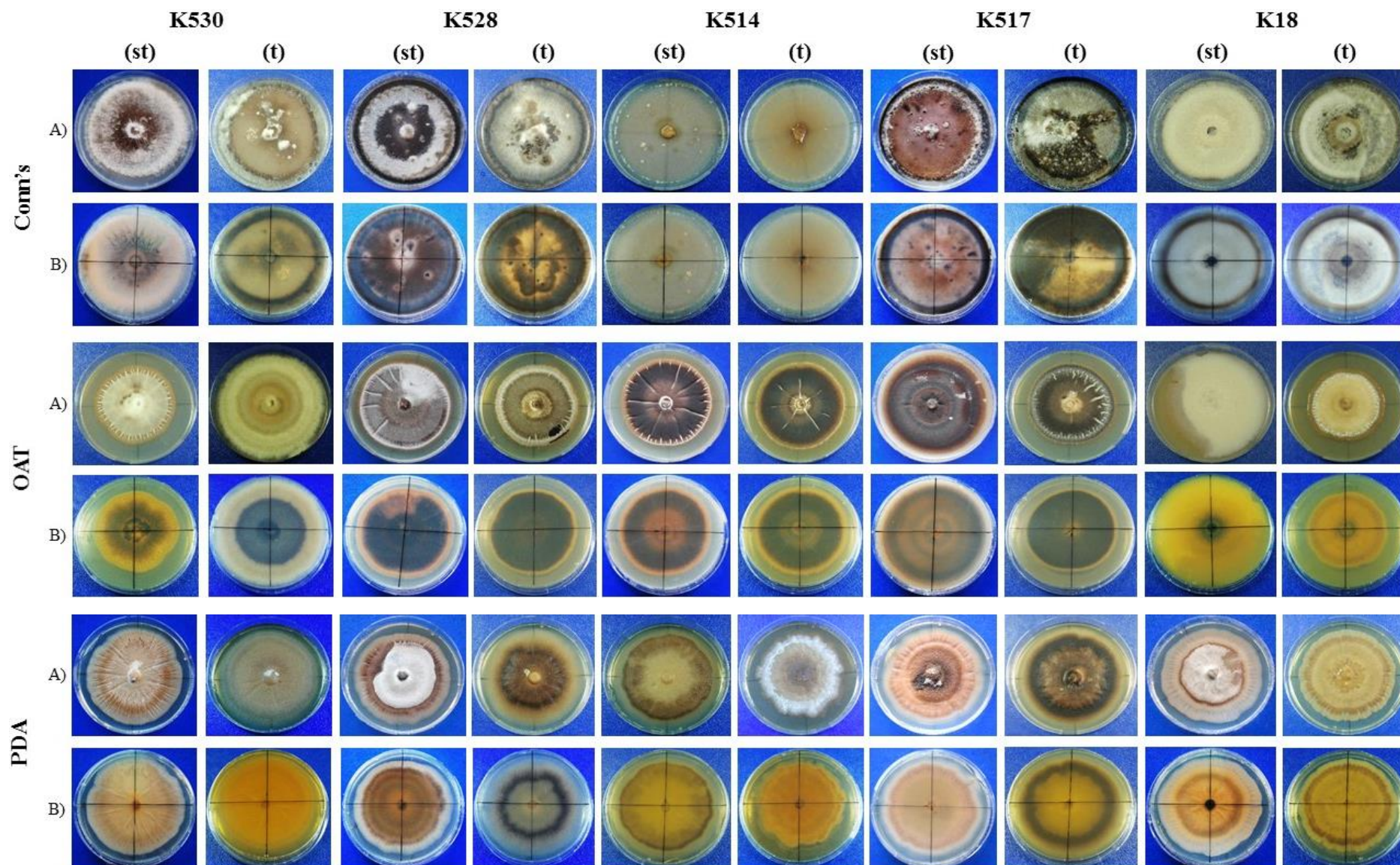
Na OAT hranljivoj podlozi je vazdušna micelija izolata *D. pinodes* bila slabije razvijena uz dominaciju supstratne micelije „kožaste“ strukture sa pojavom nabora kod svih ispitivanih izolata. Izuzetno, vazdušna micelija je bila dobro razvijena kod referentnog izolata K18 u 12/12h svetlosnom režimu i kod K530 izolata u tami. Vazdušna micelija je bila bela do krem, a pigment u agaru je bio izrazito žut, oker, svetlo smeđ, crvenkasto-smeđ, sivo-smeđ i tamno smeđ (Slika 22).

Na PDA podlozi vazdušna micelija izolata *D. pinodes* je bila izuzetno slabo razvijena uz dominaciju „kožaste“ supstratne micelije sa naborima. Izuzetno kod izolata K514 u tami i referentnog izolata K18 i izolata K528 u 12/12h svetlosnom režimu je registrovana srednje razvijena, bela, paučinasta vazdušna micelija. Pigmentacija u podlozi je bila krem, žuta, oker, svetlo i tamno smeđa, uz prisustvo svetlog prstena na obodu kolonije pa prstena najtamnijeg pigmenta i zatim svetlije nijanse u centru kolonija (izuzev kod K530 u tami) (Slika 22).

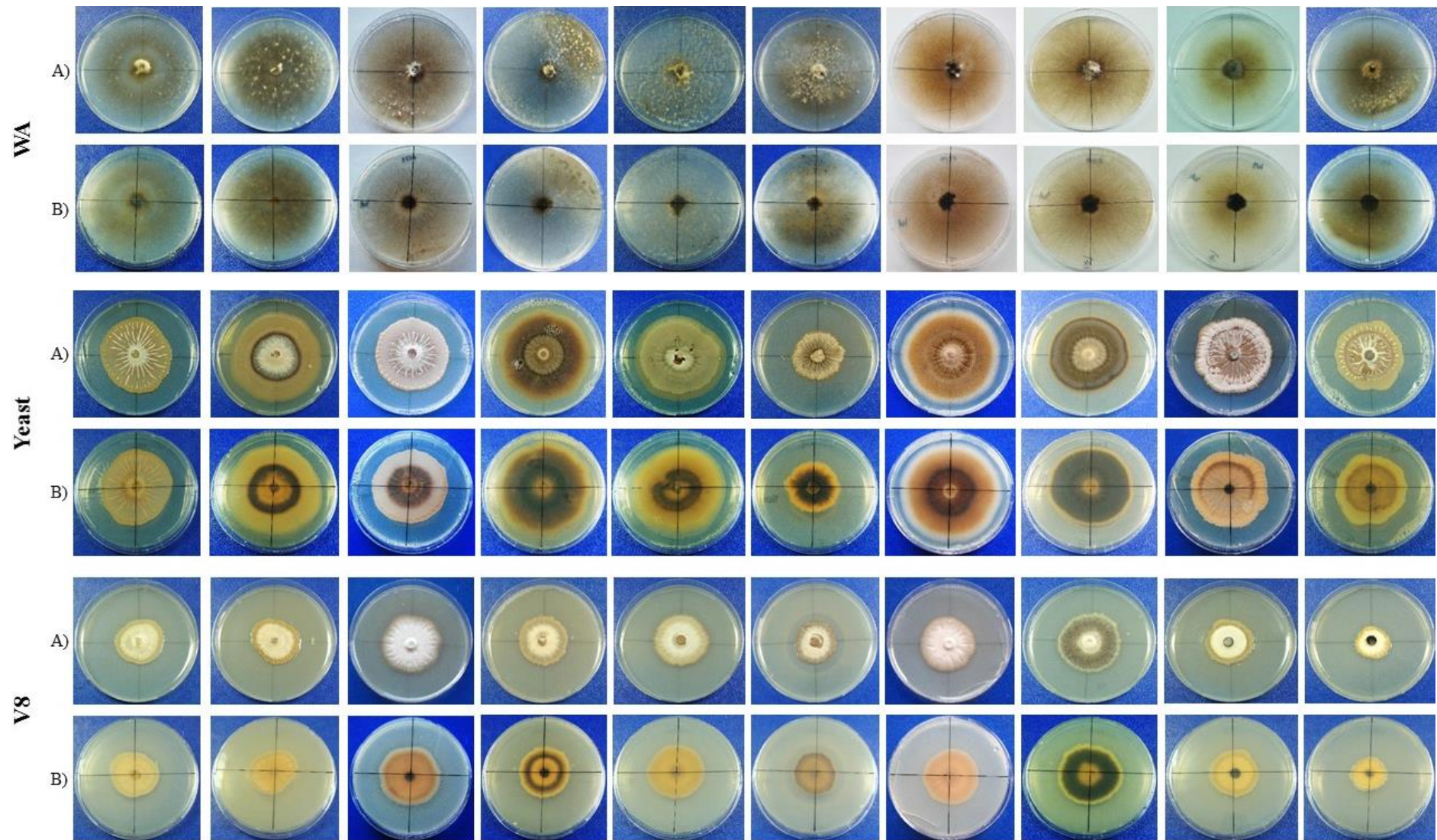
Na WA podlozi, izolati *D. pinodes* su najbolje razvili belo-sivu vazdušnu miceliju, slabo do srednje gusta, paučinasta i ponegde „jastučasta“. Pigment u podlozi je bio svetlo do sivo-tamno smeđ zavisno od stepena razvoja supstratne micelije (Slika 22).

Na Yeast podlozi je vazdušna micelija *D. pinodes* bila bela i slabo razvijena uz dominaciju supstratne „kožaste“ micelije sa razvijenim naborima u centralnom delu kolonija. Pigmentacija u agaru je bila varijabilna i koncentrično raspoređena uz pojavu svetlijeg prstena na obodu kolonije, zatim prstena najtamnijeg pigmenta pa nešto svetlijeg pigmenta ka centru kolonije. Pigmentacija u agaru je varirala od žuto-krem, oker, svetlo smeđe, ljubičasto-smeđe do tamno smeđe boje (Slika 22).

Kolonije *D. pinodes* na V8 podlozi su bile pravilnog oboda, guste, kompaktne i ujednačene bele ili krem vazdušne micelije. Pigmentacija u podlozi je bila žuto-krem, bež, svetlo i tamno smeđe, kao i crno-smeđe boje uz prisustvo svetlog oboda na ivici kolonija kod svih izolata izuzev referentnog K18 i izolata K530 (Slika 22).



Slika 22. Varijabilnost vazdušne (A) i supstratne (B) micelije izolata *D. pinodes* na različitim hranljivim podlogama na 25°C u dva svetlosna režima: (st)-12/12h svetlo-tam, (t)-24h tama



Slika 22. (nastavak)

6.8.2. Makroskopske morfološke karakteristike izolata vrste *Didymella pinodella*

a) Temperatura 15°C

Ispitivani izolati vrste *D. pinodella* su pod ovim uslovima na Conn's hranljivoj podlozi formirali retku vazdušnu miceliju bele boje sa pojavom „jastučastih“ formacija. Kod svih izolata je primećena neujednačenost vazdušne micelije i formiranje regiona sa gustom i regiona sa retkom vazdušnom micelijom. U uslovima tame je ovo bilo izraženije i formirane su veće površine gušće vazdušne micelije. Pigmentacija u podlozi je varirala od krem do oker-smeđe boje zavisno od izolata. Prisustvo pega u smeđem pigmentu u podlozi je uočeno kod referentnog izolata K17 pod 12/12h svetlosnim režimom što je posledica formiranja sklerocija. Takođe, primećeno je formiranje nešto tamnijeg pigmenta u podlozi u uslovima tame (Slika 23).

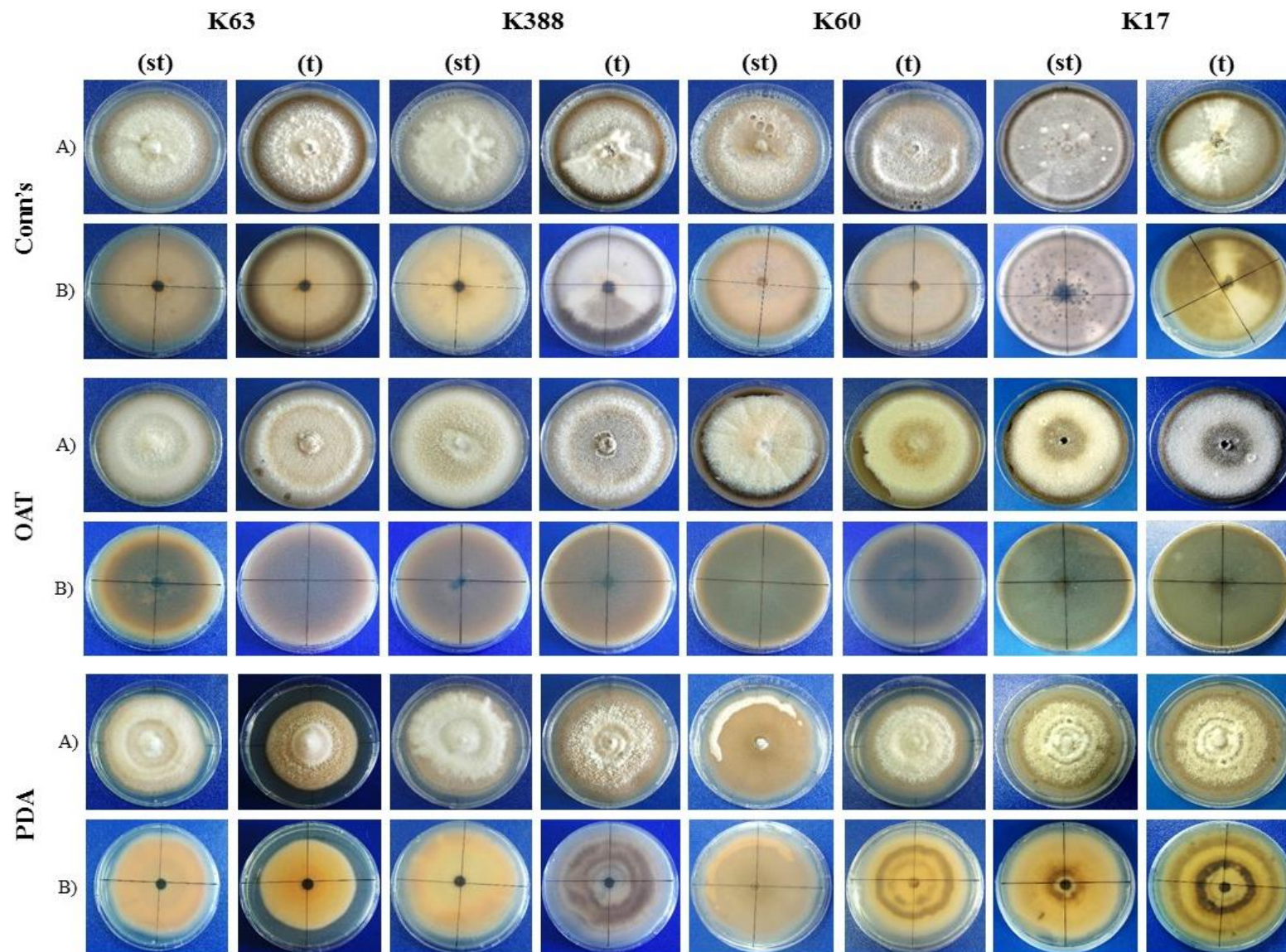
Na OAT hranljivoj podlozi su izolati *D. pinodella* formirali kompaktnu, gustu vazdušnu miceliju bele boje koja je sa starenjem poprimala krem do oker nijanse u centru kolonije usled pigmentacije agara. Pigmentacija u agaru je bila od svetlo do tamno smeđe boje, i nije varirala u zavisnosti od svetlosnog režima (Slika 23).

Micelija izolata *D. pinodella* na PDA podlozi se odlikovala kožastom supstratnom micelijom sa vunasto jastučastim delovima bele vazdušne micelije. Najbolje razvijena kompaktna bela vazdušna micelija je registrovana kod izolata K63 i K388 pod 12/12h svetlosnim režimom. Pigmentacija u agaru se kretala od krem preko boje kajsije, žuto-smeđe do tamno smeđe boje. Pigmentacija je prstenasto formirana u agaru, uz veću izraženost ove pojave u uslovima tame (Slika 23).

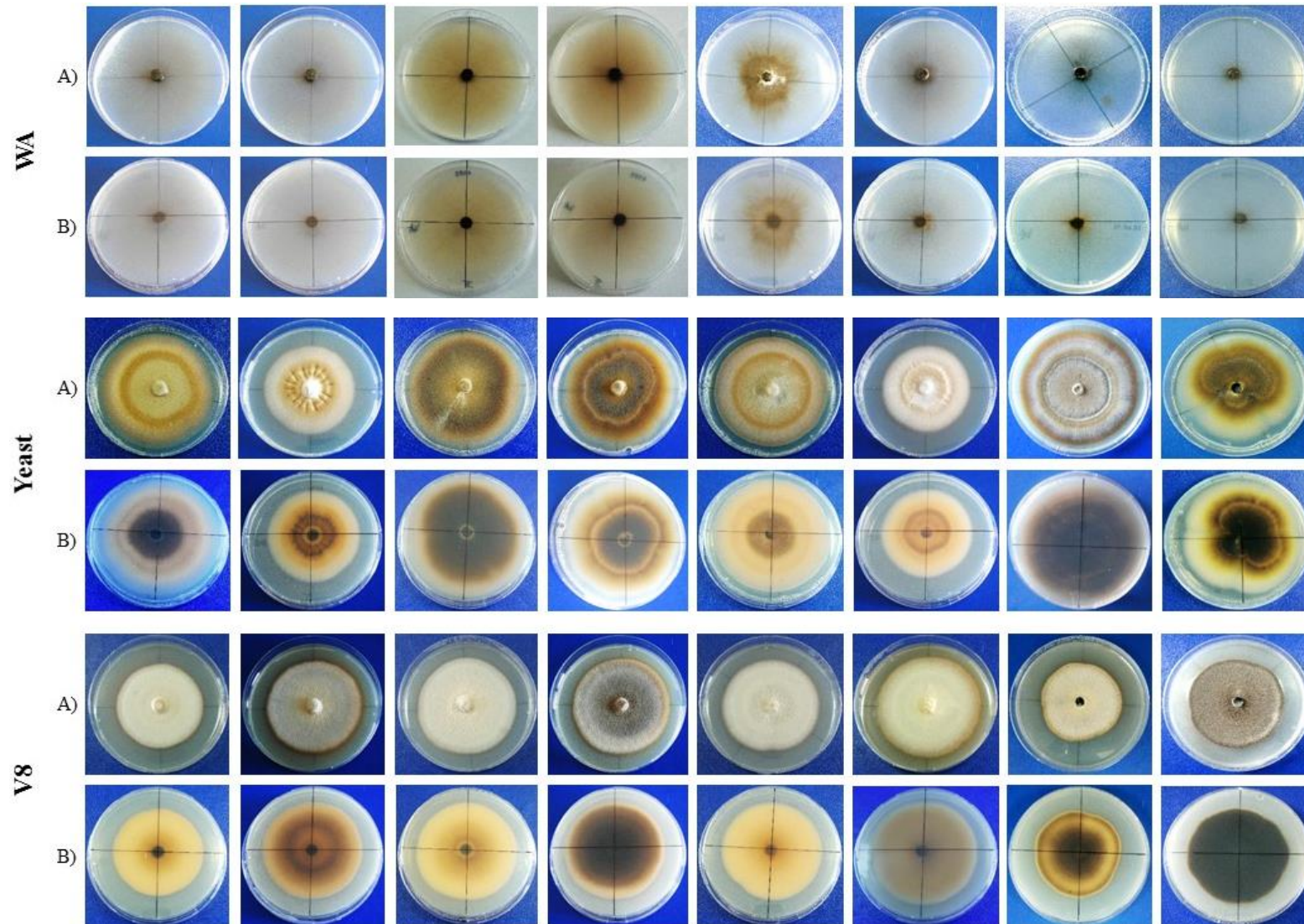
Na WA podlozi, vazdušna micelija izolata *D. pinodella* je bila paučinasta i vrlo slabo razvijena. Supstratna micelija je bila smeđe do crne boje, dok je pigmentacija u agaru, ukoliko je bila prisutna, bila smeđe do crne boje (Slika 23).

Morfološka varijabilnost izolata *D. pinodella* je bila najizraženija na Yeast hranljivoj podlozi. Vazdušna micelija je bila retka a boja je varirala od bele do krem i oker nijansi. Pigmentacija u podlozi je izrazito varirala i registrovane su krem, bež, oker, žuto-smeđa i tamno smeđa boja. Svetlije nijanse pigmentacije su primećene u uslovima tame (Slika 23).

Vazdušna micelija izolata *D. pinodella* na V8 hranljivoj podlozi je bila ujednačene kompaktne strukture, dominantno bele boje uz primese oker i smeđih nijansi u uslovima tame usled pigmentacije podloge. Pigmentacija u podlozi je varirala od krem, oker, svetlo do tamno smeđe boje, s tim što je znatno tamnija pigmentacija registrovana u uslovima tame (Slika 23).



Slika 23. Varijabilnost vazdušne (A) i supstratne (B) micelije izolata *D. pinodella* na različitim hranljivim podlogama na 15°C u dva svetlosna režima: (st)-12/12h svetlo-tam, (t)-24h tama



Slika 23. (nastavak)

b) Temperatura 20°C

Izolati *D. pinodella* su na Conn's hranljivoj podlozi obrazovali retku vazdušnu miceliju sa pojavom „jastučastih“ formacija, s tim što je veća ujednačenost micelije registrovana u uslovima tame. Boja vazdušne micelije je bila bela uz primese oker boje u uslovima tame. Pod 12/12h svetlosnim režimom, pigmentacija u agaru je bila ružičasto smeđa kod ispitivanih izolata, i krem sa tamno smeđim do gotovo crnim zonama kod referentnog izolata K17. U uslovima tame pigmentacija u agaru je bila žuto-krem sa tamno smeđim zonama. Kod svih izolata i u oba svetlosna režima registrovano je prisustvo tamno smeđih do crnih pega različite veličine u agaru (Slika 24).

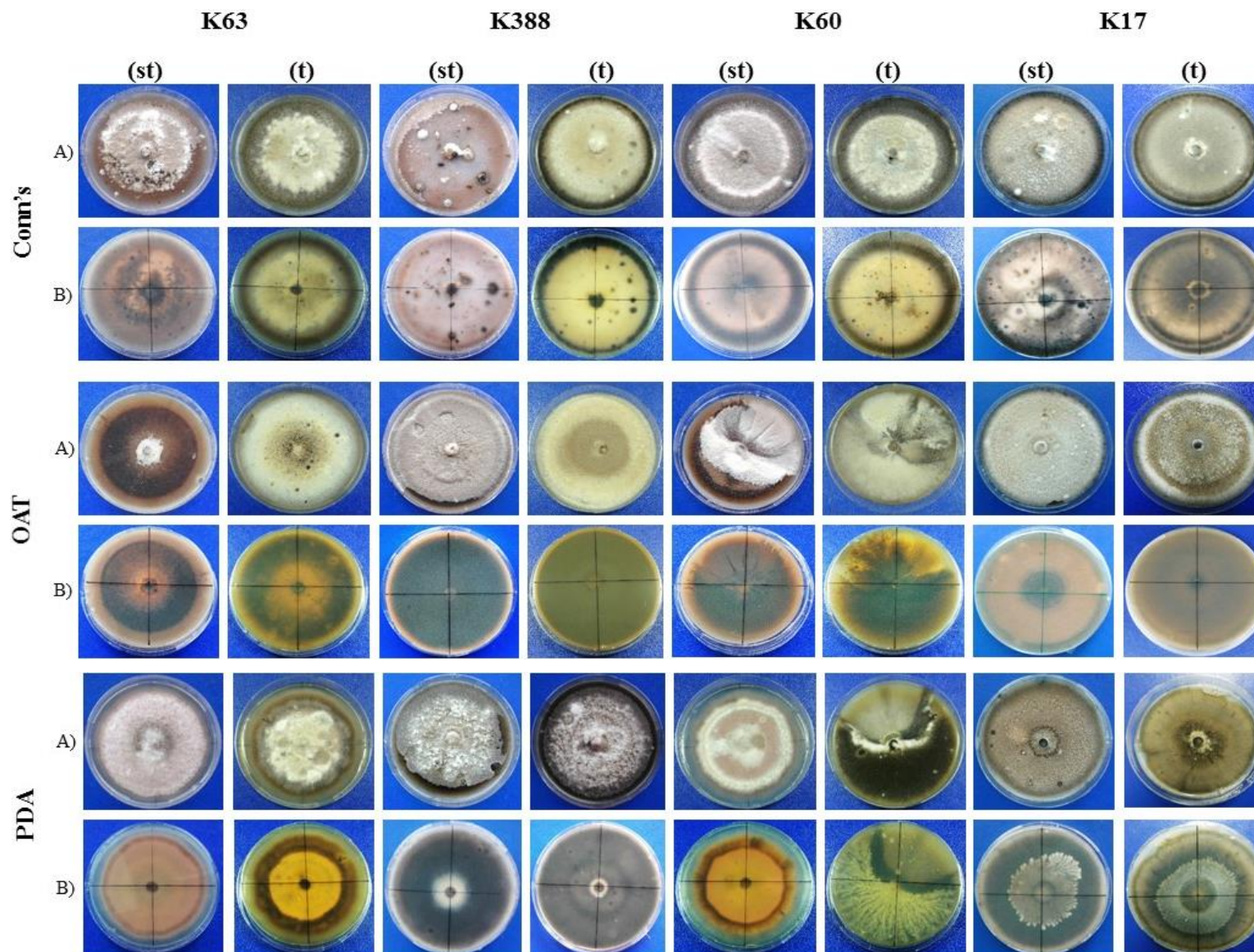
Na OAT hranljivoj podlozi izolati *D. pinodella* su formirali ujednačenu, kompaktnu vazdušnu miceliju sa izuzetkom izolata K60 i K63 koji su imali zone sa kožastom supstratnom micelijom i zone sa vazdušnom micelijom. Vazdušna micelija je bila bele boje sa ružičastom ili oker nijansom. Pigmentacija u agaru se značajno razlikovala od svetlosnog režima pa je tako u uslovima tame dominirao žuti i tamno smeđi pigment, dok je u 12/12h režimu dominirao ružičasto-smeđi pigment (Slika 24).

Na PDA podlozi je uočena velika morfološka varijabilnost između izolata *D. pinodella* kako u pogledu vazdušne micelije tako i u pogledu pigmentacije u agaru. Vazdušna micelija je varirala od guste i kompaktne, preko vunaste do micelije retke strukture. Boja micelije je bila bela uz primese krem i smeđih nijansi usled pigmentacije. Pigmentacija u agaru je bila raznolika: ružičasto-krem, citron žuta, tamno smeđa, sivo-tamno smeđa i bela. Formiranje beličastih kristala lepezastog, pahuljastog i paperjastog oblika u PDA podlozi je registrovan kod referentnog izolata K17 u oba svetlosna režima i izolata K60 u režimu tame (Slika 24).

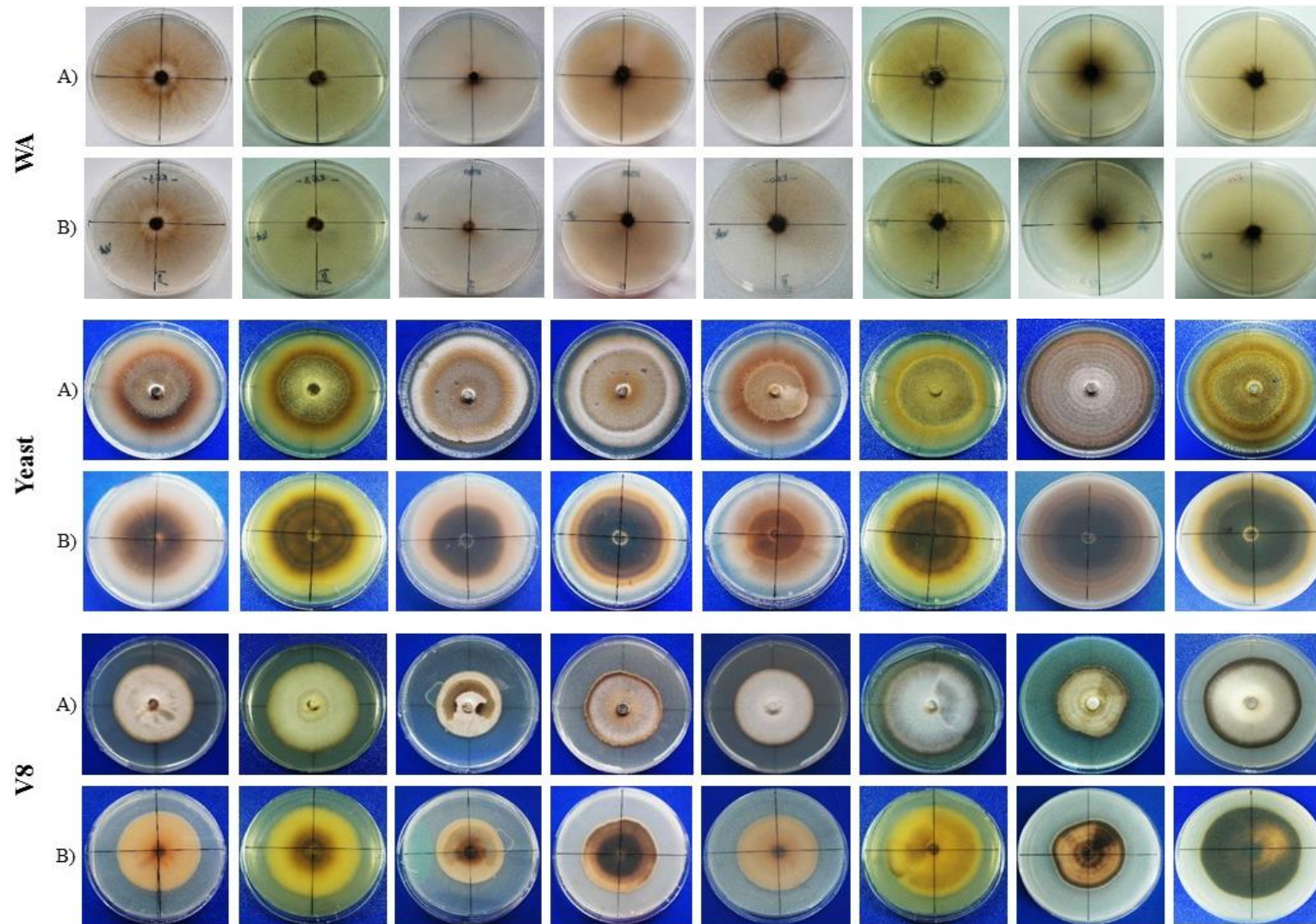
Micelija izolata *D. pinodella* se na WA podlozi odlikovala slabom paučinastom vazdušnom micelijom, i retkom smeđom i crnom supstratnom micelijom. Pigmentacija u agaru je bila slaba i jedva primetna - smeđe i crne boje (Slika 24).

Na Yeast podlozi, vazdušna micelija izolata *D. pinodella* je bila ujednačena, srednje gusta, paučinaste strukture, bele boje sa smeđim nijansama u centru kolonije. U uslovima tame citron žuto-smeđi pigment je registrovan kod svih izolata izuzev K388 koji je imao krem do tamno smeđ pigment. U svetlosnom režimu 12/12h izolati su obrazovali krem i svetlo/tamno smeđi pigment (Slika 24).

Vazдушna micelija izolata *D. pinodella* je na V8 hranljivoj podlozi bila gusta, ujednačena i kompaktna, bele boje sa krem nijansama. Izolati K60 i K63 su u uslovima tame obrazovali žuto-krem i žuto-smeđ pigment, dok je kod druga dva izolata pod ovim uslovima dominirao krem-tamno smeđ pigment. Pod svetlosnim režimom 12/12h registrovane su svetlije nijanse u odnosu na tamu, i dominirao je krem-tamno smeđi pigment (Slika 24).



Slika 24. Varijabilnost vazdušne (A) i supstratne (B) micelije izolata *D. pinodella* na različitim hranljivim podlogama na 20°C u dva svetlosna režima: (st)-12/12h svetlo-tam, (t)-24h tama



Slika 24. (nastavak)

c) Temperatura 25°C

Na Conn's hranljivoj podlozi, izolati *D. pinodella* su obrazovali vazdušnu miceliju neujednačene gustine sa „jastučastim“ formacijama. Vazdušna micelija je bila bele boje a sa starenjem je poprimala bledoljubičaste, sivoljubičaste ili smeđe nijanse zavisno od pigmentacije u podlozi. Pigmentacija u podlozi je varirala od bele sa nijansama sive, sivoljubičaste i roze, do krem boje sa oker i smeđim nijansama i zonama. U podlozi su, kod svih izolata u oba svetlosna režima, obrazovane tamnosmeđe do crne pege, s tim što je brojnost pega bila veća u uslovima tame (Slika 25).

Na OAT podlozi, izolati *D. pinodella* su formirali gustu vazdušnu miceliju s tim što su kod izolata K63 i K60 primećene zone sa kožastom supstratnom micelijom i zone sa srednje gustom i gustom vazdušnom micelijom. Vazdušna micelija je bila pretežno bele boje uz pojavu oker nijansi kod svih izolata u uslovima tame, a kod izolata K63 i K388 u režimu 12/12h su registrovane ljubičaste nijanse vazdušne micelije. U podlozi je pigmentacija ispitivanih izolata varirala od žute, žuto-smeđe, zeleno-smeđe do tamno smeđe i tamno ljubičaste boje, s tim što su tamniji pigment izolati stvarali u uslovima tame (Slika 25).

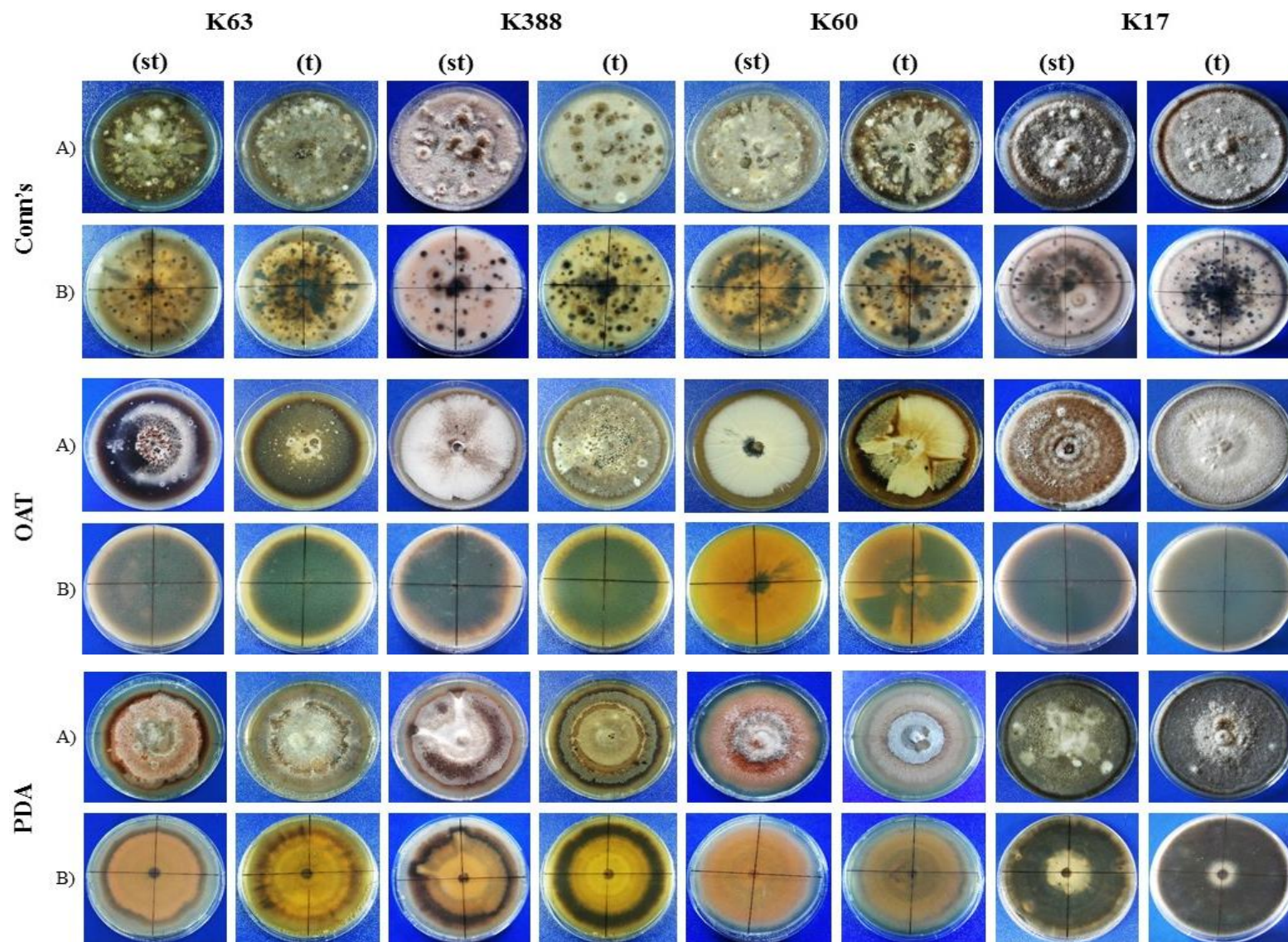
Najveća varijabilnost u makroskopskim morfološkim svojstvima izolata *D. pinodella* je uočena na PDA podlozi. Izolati su formirali neujednačenu paučinastu vazdušnu miceliju sa zonama srednje guste i guste micelije, dok je par jastučastih formacija registrovano samo kod referentnog izolata K17. Boja micelije je bila bela i sa starenjem je poprimala različite nijanse zavisno od pigmenta izolata – boja lososa, krem, oker, svetlo ljubičasta i roza nijansa. Pigmentacija u podlozi je bila izrazito varijabilna i registrovane su žuta sa svetlo i tamno smeđim zonama, krem sa tamno smeđim zonama, krem pomešana sa bojom lososa, krem sa tamno ljubičastom bojom, i bela sa tamno smeđom (Slika 25).

Na WA podlozi micelija izolata *D. pinodella* je bila slabo razvijena u vidu slabe paučinaste vazdušne micelije, i retke tamno smeđe i crne supstratne micelije. Shodno boji supstratne micelije, u podlozi je registrovana slaba pigmentacija smeđe i crne boje, s tim što je najjača pigmentacija registrovana u tami kod referentnog izolata K17 (Slika 25).

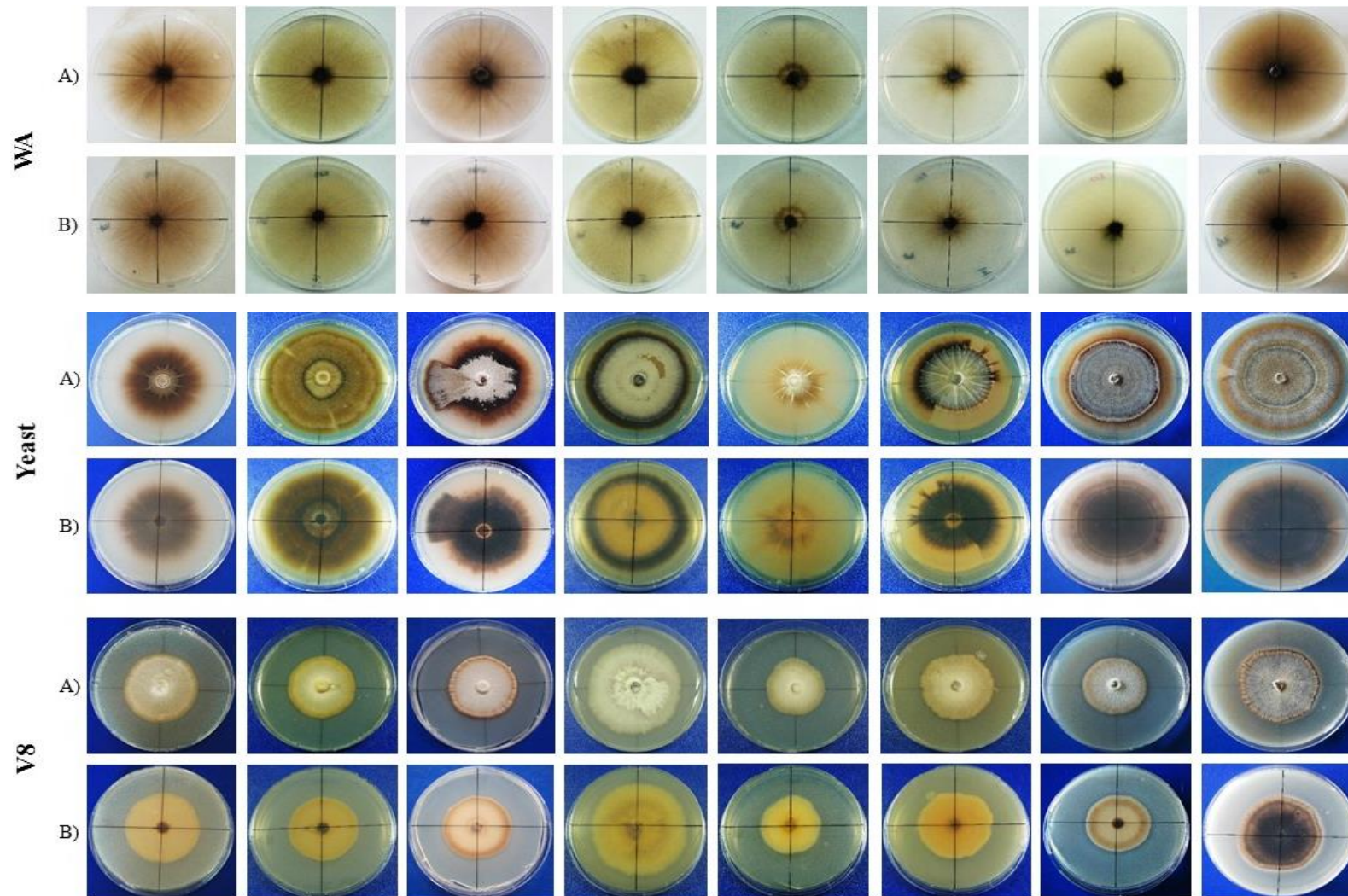
Izolati *D. pinodella* su na Yeast hranljivoj podlozi formirali srednje gustu paučinastu vazdušnu miceliju koja je bila bolje razvijena u uslovima tame, dok je pod 12/12h svetlosnim režimom formirana pretežno „kožasta“ supstratna micelija (sa izuzetkom referentnog izolata K17). Vazdušna micelija je bila bela sa nijansama krem, oker, svetlo smeđe i boje lavande.

Pigmentacija u agaru je varirala od bele, krem, oker, svetlo i tamno smeđe, do tamno ljubičaste boje (Slika 25).

Na hranljivoj podlozi V8 izolati *D. pinodella* su formirali kolonije pravilnog oboda, ujednačene guste vazdušne micelije bele boje sa žutom, krem ili smeđom nijansom na obodu kolonije. Supstratna micelija je u agaru obrazovala beli, svetlo žuti, krem, svetlo i tamno smeđi pigment, s tim što su izolati tamniju pigmentaciju stvarali u uslovima tame (Slika 25).



Slika 25. Varijabilnost vazdušne (A) i supstratne (B) micelije izolata *D. pinodella* na različitim hranljivim podlogama na 25°C u dva svetlosna režima: (st)-12/12h svetlo-tam, (t)-24h tama



Slika 25. (nastavak)

6.8.3. Makroskopske morfološke karakteristike izolata vrste *Ascochyta pisi*

a) Temperatura 15°C

Izolati *A. pisi* su na Conn's hranljivoj podlozi obrazovali srednje do izrazito gustu, kompaktnu vazdušnu miceliju bele boje sa ponegde blede roza ili krem nijansama. Vazdušna micelija je bila gušća u uslovima tame kod izolata K505, K21 i K22, dok je kod referentnog izolata K6 i izolata K502 bilo obrnuto. Supstratna micelija je u podlozi stvarala beli, žuti, i dominantno oker do svetlo smeđ pigment, a kod referentnog izolata K6 je registrovan izuzetno i rozi pigment u 12/12h svetlosnom režimu (Slika 26).

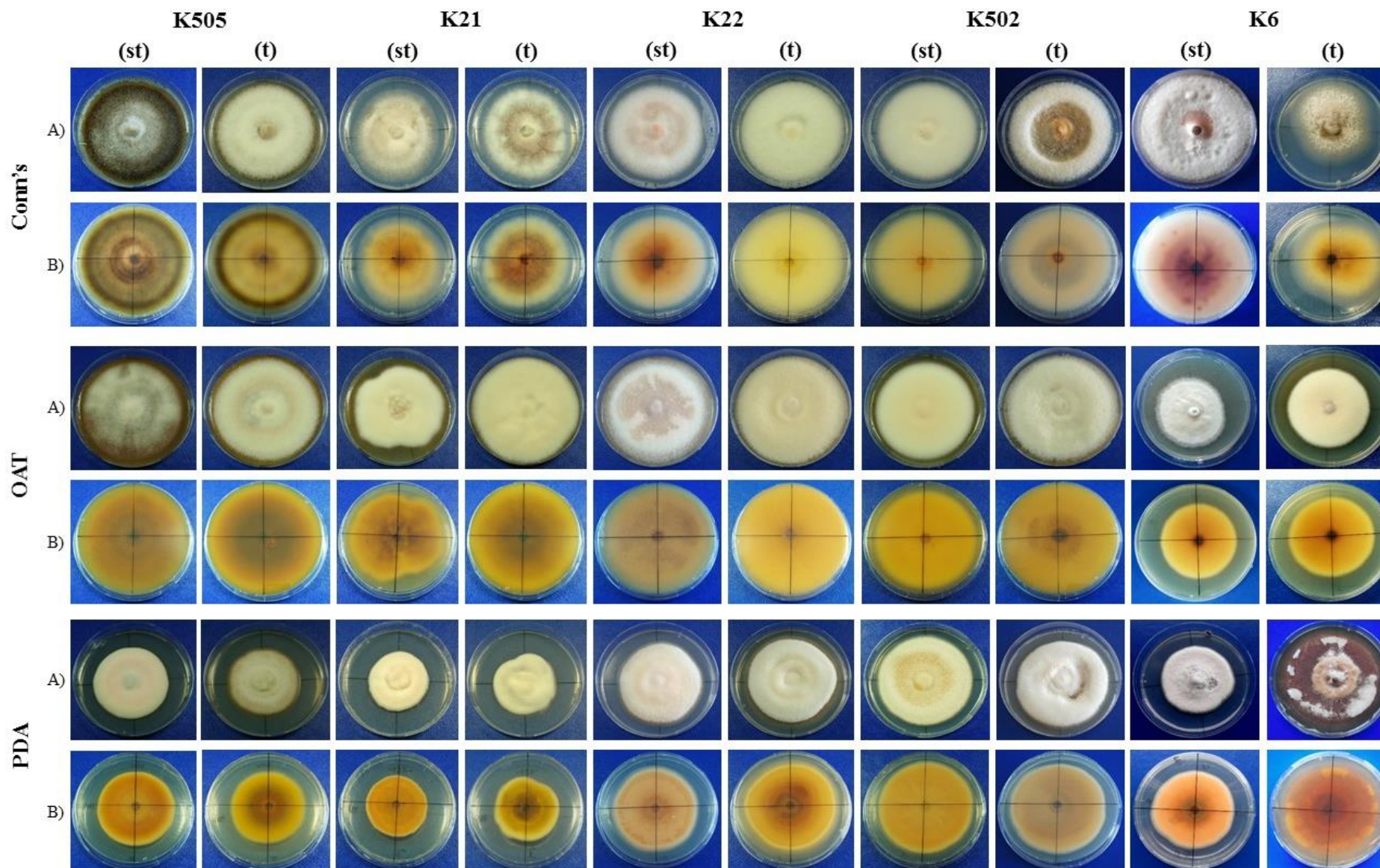
Na OAT hranljivoj podlozi primećena je veća ujednačenost morfoloških karakteristika izolata *A. pisi*, pa je tako formirana kompaktna, ujednačeno gusta, bela vazdušna micelija sa krem nijansama i pravilnim obodom kolonija. Pigmentacija u agaru supstratne micelije je bila dominantno žuto-okker i svetlo smeđa, uz nešto svetliju krem pigmentaciju kod izolata K6 i K22. Kod svih izolata je primećena tamnija pigmentacija u centralnoj zoni kolonije (Slika 26).

Na PDA podlozi, izolati *A. pisi* su takođe obrazovali kolonije pravilnog oboda i ujednačeno guste vazdušne micelije koja je bila bele boje sa krem nijansama. Izuzetno, kod referentnog izolata K6 u uslovima tame formirane su zone sa ređom i gušćom vazdušnom micelijom. Supstratna micelija je stvarala pretežno žuto-okker i krem-svetlo smeđi pigment u agaru, sa izuzetkom referentnog izolata koji je stvarao narandžast pigment boje lososovog mesa u 12/12h svetlosnom režimu, odnosno crvenkasto-lila pigment u uslovima tame. Kod svih izolata u uslovima tame je primećena tamnija pigmentacija (Slika 26).

Na WA podlozi, izolati *A. pisi* su obrazovali retku, paučinastu, belo-sivu vazdušnu miceliju koja je kod izolata K21 formirala jastučaste grupacije. Pigmentacija u agaru je odsustvovala kod izolata K502, dok je kod ostalih bila smeđe-crna (Slika 7d).

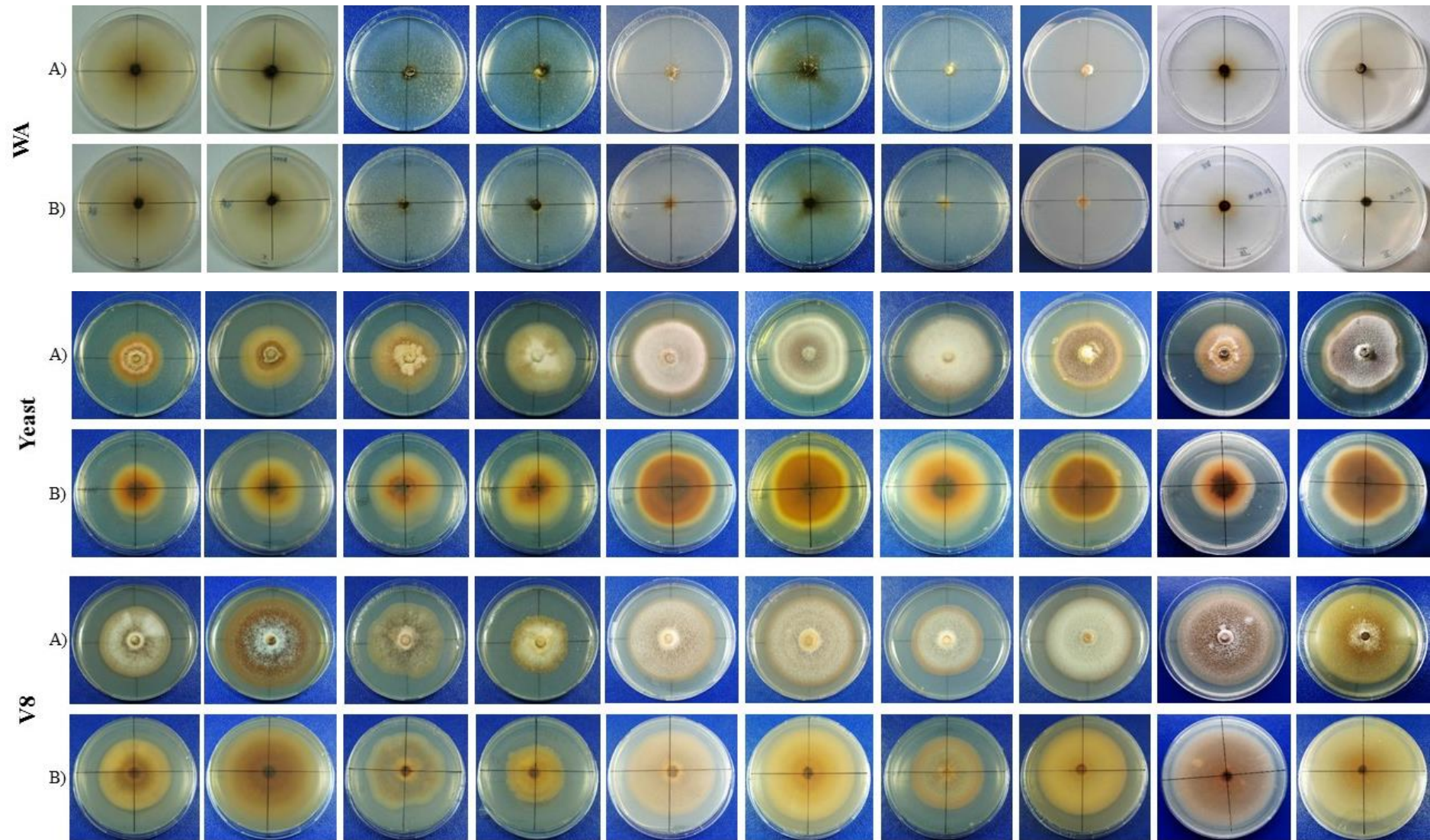
Izolati *A. pisi* su na Yeast podlozi obrazovali retku do srednje gustu vazdušnu miceliju bele boje sa krem, roza i lila nijansama zavisno od pigmentacije u agaru. Supstratna micelija je obrazovala krem, žuti, oker i svetlo do tamno smeđ pigment u podlozi, s tim što je zona tamnijeg pigmenta bila u centralnom delu kolonije sa svetlijim obodom kolonije (Slika 26).

Na V8 hranljivoj podlozi izolati *A. pisi* su obrazovali retku do srednje gustu vazdušnu miceliju bele boje sa ponegde krem nijansama. Pigment u agaru je varirao od belog, krem, lila do svetlo smeđeg, s tim što su izolati formirali tamniji pigment u odsustvu svetlosti (Slika 26).



Slika 26. Varijabilnost vazdušne (A) i supstratne (B) micelije izolata *A.pisi* na različitim hranljivim podlogama na 15°C u dva svetlosna režima:

(st)-12/12h svetlo-tam, (t)-24h tama



Slika 26. (nastavak)

b) Temperatura 20°C

Na Conn's podlozi izolati *A. pisi* su formirali kolonije sa zonama srednje guste do izrazito guste, „vunaste“, vazdušne micelije bele boje sa krem, lila i rozim nijansama usled pigmentacije podloge. Izolati K505 i K21 su formirali gušću vazdušnu miceliju u uslovima tame, dok su ostali izolati (uključujući i referentni izolat) obrazovali vazdušne micelije podjednake gustine nezavisno od svetlosnog režima. Pigmentacija u agaru je varirala od bele, krem-žute, oker, svetlo i tamno smeđe, pa i do rozog pigmenta. Kod izolata K505, K21 i K22 registrovano je obrazovanje tamnijeg pigmenta u uslovima tame, dok je kod izolata K502 bilo obrnuto, a kod referentnog izolata K6 ujednačeno nezavisno od svetlosnog režima (Slika 27).

Na OAT hranljivoj podlozi, izolati *A. pisi* su formirali kolonije neujednačenog oblika i neujednačene gustine vazdušne micelije. Vazdušna micelija je varirala od retke, srednje guste do izrazito guste micelije, bele boje sa ponegde žutim nijansama usled supstratne pigmentacije. Izolati K505, K21 i K22 su formirali gušću vazdušnu miceliju u uslovima tame, dok je kod referentnog izolata K6 i izolata K502 bilo obrnuto. Na naličju kolonija, u agaru su registrovani krem, izrazito žut, oker, svetlo i tamno smeđ pigment, uz intenzivniju pigmentaciju u uslovima tame (Slika 27).

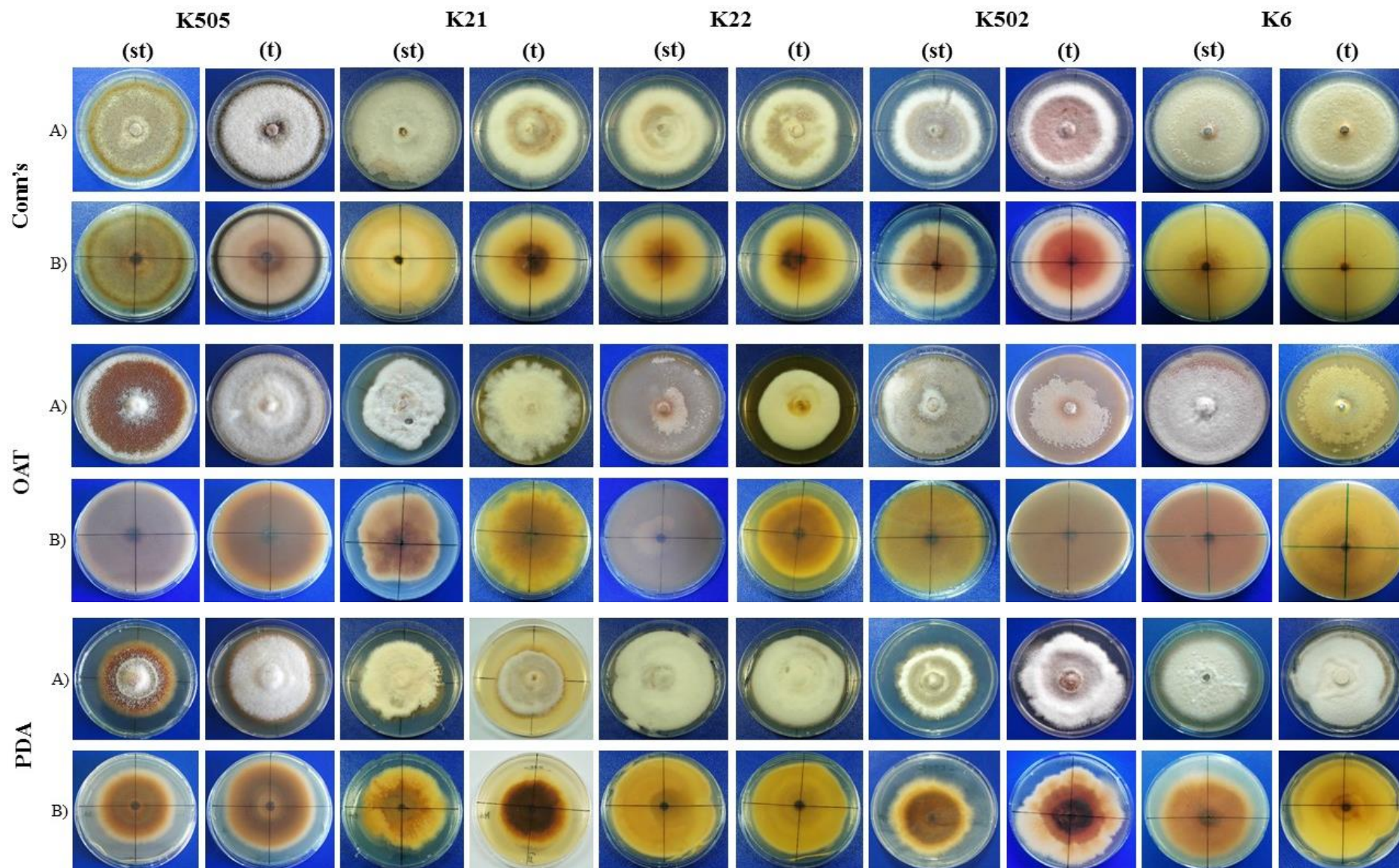
Na PDA podlozi, vazdušna micelija *A. pisi* je varirala od guste, „vunaste“ micelije, do srednje guste micelije bele ili žućkaste boje. Izolati K505, K502 i referentni izolat K6 su formirali gušću vazdušnu miceliju u uslovima tame, dok je kod ostalih izolata vazdušna micelija bila podjednake gustine nezavisno od svetlosnog režima. Supstratna micelija ovih izolata je obrazovala pretežno žut, oker, svetlo i tamno smeđ pigment u agaru, uz pojavu tamnije pigmentacije u uslovima tame kod izolata K505, K21 i K502 (Slika 27).

Na WA podlozi, vazdušna micelija izolata *A. pisi* je bila bele boje, slabo razvijena, paučinasta sa pojavom „jastučastih“ grupacija. Pri ovim uslovima, u samoj podlozi registrovano je odsustvo pigmentacije izuzev kod izolata K505 gde je registrovan smeđ pigment koji je bio nešto intenzivniji u uslovima tame (Slika 27).

Na Yeast podlozi, izolati *A. pisi* su formirali kolonije sa retkom paučinastom ili srednje gustom vazdušnom micelijom uz pojavu nabora u centralnom delu kolonija kod referentnog izolata K6 i izolata K502. Vazdušna micelija je bila dominantno bela uz ponegde krem nijanse, dok je supstratna micelija obrazovala u agaru različite nijanse krem, limun žute (citron), svetlo i tamno smeđe boje. Jedino je kod referentnog izolata K6 registrovana tamnija pigmentacija u

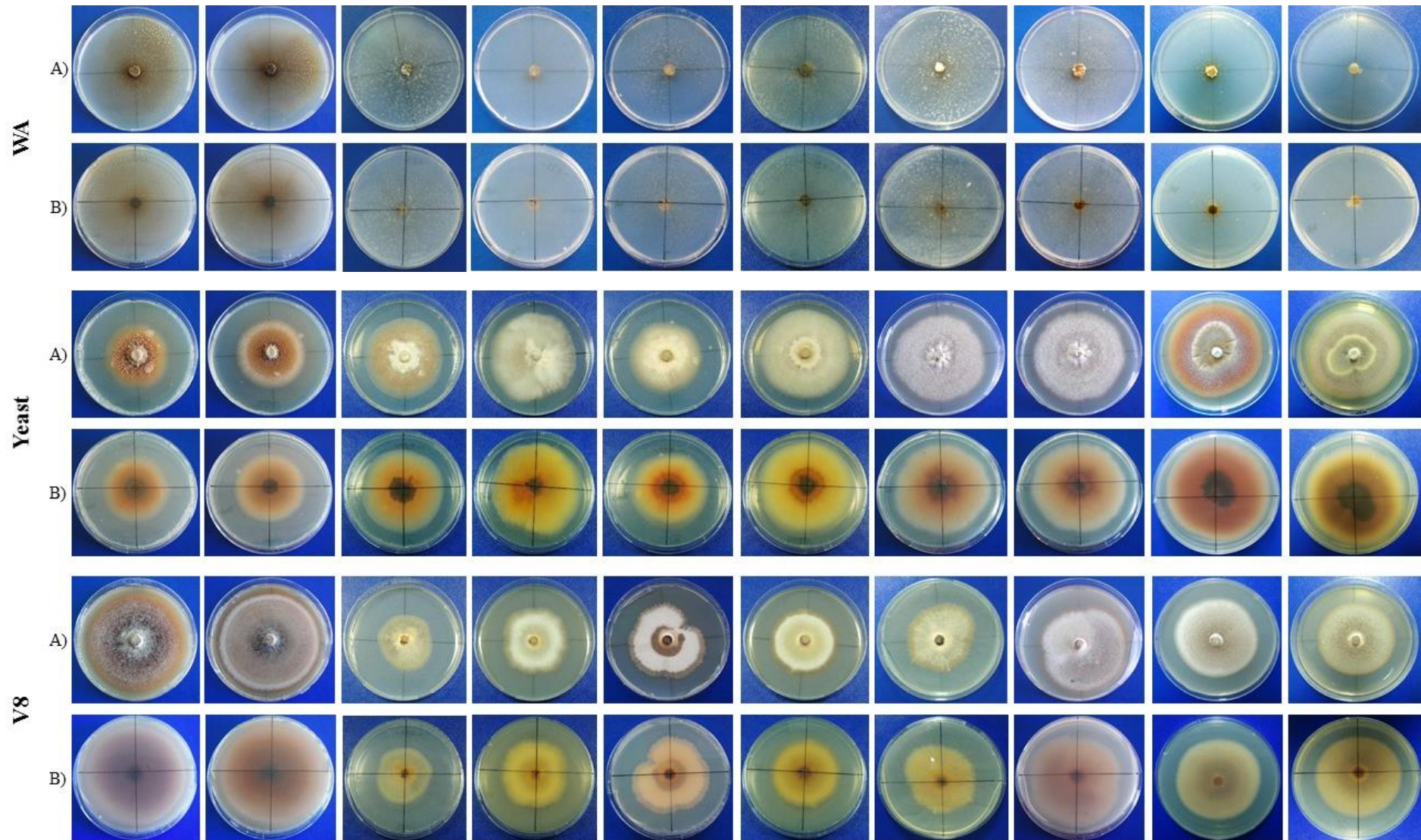
uslovima tame, dok je kod ostalih ispitivanih izolata ona bila podjednaka tj. nezavisna od svetlosnog režima (Slika 27).

Izolati *A. pisi* su na V8 podlozi obrazovali retku do srednje gustu vazdušnu miceliju bele boje. Na naličju kolonija, u agaru, stvaran je beli, krem, žuti i smeđe-lila pigment, sa intenzivnijom pigmentacijom u uslovima tame (Slika 27).



Slika 27. Varijabilnost vazdušne (A) i supstrate (B) micelije izolata *A. pisi* na različitim hranljivim podlogama na 20°C u dva svetlosna režima:

(st)-12/12h svetlo-tam, (t)-24h tama



Slika 27. (nastavak)

c) Temperatura 25°C

Izolati *A. pisi* su na Conn's hranljivoj podlozi obrazovali srednje do izrazito gustu, "vunastu", ujednačenu vazdušnu miceliju bele boje, koja je ponegde poprimala krem nijansu od pigmentacije u podlozi. Supstratna micelija je u agaru obrazovala beli, krem, žuto-smeđ, lila-smeđ, i svetlo i tamno smeđ pigment koji je bio zonalno raspoređen, izuzev kod referentnog izolata K6 u uslovima tame gde je pigmentacija bila neujednačena (Slika 28).

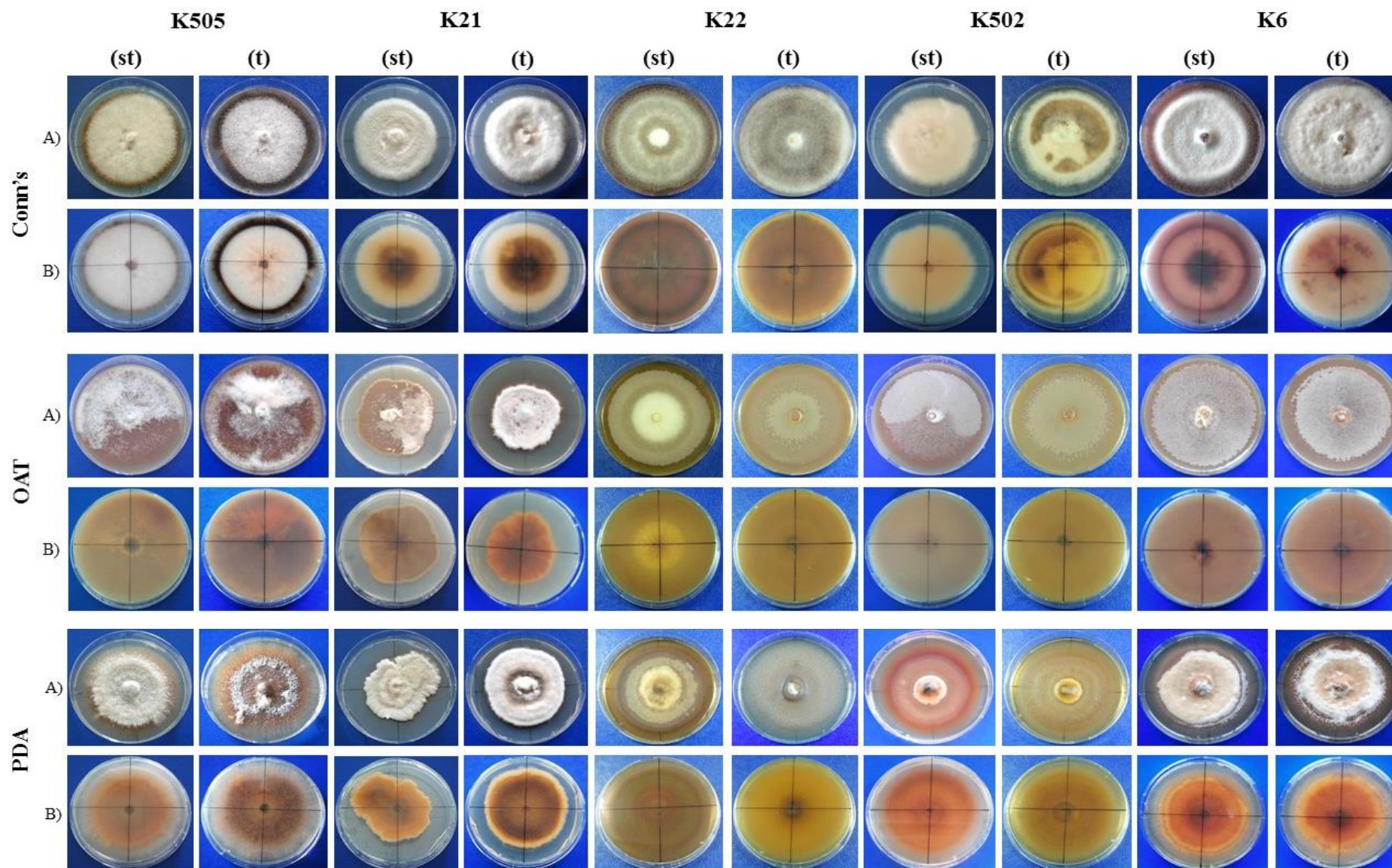
Na OAT hranljivoj podlozi izolati *A. pisi* su obrazovali zone retke paučinaste i srednje guste vazdušne micelije bele boje. Na naličju kolonija registrovana je ujednačena pigmentacija u agaru: sivo-bela, oker-krem i lila-smeđe boje. Nešto tamnija pigmentacija je registrovana u uslovima tame, izuzev kod referentnog izolata kod koga je pigmentacija bila jednakog intenziteta i boje u oba svetlosna režima (Slika 28).

Na PDA podlozi, vazdušna micelija izolata *A. pisi* je bila uglavnom neravnomerno razvijena uz prisustvo zona „kožaste“ supstratne micelije, retke paučinaste i srednje guste bele ili krem vazdušne micelije. U agaru su dominirale različite nijanse svetlo i tamno smeđeg pigmenta, zatim žuto-okker i crvenkasto/narandžasto-smeđe boje kod referentnog izolata K6 i izolata K502 u 12/12h svetlosnom režimu (Slika 28).

Na WA podlozi, izolati *A. pisi* su formirali, kao i na prethodnim temperaturama, retku, paučinastu belo-sivu vazdušnu miceliju sa „jastučastim“ grupacijama koje su predstavljale početak obrazovanja piknida. Pigmentacija u agaru je bila bela ili potpuno odsutna kod svih izolata izuzev kod K505 gde je uočen tamno smeđ do crn pigment (Slika 28).

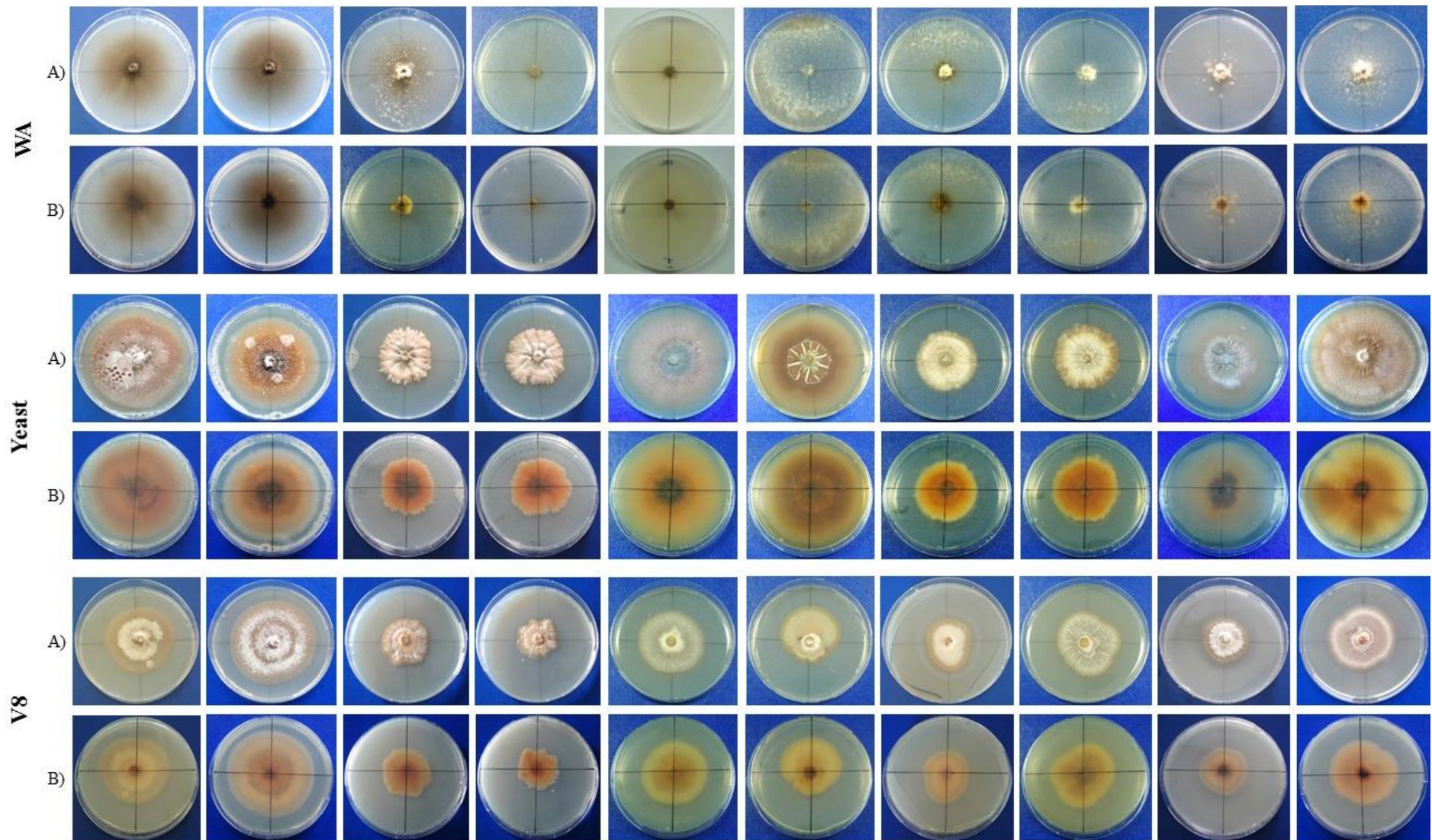
Na Yeast hranljivoj podlozi, vazdušna micelija *A. pisi* je bila krem-bele boje, retka paučinasta uz dominaciju supstratne „kožaste“ micelije sa razvijenim naborima u centralnom delu kolonija. Kompaktna bela vazdušna micelija srednje gustine, takođe uz prisustvo nabora u centru kolonija, je registrovana jedino kod izolata K21 i K502 u oba svetlosna režima. Pigmentacija u podlozi je varirala od bele, žuto-krem, oker, svetlo smeđe, lila-smeđe do tamno smeđe boje (Slika 28).

Kolonije *A. pisi* na V8 podlozi su formirale retku, paučinastu do srednje gustu belu vazdušnu miceliju uz pojavu nabora na obodima kolonije kod nekih izolata. Pigmentacija na naličju kolonija je bila bela, svetlo žuto-krem, i krem – svetlo smeđa (Slika 28).



Slika 28. Varijabilnost vazdušne (A) i supstrate (B) micelije izolata *A. pisi* na različitim hranljivim podlogama na 20°C u dva svetlosna režima:

(st)-12/12h svetlo-tam, (t)-24h tama



Slika 28. (nastavak)

6.9. Varijabilnost porasta izolata vrste *Didymella pinodes* u različitim uslovima gajenja

Nakon dvadesetog dana inkubacije, utvrđena je varijabilnost u porastu kolonija izolata *D. pinodes*, *D. pinodella* i *A. pisi* gajenim na različitim hranljivim podlogama pod različitim svetlosno-temperaturnim režimom.

Na oba svetlosna režima, na 15°C, referentni izolat K18 je imao statistički značajno veći porast na podlogama Conn's, OAT i WA, dok je statistički značajno niži porast zabeležen na Yeast, PDA i V8 hranljivim podlogama. Pri ostalim svetlosno-temperaturnim režimima, referentni izolat je ostvario statistički najmanji porast na Yeast i V8 hranljivim podlogama (Tabela 13).

Poput referentnog izolata, i svi ostali testirani izolati *D. pinodes*, gajeni pod različitim svetlosno-temperaturnim režimom zabeležili su statistički najmanji porast na V8 hranljivoj podlozi, sa izuzetkom izolata K528 koji je u oba svetlosna režima na temperaturi od 15°C ispoljio statistički najniži porast na Yeast hranljivoj podlozi (Tabela 13).

Pod svetlosnim režimom 12/12h svetlo-tama i na temperaturi od 15°C, slično referentnom izolatu, izolati K530 i K514 su ostvarili statistički najveći porast na testiranim podlogama Conn's, OAT i WA, dok je statistički značajno niži porast zabeležen kod hranjivih podloga PDA, Yeast i V8. Za razliku od ova dva navedena izolata, izolat K517 je pod istim uslovima ostvario statistički najniži porast na Yeast i V8 hranljivim podlogama, a u uslovima tame takođe na sve tri podloge - PDA, Yeast i V8 (Tabela 13).

Na temperaturi od 20°C u svetlosnom režimu tame, najslabiji porast na PDA, Yeast i V8 su imali izolati K528, K514 i K517, dok su na 12/12h svetlosnom režimu izolati K530 i K517 imali najlošiji porast na V8, Yeast i OAT podlogama.

Pri temperaturi od 25°C, statistički lošiji porast na podlogama V8, Yeast i PDA je registrovan kod izolata K528 i K514 u oba svetlosna režima. OAT podloga se izdvojila kao nešto nepovoljnija za porast izolata K530 na 12/12h svetlosnom režimu, i izolata K514, K517 i K18 u režimu tame na 25°C (Tabela 13).

Tabela 13. Varijabilnost porasta pojedinačnih izolata *D. pinodes* u različitim uslovima gajenja

Svetlosni režim	12/12h svetlo-tama					24h tama				
Izolat	K530	K528	K514	K517	K18	K530	K528	K514	K517	K18
	15°C					15°C				
Conn's	80,7 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	74,8 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	77,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a
OAT	71,7 ^a	69,3 ^{ab}	85,0 ^a	79,0 ^a	85,0 ^a	67,0 ^{ab}	73,0 ^{ab}	81,5 ^a	80,0 ^a	85,0 ^a
PDA	57,0 ^b	58,7 ^{bc}	62,7 ^b	71,2 ^a	41,8 ^c	58,8 ^{bc}	59,8 ^b	79,0 ^a	71,3 ^b	52,3 ^b
WA	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	73,5 ^a	83,3 ^a	57,5 ^{bc}	80,0 ^a	77,3 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a
Yeast	38,3 ^c	47,5 ^c	63,3 ^b	55,5 ^b	31,3 ^d	43,0 ^{cd}	40,7 ^c	45,5 ^b	67,8 ^b	35,7 ^b
V8	38,8 ^c	52,8 ^{bc}	66,5 ^b	50,7 ^b	61,0 ^b	33,0 ^d	60,3 ^b	48,0 ^b	49,0 ^c	55,5 ^b
	20°C					20°C				
Conn's	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a
OAT	64,3 ^b	78,8 ^{ab}	85,0 ^a	73,0 ^c	78,3 ^a	85,0 ^a	72,5 ^{bc}	69,5 ^b	85,0 ^a	85,0 ^a
PDA	85,0 ^a	75,0 ^b	79,3 ^b	78,0 ^b	85,0 ^a	85,0 ^a	75,8 ^b	66,5 ^c	77,0 ^b	85,0 ^a
WA	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	75,2 ^a
Yeast	65,8 ^b	60,3 ^c	85,0 ^a	64,8 ^d	47,3 ^b	68,2 ^b	68,8 ^c	32,3 ^d	68,7 ^c	39,0 ^b
V8	31,5 ^c	45,2 ^d	43,5 ^c	41,3 ^e	51,5 ^b	41,8 ^c	37,2 ^d	32,5 ^d	51,8 ^d	44,5 ^b
	25°C					25°C				
Conn's	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a
OAT	64,5 ^b	78,8 ^{ab}	73,0 ^c	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	72,5 ^{bc}	69,5 ^b	67,0 ^b	61,0 ^b
PDA	85,0 ^a	72,0 ^b	78,0 ^b	80,3 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	75,8 ^b	66,5 ^b	85,0 ^a	78,8 ^a
WA	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a
Yeast	65,8 ^b	60,3 ^c	63,8 ^d	70,8 ^b	57,3 ^b	68,3 ^b	68,8 ^c	42,0 ^c	59,0 ^c	50,5 ^c
V8	31,5 ^c	44,8 ^d	41,3 ^e	38,5 ^c	29,3 ^c	41,8 ^c	37,3 ^d	32,5 ^d	40,3 ^d	33,0 ^d

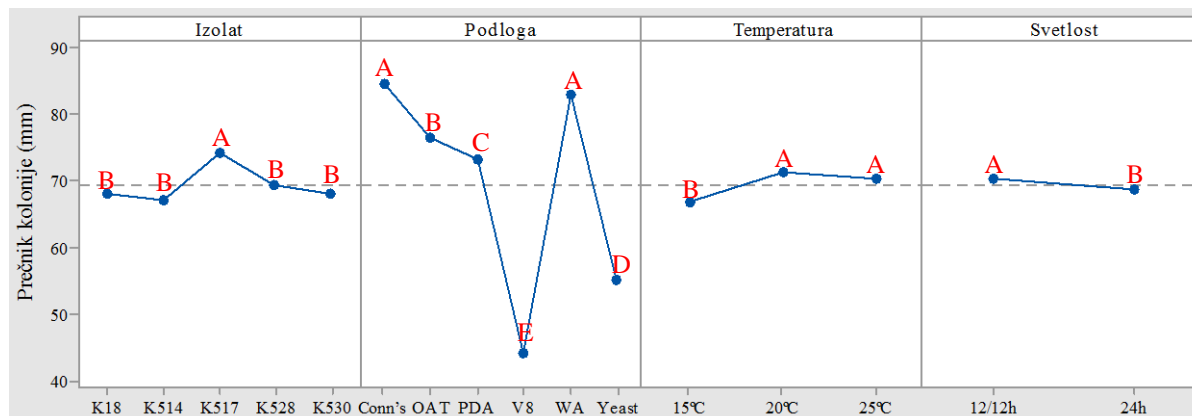
6.9.1. Uticaj svetlosti, temperature i hranljivih podloga na prosečan porast izolata *Didymella pinodes*

U odnosu na sve ispitivane izolate *D. pinodes*, statistički najveći prosečan porast je registrovan kod izolata K517 (74,1 mm), dok između ostalih izolata nije bilo statistički značajnih razlika u prečniku kolonije, te su se oni nalazili u istoj grupi značajnosti (Grafikon 6).

Ispitivanje uticaja hranljivih podloga na porast kolonija *D. pinodes* pokazalo je da su podloge Conn's (85 mm) i WA (84 mm) bile najpovoljnije za porast ove gljive (Grafikon 6). Nasuprot njima, na hranljivim podlogama V8 i Yeast je ostvaren statistički najmanji prosečan porast izolata *D. pinodes*: 44,2 mm (V8) i 55,2 mm (Yeast) (Grafikon 6).

Statistički najveći prosečan porast izolata *D. pinodes* je ostvaren na temperaturama od 20°C - 71,3 mm, i 25°C - 70,1 mm (Grafikon 6).

Ispitivanjem uticaja svetlosnog režima, uočeno je da su izolati imali statistički najveći prosečan porast pri svetlosnom režimu 12/12h svetlo-tama (Grafikon 6).



Grafikon 6. Uticaj svetlosti, temperature i hranljivih podloga na prosečan porast izolata *D. pinodes*

Analizom varijanse utvrđeno je da su svi faktori variranja, osim interakcije temperatura*svetlost statistički značajno uticali na prečnik kolonije izolata (Tabela 14).

Tabela 14. Analiza varijanse prečnika kolonije izolata *D. pinodes* u različitim uslovima gajenja

Faktori variranja	DF	SS	MS	F	P
Izolat	4	3287	821,8	19,03	0,000**
Podloga	5	117418	23483,7	543,76	0,000**
Temperatura	2	2156	1077,9	24,96	0,000**
Svetlost	1	370	369,6	8,56	0,004**
Izolat*Podloga	20	6211	310,5	7,19	0,000**
Izolat*Temperatura	8	2935	366,8	8,49	0,000**
Izolat*Svetlost	4	861	215,3	4,99	0,001**
Podloga*Temperatura	10	14046	1404,6	32,52	0,000**
Podloga*Svetlost	5	775	155,0	3,59	0,003**
Temperatura*Svetlost	2	64	32,1	0,74	0,476
Greška	478	20644	43,2		

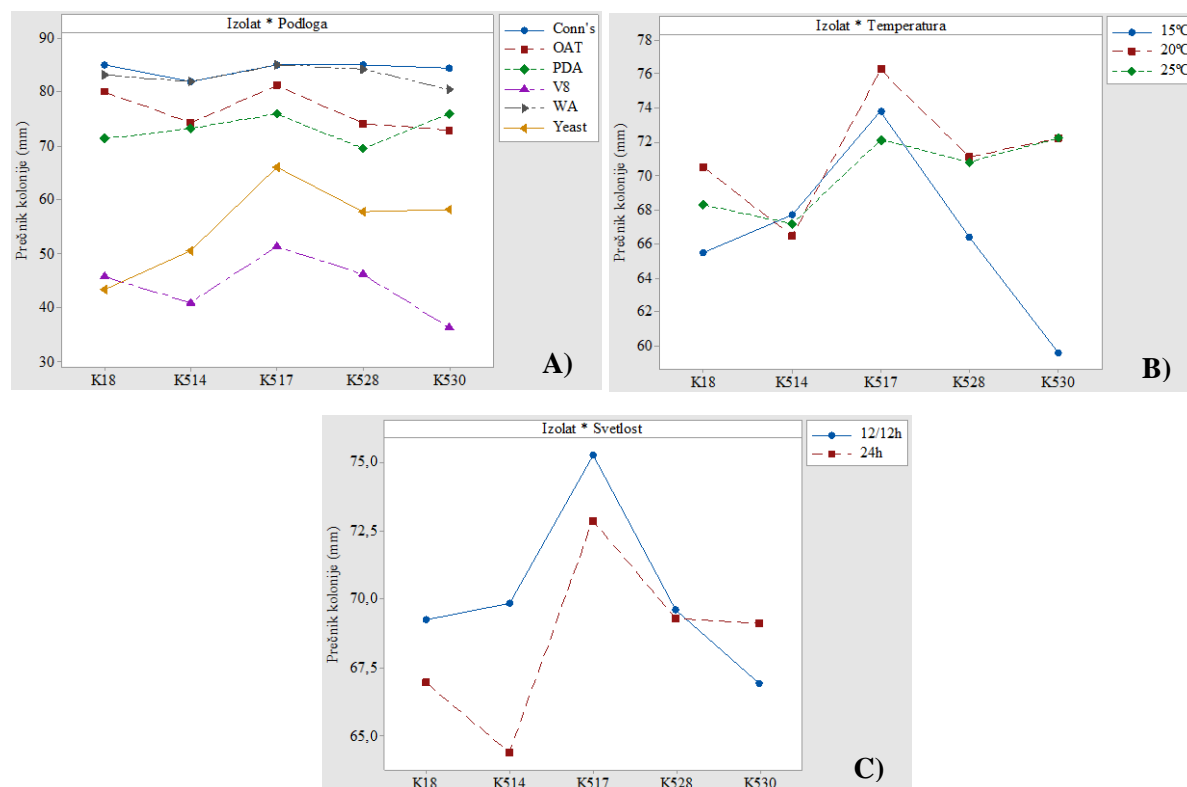
*Statistički značajna razlika ($p < 0,05$); **Statistički visoko značajna razlika ($p < 0,01$)

Varijabilnost u porastu izolata *D. pinodes* se najbolje uočava pri interakciji sa Yeast i V8 hranljivim podlogama, na kojima se izdvojio izolat K517, kao izolat sa najboljim porastom na ovim podlogama, dok su se na istim hranljivim podlogama izdvojili referentni izolati K18

(V8), i K530 (Yeast), kao izolati sa najmanjim porastom (Grafikon 7A). Pri ostalim interakcijama nisu se izdvojile značajne razlike u porasu izolata.

Na osnovu testiranja, uočeno je da je izolat K517 na svim ispitivanim temperaturama ostvario najveći porast u odnosu na ostale izolate. Interakcija izolata K530 sa temperaturom od 15 °C, uticala je da ovaj izolat ostvari najmanji porast u odnosu na ostale izolate pri ovoj temperaturi (Grafikon 7B).

Varijabilnost u prosečnom porastu izolata *D. pinodes* se može uočiti i pri interakciji izolat*svetlo (Grafikon 7C). Izolat K517 je najbolje interreagovao sa oba ispitivana svetlosna režima, te je stoga i ostvaren najveći porast kolonije ovog izolata u odnosu na ostale ispitivane izolate. Takođe je uočeno da je izolat K514 u interakciji sa tamom ostvario najmanji porast.



Grafikon 7. Interakcije između faktora i izolata *D. pinodes*: A) izolat * podloga; B) izolat * temperatura; C) izolat * svetlost

6.10. Varijabilnost porasta izolata vrste *Didymella pinodella* u različitim uslovima gajenja

Referentni izolat K17, gajen pod različitim svetlosno-temperaturnim režimom, je ispoljio statistički najveći porast na svim ispitivanim hranljivim podlogama, osim na PDA, Yeast i V8 (Tabela 15). Većina testiranih izolata je ostvarila statistički najmanji porast na V8 podlozi sa izuzetkom izolata K388 čiji je najslabiji porast bio na 15°C na Yeast hranljivoj podlozi pri 12/12h svetlosnom režimu. Statistički značajno niži porast je uočen kod izolata K17 na PDA i Yeast podlogama na 15°C pri 12/12h svetlo-tama režimu, K388 na Yeast podlozi na 15°C i 25°C u tami, zatim K60 na PDA podlozi na 15°C u tami i Yeast podlozi na 25°C takođe u tami, kao i K63 na Yeast podlozi na 25°C u tami (Tabela 15). U uslovima tame na temperaturi od 15°C, izolat K63 je ostvario maksimalan porast na Conn's, OAT i WA hranljivim podlogama, dok je na ostalim podlogama (PDA, Yeast i V8) porast bio statistički značajno niži.

Tabela 15. Varijabilnost porasta pojedinačnih izolata *D. pinodella* u različitim uslovima gajenja

Svetlosni režim	12/12h svetlo-tama				24h tama			
Izolat	K63	K388	K60	K17	K63	K388	K60	K17
	15°C				15°C			
Conn's	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a
OAT	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	83,8 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a
PDA	85,0 ^a	68,0 ^{ab}	85,0 ^a	78,2 ^b	55,2 ^b	85,0 ^a	73,8 ^b	85,0 ^a
WA	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a
Yeast	81,8 ^a	58,5 ^b	79,7 ^a	77,7 ^b	60,0 ^b	78,7 ^b	69,0 ^c	84,2 ^a
V8	60,0 ^b	62,0 ^{ab}	40,8 ^b	63,3 ^c	59,7 ^b	66,3 ^c	49,3 ^d	59,3 ^b
	20°C				20°C			
Conn's	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a
OAT	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a
PDA	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	82,0 ^a	85,0 ^a	82,0 ^a
WA	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a
Yeast	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	78,0 ^b	85,0 ^a	73,3 ^b	85,0 ^a
V8	53,7 ^b	46,2 ^b	54,0 ^b	52,7 ^b	58,3 ^c	51,5 ^b	67,2 ^c	77,3 ^b
	25°C				25°C			
Conn's	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a
OAT	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a
PDA	82,0 ^a	82,0 ^a	84,7 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a
WA	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a
Yeast	85,0 ^a	85,0 ^a	77,3 ^a	79,7 ^a	77,0 ^b	77,3 ^b	72,0 ^b	84,3 ^a
V8	47,7 ^b	48,0 ^b	47,7 ^b	41,3 ^b	47,3 ^c	60,7 ^c	47,0 ^c	59,7 ^b

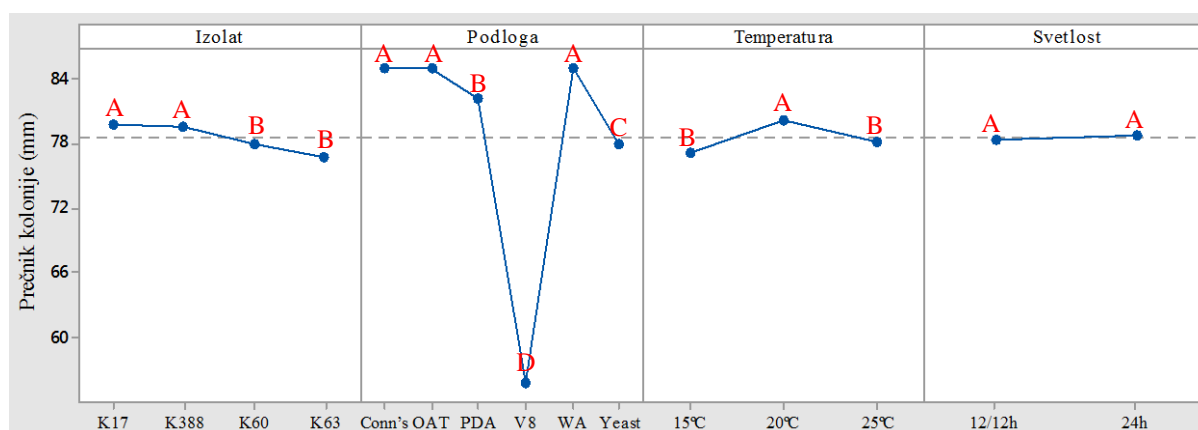
6.10.1. Uticaj svetlosti, temperature i hranljivih podloga na prosečan porast izolata *Didymella pinodella*

Kod svih ispitivanih izolata *D. pinodella*, najveći prosečan porast ostvaren je kod izolata K17 i K388 koji je iznosio 79,7 mm, odnosno 79,6 mm (Grafikon 8).

Ispitivanje uticaja hranljivih podloga na prosečan porast kolonija *D. pinodella* je pokazalo da su podloge Conn's, OAT i PDA bile najpovoljnije za porast ove gljive (Grafikon 8). Svi ispitivani izolati su ostvarili statistički najmanji prosečan porast na V8 podlozi (55,9 mm).

Statistički najveći prosečan porast izolata je ostvaren na temperaturi od 20°C (80,0 mm), dok pri temperaturama od 15°C i 25°C nije bilo statistički značajnih razlika u prosečnom porastu kolonija (Grafikon 8).

Ispitivanjem uticaja svetlosnog režima na porast kolonije izolata nisu uočene statistički značajne razlike (Grafikon 8).



Grafikon 8. Uticaj svetlosti, temperature i hranljivih podloga na prosečan porast izolata *D. pinodella*

Analizom varijanse utvrđeno je da su svi faktori, osim svetlosnog režima i interakcije temperatura*svetlost, statistički značajno uticali na prečnik kolonije izolata (Tabela 16).

Tabela 16. Analiza varijanse prečnika kolonije izolata *D. pinodella* u različitim uslovima gajenja (20. dan)

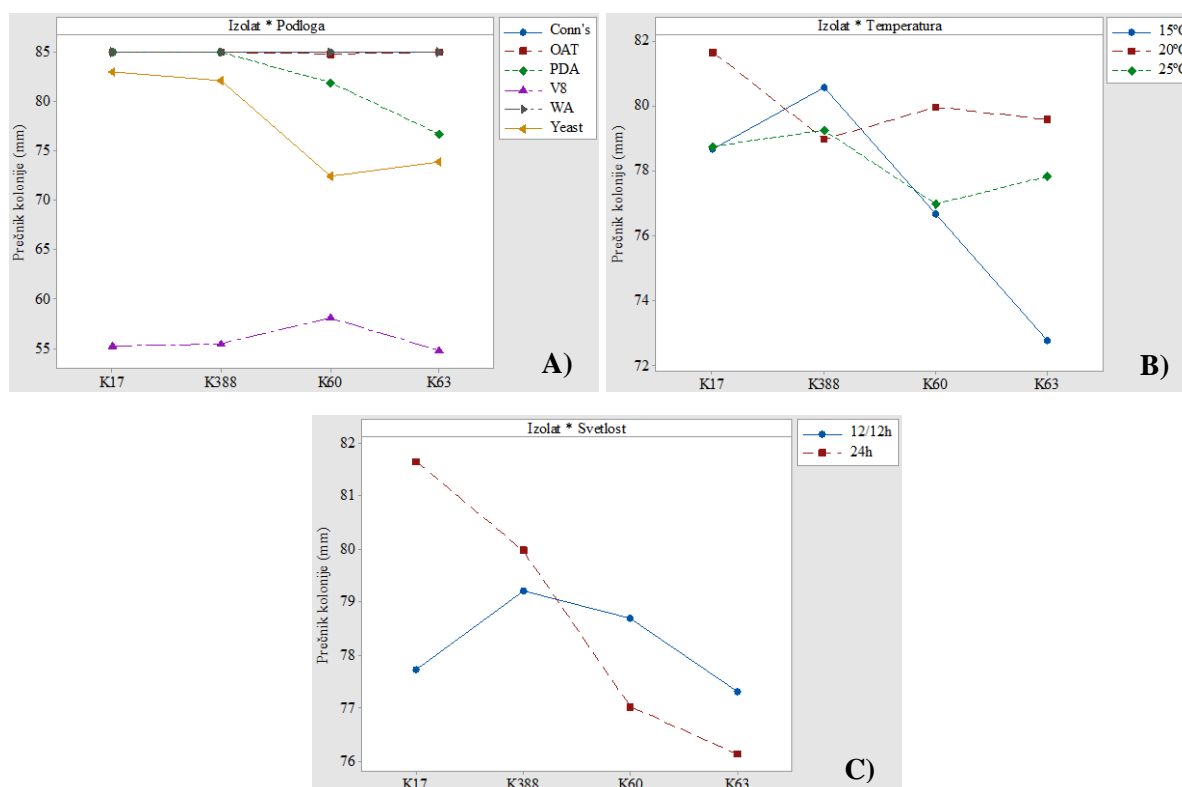
Faktori variranja	DF	SS	MS	F	P
Izolat	3	664,1	221,38	10,21	0,000**
Podloga	5	46975,5	9395,09	433,36	0,000**
Temperatura	2	611,0	305,48	14,09	0,000**
Svetlost	1	22,5	22,46	1,04	0,309
Izolat*Podloga	15	1890,4	126,03	5,81	0,000**
Izolat*Temperatura	6	787,9	131,32	6,06	0,000**
Izolat*Svetlost	3	522,4	174,14	8,03	0,000**
Podloga*Temperatura	10	3432,0	343,20	15,83	0,000**
Podloga*Svetlost	5	1863,7	372,73	17,19	0,000**
Temperatura*Svetlost	2	59,9	29,94	1,38	0,253
Greška	379	8216,5	21,68		

*Statistički značajna razlika ($p < 0,05$); **Statistički visoko značajna razlika ($p < 0,01$)

Varijabilnost u porastu izolata *D. pinodella* se najbolje uočava pri interakciji sa Yeast i PDA hranljivim podlogama, na kojima su se K17 i K388 izdvojili kao izolati sa najboljim porastom (Grafikon 9A). Na ostalim ispitivanim podlogama se nije mogla uočiti varijabilnost izolata, jer su svi izolati ostvarili maksimalan porast na Conn's, OAT i WA, odnosno slab porast na V8 podlozi.

Varijabilnost u porastu izolata uočena je na svim ispitivanim temperaturama (Grafikon 9B). Na osnovu testiranja se pokazalo da je za izolate K17, K60 i K63 najoptimalnija temperatura za porast bila 20°C, odnosno najnepovoljnija temperatura 15°C. Suprotno ovoj grupi izolata, K388 se izdvojio kao izolat kome je najoptimalnija bila temperatura od 15°C, a najnepovoljnija temperatura od 20°C.

Interakcija svetlosni režim*izolat, se ispoljila jedino kod referentnog izolata K17, dok je kod ostalih testiranih izolata (K60, K63 i K388) razlika u porastu varirala svega 1-2 mm zavisno od svetlosnog režima (Grafikon 9C).



Grafikon 9. Interakcije između faktora i izolata *D. pinodella*: A) izolat * podloga; B) izolat * temperatura; C) izolat * svetlost

6.11. Varijabilnost porasta izolata vrste *Ascochyta pisi* u različitim uslovima gajenja

Referentni izolat K6 je na 15°C u režimu 12/12h ostvario statistički značajno najslabiji porast na Yeast i PDA podlogama, odnosno u tami na Yeast, PDA i V8 podlogama, dok je na ostalim podlogama u oba svetlosna režima uočen velik porast kolonija. (Tabela xxx). Pri ostalim svetlosno-temperaturnim režimima, ovaj izolat je ostvario statistički najniži porast na V8 podlozi u odnosu na sve ostale hranjive podloge, s tim što je na 20°C uočen i nešto niži porast kolonija na Yeast podlozi u 12/12h svetlosnom režimu, odnosno PDA podlozi u tami (Tabela 17).

Izolat K505 je na svim ispitivanim svetlosno-temperaturnim režimima ostvario statistički značajno velik porast na Conn's, OAT i WA hranjivim podlogama, kao i na hranljivoj podlozi PDA na 25°C (Tabela 17). Na oba svetlosna režima pri temperaturama od 15 i 20°C, izolat K505 je obrazovao statistički najmanji prečnik kolonije na hranljivoj podlozi Yeast, dok je na temperaturi od 25°C, to registrovano na V8 hranljivoj podlozi. Statistički značajno niži porasti su kod ovog izolata registrovani na V8 i Yeast podlogama u svim

svetlosno-temperaturnim režimima, dok je na 15°C, u oba svetlosna režima, i 20°C u 12/12h svetlosnom režimu niži porast kolonija registrovan i na PDA podlogama.

Izolat K21 je u oba svetlosna režima na 15°C ostvario statistički značajno visok porast na Conn's, OAT i WA hranljivim podlogama. Na 20°C najveći porast ovog izolata je ostvaren na Conn's i WA u 12/12h svetlo-tama režimu, odnosno OAT i WA u tami, dok je na 25°C to zabeleženo samo na WA podlozi u oba svetlosna režima. Izolat K21 je statistički najmanji porast imao na V8, PDA i Yeast hranljivim podlogama (Tabela 17).

Izolat K22 je na 15°C u oba svetlosna režima ostvario maksimaln porast na hranljivim podlogama Conn's, OAT i WA (Tabela 17). Statistički značajno niži porast ovog izolata je registrovan na PDA, Yeast i V8 podlogama na 15°C u oba svetlosna režima kao i na 20°C u režimu tame, dok je na 25°C registrovan statistički značajno niži porast samo na V8 podlozi u oba svetlosna režima. Pri temperaturi od 25°C, izolat K22 je ostvario maksimalan porast na svim ispitivanim podlogama osim na pomenutoj V8 podlozi. Na 20°C, u svetlosnom režimu 12/12h svetlo-tama uočene su razlike u porastu izolata na različitim ispitivanim podlogama, ali te razlike nisu bile statistički značajne (Tabela 17).

Izolat K502, pri svetlosnom režimu 12/12h svetlo-tama, na svim ispitivanim temperaturama je ostvario statistički značajno velik porast na svim testiranim podlogama, osim na hranljivoj podlozi V8 gde je zabeležen statistički značajno niži porast. U uslovima tame na temperaturi od 15°C uočene su razlike u porastu izolata na svim ispitivanim hranljivim podlogama, ali one nisu bile statistički značajne. Na 20°C, izolat K502 je ostvario maksimalan porast na OAT i WA hranljivim podlogama, dok je statistički značajno najmanji porast imao na Yeast hranljivoj podlozi, uz niži porast registrovan i na V8 i Conn's podlogama u tami. Pri temperaturi od 25°C, isti izolat je ostvario velik porast na svim ispitivanim podlogama osim na hranljivoj podlozi V8 gde je registrovan najslabiji porast, i nešto niži porast na podlogama Conn's u 12/12h svetlo-tama režimu, i Yeast u režimu tame (Tabela 17).

Tabela 17. Varijabilnost porasta pojedinačnih izolata *A. pisi* u različitim uslovima gajenja

Svetlosni režim Izolat	12/12h svetlo-tama					24h tama				
	K505	K21	K22	K502	K6	K505	K21	K22	K502	K6
15°C						15°C				
Conn's	85,0 ^a	76,2 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a
OAT	85,0 ^a	81,0 ^a	85,0 ^a	81,3 ^a	82,8 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a
PDA	55,0 ^b	50,3 ^b	76,0 ^b	69,0 ^{bc}	58,5 ^b	56,8 ^c	50,8 ^b	77,8 ^b	74,3 ^a	69,2 ^b
WA	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	77,0 ^{ab}	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	75,3 ^{ab}
Yeast	43,8 ^c	58,7 ^b	63,8 ^c	69,7 ^b	48,2 ^c	29,2 ^d	52,2 ^b	62,2 ^d	73,7 ^a	50,8 ^c
V8	53,0 ^b	54,5 ^b	65,5 ^c	58,0 ^c	81,0 ^a	66,3 ^b	49,0 ^b	69,7 ^c	74,8 ^a	68,0 ^b
20°C						20°C				
Conn's	85,0 ^a	85,0 ^a	79,7 ^a	85,0 ^a	76,2 ^{ab}	85,0 ^a	77,8 ^b	73,0 ^{ab}	76,3 ^b	85,0 ^a
OAT	85,0 ^a	77,8 ^{ab}	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	81,5 ^{ab}	74,5 ^{ab}	85,0 ^a	85,0 ^a
PDA	68,2 ^b	65,7 ^b	70,8 ^a	67,0 ^{ab}	72,3 ^{bc}	70,8 ^{ab}	60,0 ^{cd}	72,0 ^b	74,5 ^{bc}	75,7 ^{bc}
WA	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a
Yeast	55,8 ^c	67,2 ^b	68,7 ^a	81,8 ^{ab}	62,8 ^c	49,5 ^c	64,8 ^c	70,5 ^b	68,0 ^c	82,3 ^{ab}
V8	67,5 ^b	49,3 ^c	74,5 ^a	62,7 ^b	49,5 ^d	66,0 ^{bc}	56,0 ^d	54,2 ^c	71,8 ^{bc}	68,0 ^c
25°C						25°C				
Conn's	85,0 ^a	69,7 ^b	85,0 ^a	77,0 ^b	85,0 ^a	85,0 ^a	68,0 ^b	85,0 ^a	79,0 ^a	85,0 ^a
OAT	85,0 ^a	69,0 ^b	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	55,7 ^c	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a
PDA	81,3 ^a	31,3 ^d	85,0 ^a	83,3 ^{ab}	85,0 ^a	85,0 ^a	64,8 ^b	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a
WA	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a	85,0 ^a
Yeast	75,7 ^b	44,3 ^c	85,0 ^a	85,0 ^a	74,3 ^a	78,8 ^b	39,5 ^d	78,0 ^a	60,0 ^b	82,2 ^a
V8	51,2 ^c	32,2 ^d	53,5 ^b	49,5 ^c	32,0 ^b	64,0 ^c	34,0 ^d	51,8 ^b	44,0 ^c	43,5 ^b

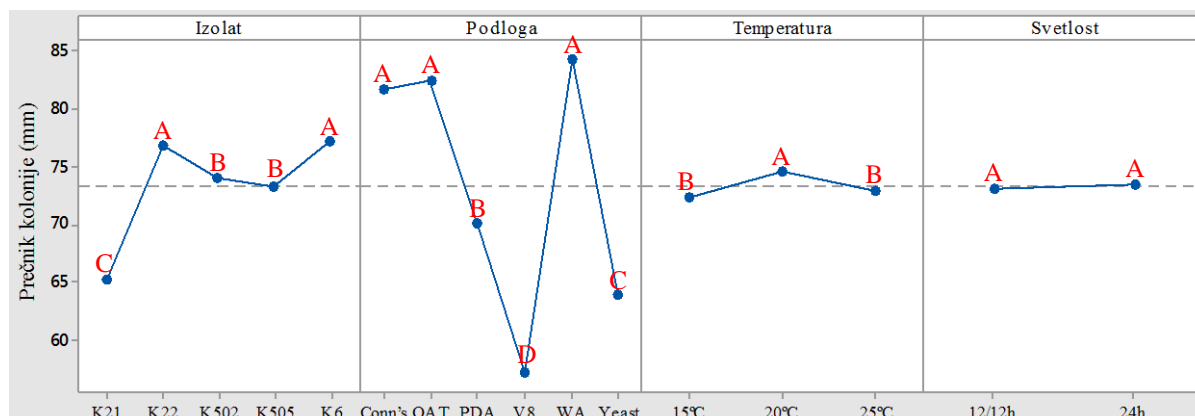
6.11.1. Uticaj svetlosti, temperature i hranljivih podloga na prosečan porast izolata *Ascochyta pisi*

Među ispitivanim izolatima *A. pisi*, statistički najveći prosečan porast imali su referentni izolat K6 (77,2 mm) i K22 (76,8 mm), dok je statistički značajno najmanji prosečan porast imao izolat K21 (65,2 mm) (Grafikon 10).

Ispitivanje uticaja hranljivih podloga na porast kolonija *A. pisi* pokazalo je da su hranjive podloge WA, OAT i Conn's bile najpovoljnije za porast ove gljive (Grafikon 10). Nasuprot njima, najnepovoljnije podloge za rast izolata bile su podloge V8 i Yeast, na kojima su izolati imali prosečan porast od 57,2 mm, odnosno 64,0 mm.

Temperatura od 20°C se izdvojila kao najoptimalnija za porast izolata *A. pisi* jer je pri ovoj temperaturi registrovan najveći prosečan porast kolonija (74,6 mm), dok temperature od 15°C i 20°C nisu statistički značajno uticale na prosečan porast kolonija (Grafikon 10).

Ispitivanjem uticaja svetlosnog režima na prosečan porast kolonija izolata, nisu uočene statistički značajne razlike (Grafikon 10).



Grafikon 10. Uticaj svetlosti, temperature i hranljivih podloga na prosečan porast izolata *A. pisi*

Analizom varijanse utvrđeno je da su svi faktori, osim svetlosnog režima i interakcije temperatura*svetlost, statistički značajno uticali na prečnik kolonije izolata (Tabela 18).

Tabela 18. Analiza varijanse prečnika kolonije izolata *A. pisi* u različitim uslovima gajenja (20. dan)

Faktori variranja	DF	SS	MS	F	P
Izolat	4	10160	2539,9	62,19	0,000**
Podloga	5	57248	11449,6	280,33	0,000**
Temperatura	2	460	229,9	5,63	0,004**
Svetlost	1	37	36,9	0,90	0,342
Izolat*Podloga	20	8097	404,8	9,91	0,000**
Izolat*Temperatura	8	6425	803,1	19,66	0,000**
Izolat*Svetlost	4	527	131,9	3,23	0,012*
Podloga*Temperatura	10	12369	1236,9	30,28	0,000**
Podloga*Svetlost	5	918	183,5	4,49	0,001**
Temperatura*Svetlost	2	36	18,0	0,44	0,643
Greška	478	19523	40,8		

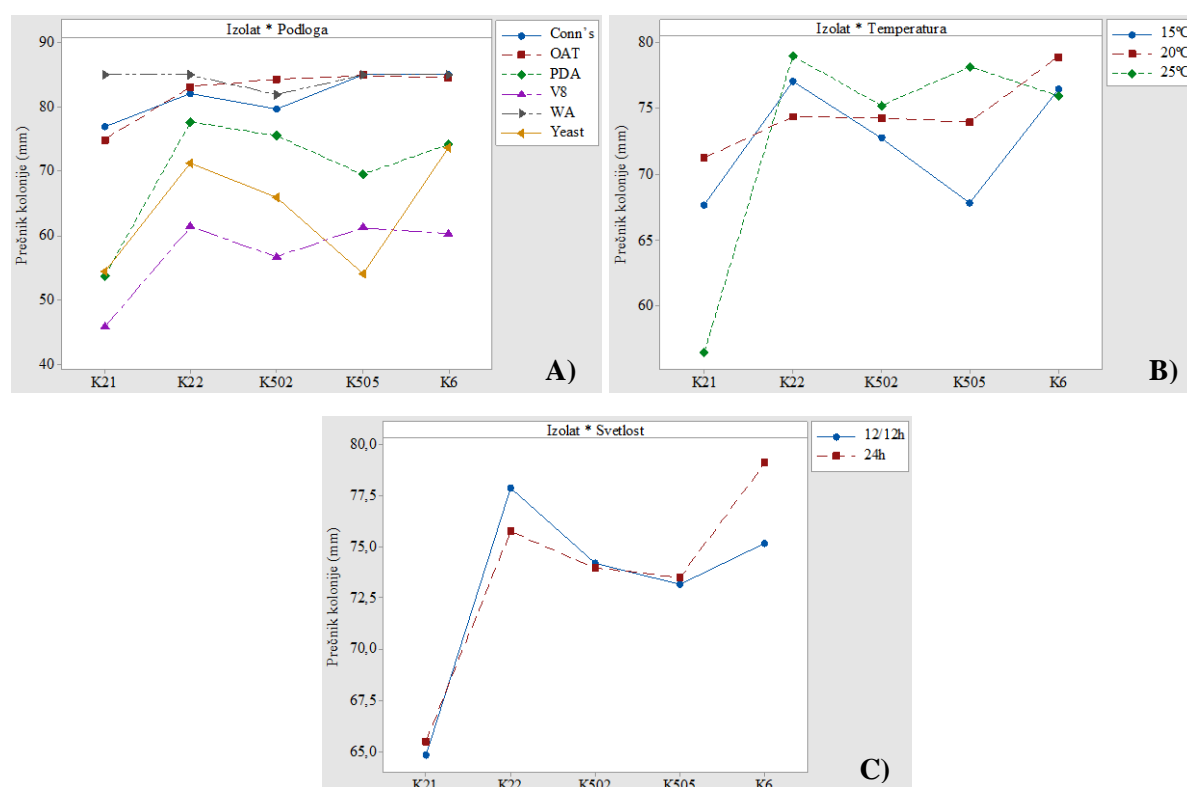
*Statistički značajna razlika ($p < 0,05$); **Statistički visoko značajna razlika ($p < 0,01$)

Varijabilnost u porastu izolata *A. pisi* se sa jedne strane uočava pri interakciji izolatima K22 i K21 i PDA hranljive podloge sa na kojoj su ovi izolati ostvarili najbolji (K22) odnosno najslabiji (K21) porast (Grafikon 11A). Sa druge strane, se izdvaja interakcija izolata K6,

K505 i K21 i Yeast hranljive podloge na kojoj je referentni izolat K6 ostvario najveći porast, dok su izolati K505 i K21 imali najslabiji porast.

Na osnovu testiranja, uočeno je da su temperature od 15°C i 25°C imale najveći uticaj na porast izolata K22, (Grafikon 11B). Takođe je uočeno i da je izolat K21 na istim temperaturama imao najmanji prosečan porast u odnosu na ostale testirane interakcije.

Interakcija svetlosni režim*izolat, pokazala je značajan uticaj svetlosnog režima jedino na referentni izolat K6, dok se kod ostalih testiranih izolata nije uočavao taj uticaj s obzirom da je razlika u prosečnom porastu kolonija varirala od svega 0,3-2 mm zavisno od svetlosnog režima (Grafikon 11C).



Grafikon 11. Interakcije između faktora i izolata vrste *A. pisii*: A) izolat * podloga; B) izolat * temperatura; C) izolat * svetlost

6.12. Mikroskopske morfološke karakteristike izolata vrste *Didymella pinodes*

Od makroskopskih morfoloških karaktera, kod izolata vrste *D. pinodes* praćeno je formiranje aksospora, piknospora i hlamidospora.

6.12.1. Sporulacija izolata

Nakon dvadesetog dana, uoćen je izostanak askospore i piknospora kod svih testiranih izolata *D. pinodes*, gajenih pod različitim svetlosno-temperaturnim režimima na OAT, PDA, WA, Yeast i V8 hranljivim podlogama. Polne i bespolne spore su se jedino formirale na Conn's hranljivoj podlozi na 15°C u tami (K18 i K528) i 20°C pri oba svetlosna režima (svi ispitivani izolati). Takođe, uoćeno je da ni jedan od ispitivanih izolata na temperaturi od 25°C pri oba svetlosna režima i na svim ispitivanim hranljivim podlogama nije obrazovao askospore i piknospore (Tabela 19).

Pri oba svetlosna režima, na temperaturi od 15°C, referentni izolat K18 i izolat K530 nisu obrazovali hlamidospore ni na jednoj od ispitivanih hranljivih podloga. Na svetlosnom režimu 12/12h i temperaturi od 15°C, izolat K514 takođe nije formirao hlamidospore ni na jednoj od ispitivanih podloga. Pri istom svetlosno-temperaturnom režimu izolat K528 nije obrazovao hlamidospore na Conn's, OAT, PDA i WA hranljivim podlogama, kao ni izolat K517 na V8 podlozi. U tami na 15°C, kod izolata K528 i K514 nije uoćeno formiranje hlamidospora na Conn's, OAT i PDA hranljivim podlogama (Tabela 19).

Na 20°C, u uslovima smene svetla i tame, ni jedan od ispitivanih izolata osim referentnog izolata K18, nije obrazovao hlamidospore na V8 hranljivoj podlozi. Takođe, pri oba svetlosna režima na 20°C hlamidospore nisu formirane kod izolata K530 (OAT) i K514 (OAT i PDA) (Tabela 19).

Na 25°C, pri svetlosnom režimu 12/12h svetlo-tama, ni jedan od ispitivanih izolata, uključujući i referentni izolat, nije obrazovao hlamidospore na V8 hranljivoj podlozi. Takođe, izostanak hlamidospora je uoćen na OAT i PDA (K530 i K514), kao i na Yeast (K530) hranljivim podlogama. U tami, na 25°C, referentni izolat K18, nije obrazovao hlamidospore na Yeast i V8 hranljivim podlogama. Hlamidospore nisu formirane ni kod izolata K530 (OAT, PDA, Yeast i V8) i K514 (Conn's, OAT i V8) (Tabela 19).

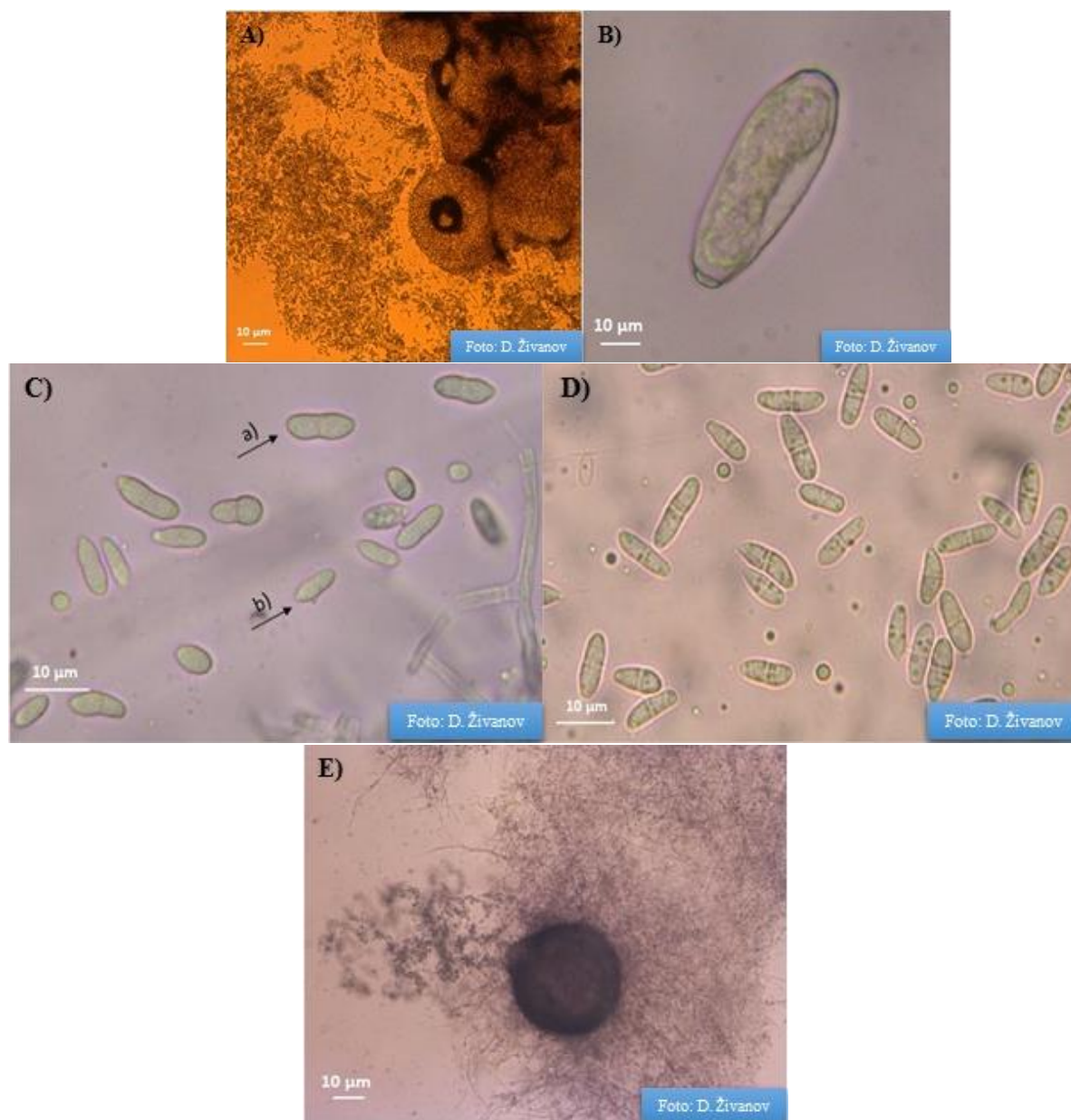
Tabela 19. Sporulacija izolata *D. pinodes* u različitim uslovima gajenja

Svetlosni režim Izolat	12/12h svetlo-tama					24h tama				
	K530	K528	K514	K517	K18	K530	K528	K514	K517	K18
	15°C					15°C				
Conn's	-/-	-/-	-/-	-/+	-/-	-/-	+/+	-/-	-/+	+/+
OAT	-/-	-/-	-/-	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+	-/-
PDA	-/-	-/-	-/-	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+	-/-
WA	-/-	-/-	-/-	-/+	-/-	-/-	-/+	-/+	-/+	-/-
Yeast	-/-	-/+	-/-	-/+	-/-	-/-	-/+	-/+	-/+	-/-
V8	-/-	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+	-/+	-/+	-/-
	20°C					20°C				
Conn's	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
OAT	-/-	-/+	-/-	-/+	-/+	-/-	-/+	-/-	-/+	-/+
PDA	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+
WA	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
Yeast	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
V8	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+	-/-	-/+	-/-	-/+	-/+
	25°C					25°C				
Conn's	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+
OAT	-/-	-/+	-/-	-/+	-/+	-/-	-/+	-/-	-/+	-/+
PDA	-/-	-/+	-/-	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+
WA	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
Yeast	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/-
V8	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+	-/-	-/+	-/-

* piknospore /askospore/ hlamidospore - + formirane, - nisu formirane

6.12.2. Morfologija peritecija i askospora

Na Conn's hranljivoj podlozi, izolati *D. pinodes* su obrazovali sferične peritecije, tamno braon boje (Slika 29A), u kojima su se nalazili sedeći askusi cilindrično-paličastog oblika, veličine 50-70,5 x 10-12 µm (Slika 29B) sa po osam askospora. Askospore su hijalne, dvoćelijske, sa izraženim suženjem na mestu obrazovanja septi. Čelije askospora su nejednakih veličina sa zaobljenim ili suženim vrhom (Slika 29C). Na svakom kroju spora se nalaze uljane kapi (Slika 29D). U zavisnosti od uslova gajenja, prosečna veličina piknospora se kretala od 9,8-12,1 x 4,1-5,1 µm.



Slika 29. Mikroskopske osobine gljive *D. pinodes*: A) peritecija (10x); B) askus (63x); C) askospore (a), piknospore (b) (63x); D) askospore i piknospore sa uljanim kapima (63x); E) piknid (10x)

6.12.3. Morfologija piknida i piknospora

Formirani piknidi su sferičnog oblika, veličine od 70 do 205 µm, tamno braon do crne boje (Slika 29E) u kojima su se obrazovale eliposoidne i hijalne piknospore, sa jednom septom (Slika 29C). Na suprotnim krajevima konidija se uočavaju brojne uljane kapi (Slika 29D). U zavisnosti od uslova gajenja, prosečna veličina piknospora se kretala od 6,8-9,6 x 2,5-3,6 µm.

Prosečne dimenzije askospora i piknospora

Referentni izolat K18 i izolat K528 su obrazovali askospore kao i piknospore u tami na temperaturi od 15°C na Conn's hranljivoj podlozi. Dužina i širina askospora se kretala od 11,0 x 4,1 μm (K18) do 12,1 x 4,8 μm (K528), dok su dimenzije piknospora (dužina x širina) iznosile od 8,9 x 3,1 μm (K18) do 8,0 x 3,2 μm (K528).

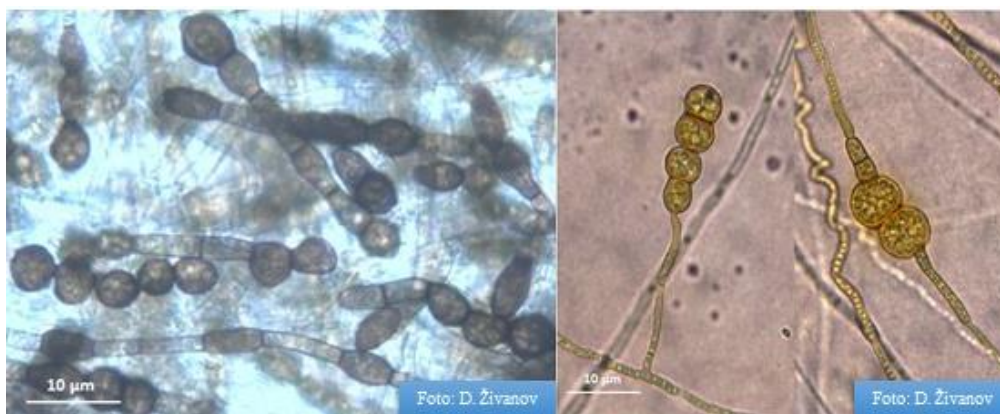
Svi ispitivani izolati su obrazovali askospore kao i piknospore pri oba svetlosna režima na temperaturi od 20°C na Conn's hranljivoj podlozi. Između testiranih izolata pri oba svetlosna režima nisu uočene statistički značajne razlike u dužini i širini askospora. Izolati K530, K517 i referentni izolat K18 su obrazovali statistički najduže i najšire piknospore pri oba svetlosna režima (Tabela 20).

Tabela 20. Prosečna veličina askospora i piknospora izolata *D. pinodes* gajenih na Conn's hranljivoj podlozi pri različitim svetlosnim režimima na temperaturi od 20°C

	12/12h svetlo-tama		24h tama	
	Askospore (dužina x širina μm)	Piknospore (dužina x širina μm)	Askospore (dužina x širina μm)	Piknospore (dužina x širina μm)
K530	10,5 ^a x 4,7 ^a	9,6 ^a x 3,1 ^{ab}	11,1 ^a x 5,1 ^a	8,1 ^{ab} x 3,1 ^a
K528	12,1 ^a x 4,8 ^a	7,9 ^b x 3,0 ^{ab}	12,1 ^a x 4,7 ^a	6,8 ^b x 2,5 ^a
K514	10,8 ^a x 4,2 ^a	7,5 ^b x 2,5 ^b	11,8 ^a x 4,9 ^a	7,4 ^b x 2,6 ^a
K517	10,4 ^a x 4,3 ^a	9,5 ^a x 3,4 ^a	12,0 ^a x 4,9 ^a	8,8 ^a x 3,0 ^a
K18	11,0 ^a x 4,4 ^a	9,4 ^a x 3,6 ^a	11,9 ^a x 4,1 ^a	9,0 ^a x 3,1 ^a

6.12.4. Morfologija i dimenzije hlamidospora

Jednoćelijske hlamidospore su formirane direktno na vršnim ili središnjim delovima hifa u vidu kraćih lanaca, najčešće ne više od 3 hlamidospore u nizu. Hlamidospore su bile od svetlo do tamno braon boje, okruglog do jajastog oblika, obavijene opnom debljine od 0,5 μm do 1 μm , sa krupnim uljanim kapima, maslinasto zelene boje (Slika 30). U zavisnosti od uslova gajenja, prosečna veličina hlamidospora se kretala od 7,1 do 21,9 μm .



Slika 30. Izgled hlamidospora gljive *D. pinodes* (63x)

Referentni izolat K18 je formirao hlamidospore u oba svetlosna režima na 20°C i 25°C, a statistički najveće hlamidospore su registrovane na WA hranljivoj podlozi (Tabela 21). Na temperaturi od 20°C izolat K530 je pri oba svetlosna režima obrazovao statistički najveće hlamidospore na WA hranljivoj podlozi. Na temperaturi od 25°C nisu uočene statistički značajne razlike u veličini formiranih hlamidospora pri svetlosnom režimu 12/12h svetlo-tama, dok su u tami statistički najveće hlamidospore obrazovane na WA hranljivoj podlozi.

Izolat K528 je na 15°C u oba svetlosna režima obrazovao statistički najveće hlamidospore na Yeast hranljivoj podlozi (Tabela 21). Isti izolat je na 20°C u uslovima 12/12h svetlo-tama, obrazovao statistički najveće hlamidospore na WA i Yeast hranljivim podlogama, odnosno u tami na Conn's hranljivoj podlozi. Takođe, izolat K528 je na 25°C u oba svetlosna režima obrazovao statistički najveće hlamidospore na WA hranljivoj podlozi.

Izolat K514 je pri temperaturi od 15°C (24h tama), kao i na temperaturi od 20°C i 25°C pri oba svetlosna režima formirao statistički najveće hlamidospore na WA hranljivoj podlozi (Tabela 21).

Izolat K517 je u oba svetlosna režima na 15°C obrazovao statistički najveće hlamidospore na OAT i WA podlogama, a na temperaturama od 20°C i 25°C, na WA hranljivoj podlozi (Tabela 21).

Tabela 21. Prosečna veličina hlamidospora izolata *D. pinodes* u različitim uslovima gajenja

Svetlosni režim Izolat	12/12h svetlo-tama					24h tama				
	K530	K528	K514	K517	K18	K530	K528	K514	K517	K18
	15°C					15°C				
Conn's	-	-	-	11,3 ^c	-	-	-	-	9,4 ^c	-
OAT	-	-	-	20,6 ^a	-	-	-	-	11,9 ^b	-
PDA	-	-	-	10,9 ^c	-	-	-	-	11,5 ^b	-
WA	-	-	-	19,4 ^a	-	-	12,3 ^b	21,9 ^a	17,3 ^a	-
Yeast	-	15,5 ^a	-	15,3 ^b	-	-	15,1 ^a	12,9 ^b	11,3 ^b	-
V8	-	7,1 ^b	-	-	-	-	8,9 ^c	11,0 ^b	8,1 ^c	-
	20°C					20°C				
Conn's	10,8 ^c	10,1 ^b	11,3 ^c	9,5 ^c	7,8 ^d	11,1 ^c	16,9 ^a	10,3 ^b	10,0 ^c	11,1 ^{bc}
OAT	-	11,0 ^b	-	12,5 ^b	9,4 ^{bc}	-	11,3 ^{cd}	-	10,0 ^c	10,0 ^{bcd}
PDA	10,2 ^c	10,3 ^b	-	12,1 ^b	10,6 ^b	12,0 ^{bc}	10,5 ^{cd}	-	11,5 ^b	9,4 ^d
WA	15,6 ^a	14,4 ^a	15,1 ^a	18,0 ^a	13,3 ^a	18,9 ^a	15,0 ^b	17,9 ^a	13,5 ^a	17,3 ^a
Yeast	13,2 ^b	14,7 ^a	13,4 ^b	13,7 ^b	12,6 ^a	13,1 ^b	12,0 ^c	11,5 ^b	11,2 ^{bc}	11,4 ^b
V8	-	-	-	-	8,7 ^{cd}	-	10,0 ^d	-	8,1 ^d	9,8 ^{cd}
	25°C					25°C				
Conn's	12,9 ^a	13,8 ^b	10,0 ^b	11,3 ^b	10,5 ^b	9,1 ^b	11,8 ^b	-	10,9 ^b	8,8 ^c
OAT	-	10,0 ^c	-	10,4 ^b	11,0 ^b	-	9,5 ^c	-	11,0 ^b	9,4 ^c
PDA	-	11,2 ^c	-	11,3 ^b	10,0 ^{bc}	-	9,8 ^c	7,7 ^b	11,2 ^b	14,0 ^b
WA	13,5 ^a	17,6 ^a	13,1 ^a	15,3 ^a	16,6 ^a	18,0 ^a	15,8 ^a	14,0 ^a	13,2 ^a	16,6 ^a
Yeast	-	11,2 ^c	12,7 ^a	11,6 ^b	8,9 ^c	-	10,2 ^c	12,9 ^a	11,1 ^b	-
V8	-	-	-	-	-	-	9,2 ^c	-	10,0 ^b	-

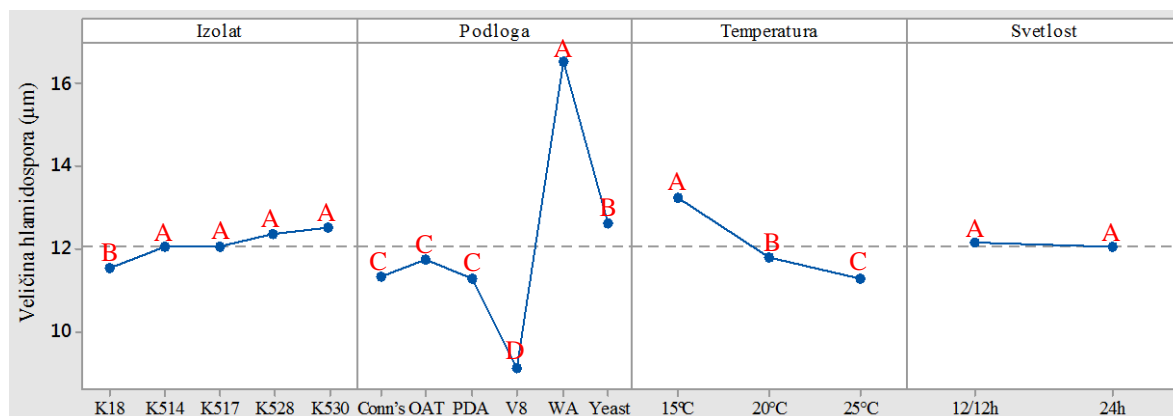
Uticaj svetlosti, temperature i hranljivih podloga na prosečne veličine hlamidospora

Ispitivanjem uticaja pojedinačnih faktora na prosečnu veličinu obrazovanih hlamidospora, uočeno je da je referentni izolat K18 obrazovao statistički najmanje hlamidospore (11,5 μm), dok među ostalim ispitivanim izolatima nije bilo statistički značajnih razlika u veličini obrazovanih hlamidospora (Grafikon 12).

Ispitivanjem uticaja hranljivih podloga na prosečnu veličinu obrazovani hlamidospora izolata *D. pinodes* je pokazalo da su najveće hlamidospore formirane na WA (16,6 μm), odnosno najmanje na V8 (9,0 μm) hranljivoj podlozi (Grafikon 12).

Temperatura od 15°C je napovoljnije uticala na prosečnu veličinu hlamidospora *D. pinodes*, dok je najnepovoljnija bila temperatura od 25°C (Grafikon 12).

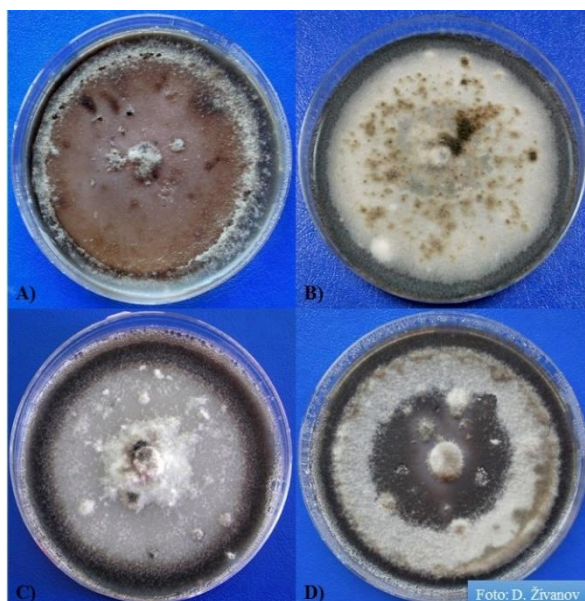
Svetlosni režim nije statistički značajno uticao na prosečnu veličinu hlamidospora izolata vrste *D. pinodes* (Grafikon 12).



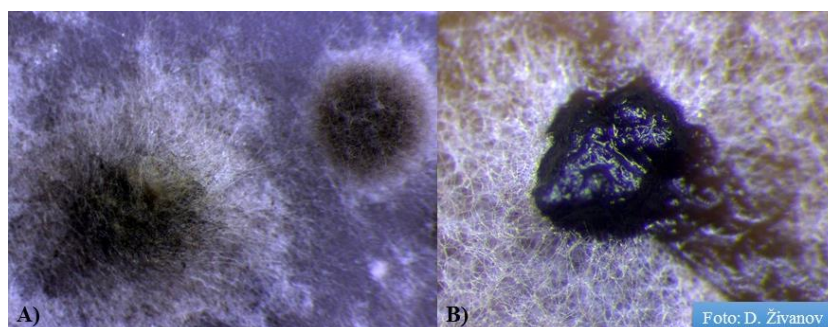
Grafikon 12. Uticaj svetlosti, temperature i hranljivih podloga na prosečnu veličinu hlamidospora izolata *D. pinodes*

6.12.5. Morfologija sklerocija

Nakon dvadesetog dana, ni jedan od ispitivanih izolata *D. pinodes*, gajenih pod različitim svetlosno-temperaturnim režimima nije formirao sklerocije na OAT, PDA, WA, Yeast i V8 hranljivim podlogama. Među ispitivanim izolatima, jedino su izolati K528 i K517 formirali sklerocije na Conn's hranljivoj podlozi pri oba svetlosna režima na temperaturi od 20°C i 25°C. Na temperaturi od 20°C, zabeleženo je slabo, odnosno na 25°C obilato formiranje sklerocija (Slika 31). Formirane sklerocije su bile nepravilnog oblika, crne boje (Slika 32), veličine od 0,5 do 2 mm.



Slika 31. Formiranje sklerocija izolata *D. pinodes* u Conn's hranljivoj podlozi: A) izolat K517 na 20°C, B) izolat K517 na 25°C; C) izolat K528 na 20°C, D) izolat K528 na 25°C



Slika 32. Izgled sklerocija gljive *D. pinodes* u Conn's hranljivoj podlozi pod razlitim uvećanjem: A) 1,25x; (B) 3,5x

6.13. Mikroskopske morfološke karakteristike izolata vrste *Didymella pinodella*

6.13.1 Sporulacija izolata

Nakon dvadesetog dana, većina testiranih izolati *D. pinodella* je dobro sporulisala na ispitivanim hranljivim podlogama pod različitim svetlosno-temperaturnim režimom.

Pri režimu 12/12h svetlo-tama na svim temperaturnim režimima izolat K63, kao i izolat K60 u tami, nisu obrazovali pikno i hlamidospore na V8 hranljivoj podlozi. Takođe, na istoj

hranljivoj podlozi pri režimu 12/12h svetlo-tama, sporulacija je u potpunosti izostala kod izolata K388 (15°C i 20°C) i K60 (20°C i 25°C), dok je u uslovima 24h tame, sporulacija u potpunosti izostala kod izolati K63 (15°C i 25°C) i K388 (20°C). Pored navedene podloge na temperaturi od 15°C, izolati K388 (12/12h svetlo-tama) i K63 (24h tama) nisu obrazovali spore na Conn's hranljivoj podlozi (Tabela 22).

Ispitivani izolati *D. pinodella* gajeni na različitim hranljivim podlogama pod različitim svetlosno-temperaturnim režimom nisu obrazovali piknospore na WA, Yeast i V8 hranljivim podlogama. Takođe, ni jedan od ispitivanih izolata, uključujući i referentni izolat K17, nije obrazovao piknospore na PDA hranljivoj podlozi na temperaturi od 15°C pri oba svetlosna režima (Tabela 22).

Na svetlosnom režimu 12/12h na 15°C, piknospore nisu formirane na Conn's (K63, K388 i K60) i OAT (K388) hranljivim podlogama, odnosno na 25°C pri oba svetlosna režima na PDA hranljivoj podlozi (K60) (Tabela 22).

U uslovima 24h tama, na 15°C, konidije nisu obrazovane na Conn's (K63 i K17) i OAT (K388, K17) hranljivim podlogama (Tabela 22).

Izolat K60 je u uslovima smene svetla i tame 12/12h na temperaturi od 15°C formirao piknospore samo na OAT hranljivoj podlozi, dok je izolat K388 u uslovima 24h tame obrazovao piknospore samo na Conn's hranljivoj podlozi. Pri istoj temperaturi, izolat K63 je formirao piknospore samo na OAT hranljivoj podlozi pri oba svetlosna režima (Tabela 22).

Ispitivanjem različitih uslova gajenja na sposobnost izolata *D. pinodella* da obrazuju hlamidospore, uočeno je da se hlamidospore takođe nisu obrazovale pri režimu 12/12h svetlo-tama (25°C) kod izolata K60 na OAT hranljivoj podlozi, kao ni u tami (20°C) kod izolata K63 na Conn's hranljivoj podlozi (Tabela 22).

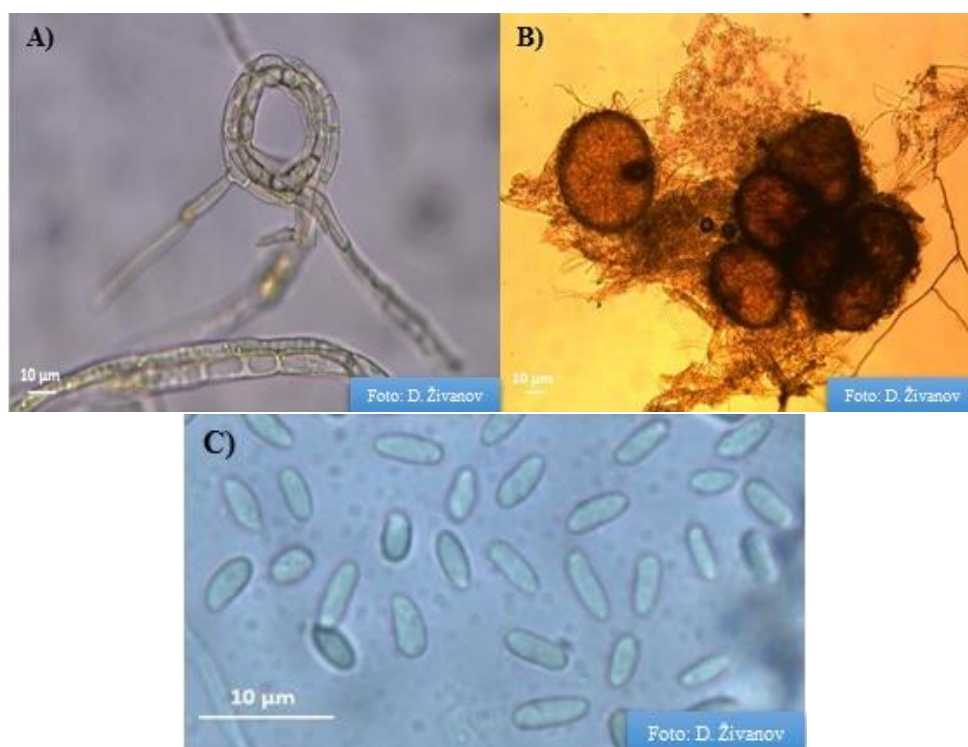
Tabela 22. Sporulacija izolata *D. pinodella* u različitim uslovima gajenja

Svetlosni režim Izolat	12/12h svetlo-tama				24h tama			
	K63	K388	K60	K17	K63	K388	K60	K17
	15°C				15°C			
Conn's	-/+	-/-	-/+	+/+	-/-	+/+	+/+	-/+
OAT	+/+	-/+	+/+	+/+	+/+	-/+	+/+	-/+
PDA	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
WA	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
Yeast	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
V8	-/-	-/-	-/+	-/+	-/-	-/+	-/-	-/+
	20°C				20°C			
Conn's	+/+	+/+	+/+	+/+	+/-	+/+	+/+	+/+
OAT	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
PDA	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
WA	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
Yeast	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
V8	-/-	-/-	-/-	-/+	-/+	-/-	-/-	-/+
	25°C				25°C			
Conn's	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
OAT	+/+	+/+	+/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
PDA	+/+	+/+	-/+	+/+	+/+	+/+	-/+	+/+
WA	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
Yeast	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
V8	-/-	-/+	-/-	-/+	-/-	-/+	-/-	-/+

* piknospore / hlamidospore - + formirane, - nisu formirane

6.13.2. Morfologija piknida i piknospora

Početak formiranja piknida prikazan je na Slici 33A. Formirani piknidi su sferičnog do bubrežastog oblika, veličine 55-190 μm , tamno smeđe do crne boje (Slika 33B). U njima su se obrazovale hijalne, jednoćeliske, aseptirane piknospore ovalnog do cilindričnog oblika, zaobljene na krajevima (Slika 33C). U zavisnosti od uslova gajenja, prosečna veličina piknospora se kretala od 4,4-8,5 x 1,6 -3,4 μm .



Slika 33. Mikroskopske osobine gljive *D. pinodella*: A) početak formiranja piknida (10x); B) piknidi (10x); C) piknospore (63x)

Prosečne dimenzije piknospora - a) dužina

Referentni izolat K17 je na temperaturi od 15°C formirao piknospore samo u uslovima 12/12h svetlo-tama, i nisu uočene značajne razlike u dužini obrazovanih piknospora. Na temperaturi od 20°C i svetlosnom režimu 12h/12h, statistički najveću dužinu piknospore su imale na Conn's, odnosno na OAT hranljivoj podlozi na 25°C. U tami na 20°C i 25°C, najduže piknospore su formirane na OAT hranljivoj podlozi (Tabela 23).

Izolat K63 je na 15°C u oba svetlosna režima formirao piknospore samo na Conn's hranljivoj podlozi. Na 20°C, u oba svetlosna režima, izolat K63 je formirao statistički najduže piknospore na PDA hranljivoj podlozi. Na 25°C, najduže piknospore su formirane na PDA (12/12h svetlo-tama) i Conn's (24h tama) hranljivim podlogama (Tabela 23).

Izolat K388 je na 15°C formirao piknospore samo na PDA hranljivoj podlozi u uslovima tame. Ovaj izolat je na 20°C, u oba svetlosna režima formirao najduže piknospore na OAT hranljivoj podlozi. Takođe, na 25°C, isti izolat je u uslovima 12/12h svetlo-tama, formirao statistički najduže spore na PDA hranljivoj podlozi, dok u tami nije bilo značajnih razlika u dužini obrazovanih piknospora (Tabela 23).

Kod izolata K60 na 15°C pri oba svetlosna režima nisu uočene značajne razlike u dužini piknospora. Ovaj izolat je pri režimu svetla 12h/12h, na 20°C, formirao najduže piknospore na Conn's podlozi, dok na temperaturi od 25°C nisu uočene statistički značajne razlike. U tami, na 20°C i 25°C, ovaj izolat je formirao statistički najduže piknospore na Conn's hranljivoj podlozi (Tabela 23).

Tabela 23. Prosečna dužina piknospora izolata *D. pinodella* u različitim uslovima gajenja

Svetlosni režim Izolat	12/12h svetlo-tama				24h tama			
	K63	K388	K60	K17	K63	K388	K60	K17
	15°C				15°C			
Conn's	-	-	-	4,7 ^a	-	6,0	5,7 ^a	-
OAT	5,1	-	5,7	4,5 ^a	6,6	-	5,7 ^a	-
PDA	-	-	-	-	-	-	-	-
	20°C				20°C			
Conn's	7,0 ^a	6,1 ^b	7,6 ^a	5,1 ^a	6,8 ^a	5,7 ^b	7,0 ^a	4,6 ^{ab}
OAT	6,0 ^b	6,6 ^a	6,2 ^b	4,4 ^b	6,0 ^b	6,7 ^a	6,2 ^b	4,8 ^a
PDA	7,1 ^a	6,0 ^b	7,5 ^a	4,7 ^b	7,0 ^a	5,6 ^b	6,9 ^a	4,4 ^b
	25°C				25°C			
Conn's	5,8 ^c	5,6 ^b	7,8 ^a	5,2 ^b	8,5 ^a	6,1 ^a	8,0 ^a	5,2 ^{ab}
OAT	6,7 ^b	5,8 ^b	7,5 ^a	6,5 ^a	6,9 ^b	5,9 ^a	7,2 ^b	5,4 ^a
PDA	7,5 ^a	6,9 ^a	-	5,5 ^b	6,3 ^c	5,9 ^a	-	5,0 ^b

Prosečne dimenzije piknospora - b) širina

Kod referentnog izolata K17, u uslovima 12/12h svetlo-tama, na 15°C, nisu uočene statistički značajne razlike u širini formiranih piknospora, dok u uslovima tame piknospore nisu ni obrazovane (Tabela 24). Na 20°C i 25°C, pri oba svetlosna režima, ovaj izolat je obrazovao statistički najšire piknospore na OAT hranljivoj podlozi. Izolat K63, je pri oba svetlosna režima, na 15°C, formirao piknospore samo na OAT hranljivoj podlozi. Na temperaturi od 20°C, u oba svetlosna režima, statistički najšire piknospore su registrovane na Conn's hranljivoj podlozi. Takođe, u uslovima tame, na 25°C, statistički najšire piknospore su obrazovane na Conn's hranljivoj podlozi, dok u uslovima 12/12h svetlo-tama, nije bilo značajnijih razlika u širini formiranih piknospora na hranljivim podlogama (Tabela 24).

Kod izolata K388 pri smeni svetla i tame, na temperaturi od 15°C, piknospore nisu formirane. Na temperaturama od 20°C i 25°C nisu uočene statistički značajne razlike u širini

obrazovanih spora. Međutim, u tami, najšire piknospore su bile formirane na OAT (20°C), odnosno na OAT i Conn's (25°C) hranljivim podlogama (Tabela 24).

Kod izolata K60 pri oba svetlosna režima na 15°C i 25°C, nisu uočene statistički značajne razlike u širini formiranih piknospora. Izolat K60 je u uslovima smene svetla i tame na temperaturi od 20°C formirao najšire spore na Conn's, odnosno u tami na OAT hranljivoj podlozi (Tabela 24).

Tabela 24. Prosečna širina piknospora izolata *D. pinodella* u različitim uslovima gajenja

Svetlosni režim	12/12h svetlo-tama				24h tama			
Izolat	K63	K388	K60	K17	K63	K388	K60	K17
	15°C				15°C			
Conn's	-	-	-	2,1 ^a	-	2,8	2,4 ^a	-
OAT	2,6	-	2,3	2,1 ^a	2,9	-	2,4 ^a	-
PDA	-	-	-	-	-	-	-	-
	20°C				20°C			
Conn's	3,0 ^a	3,0 ^a	3,2 ^a	2,0 ^a	2,9 ^a	2,5 ^b	2,7 ^b	1,9 ^b
OAT	2,8 ^a	2,9 ^a	2,7 ^b	2,1 ^a	2,8 ^a	3,0 ^a	3,0 ^a	2,2 ^a
PDA	2,6 ^b	2,9 ^a	3,1 ^a	1,6 ^b	2,6 ^b	2,4 ^b	2,9 ^{ab}	1,8 ^b
	25°C				25°C			
Conn's	2,8 ^a	2,7 ^a	3,3 ^a	2,1 ^c	3,4 ^a	2,9 ^a	3,1 ^a	2,2 ^b
OAT	2,8 ^a	2,7 ^a	3,3 ^a	3,0 ^a	3,2 ^a	2,9 ^a	3,2 ^a	2,7 ^a
PDA	2,9 ^a	2,8 ^a	-	2,4 ^b	2,7 ^b	2,6 ^b	-	2,2 ^b

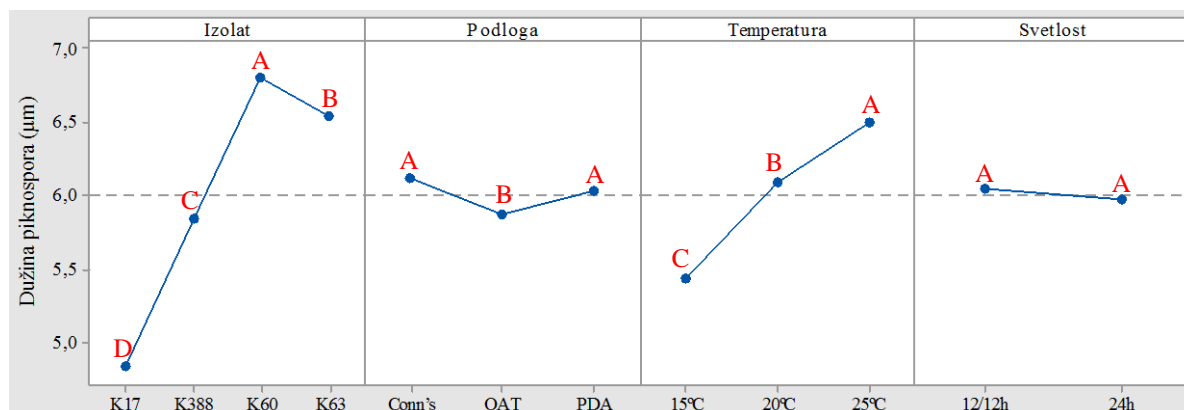
Uticaj svetlosti, temperature i hranljivih podloga na prosečnu dužinu i širinu piknospora

Ispitivanjem uticaja pojedinačnih faktora na prosečnu dužinu obrazovanih piknospora, uočeno je da je referentni izolat K17 obrazovao statistički najkraće piknospore (4,8 μm), dok je statistički najduže piknospore formirao izolat K60 (6,8 μm) (Grafikon 13).

Ispitivanjem uticaja hranljivih podloga na prosečnu dužinu piknospora *D. pinodella* je pokazalo da su se najduže piknospore formirale na Conn's (6,1 μm) i PDA (6,0 μm), odnosno najkraće na OAT (5,9 μm) hranljivim podlogama (Grafikon 13).

Temperatura od 25°C je najpovoljnije uticala na prosečnu dužinu piknospora izolata *D. pinodella*, dok je najnepovoljnija bila temperatura od 15°C (Grafikon 13).

Svetlosni režim nije statistički značajno uticao na prosečnu dužinu piknospora izolata vrste *D. pinodella* (Grafikon 13).



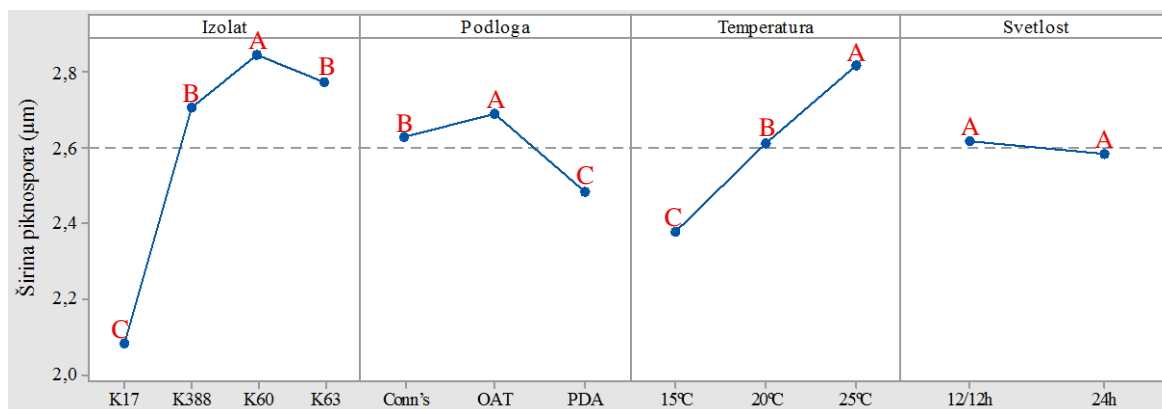
Grafikon 13. Uticaj svetlosti, temperature i hranljivih podloga na prosečnu dužinu piknospora izolata *D. pinodella*

Ispitivanjem uticaja pojedinačnih faktora na prosečnu širinu piknospora, uočeno je da je referentni izolat K17 obrazovao statistički najuže piknospore (2,1 µm), dok je statistički najšire piknospore formirao izolat K60 (2,8 µm) (Grafikon 14).

Ispitivanjem uticaja hranljivih podloga na prosečnu širinu piknospora *D. pinodella* je pokazalo da su najšire piknospore formirane na OAT (2,7 µm), odnosno najmanje na PDA (2,5 µm) hranljivim podlogama (Grafikon 14).

Temperatura od 25°C je najpovoljnije uticala na prosečnu širinu piknospora, dok je najnepovoljnija bila temperatura od 15°C (Grafikon 14).

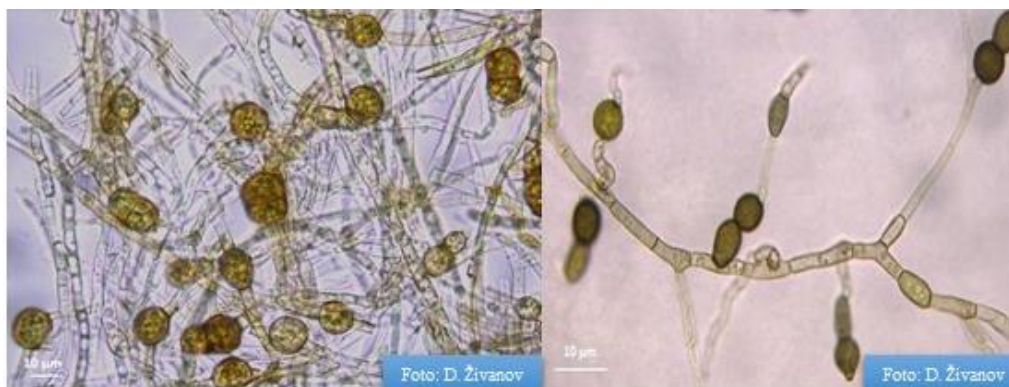
Svetlosni režim nije statistički značajno uticao na prosečnu širinu piknospora izolata *D. pinodella* (Grafikon 14).



Grafikon 14. Uticaj svetlosti, temperature i hranljivih podloga na prosečnu širinu piknospora izolata *D. pinodella*

6.13.3. Morfologija i prosečne dimenzije hlamidospora

Hlamidospore su formirane direktno na vršnim ili središnjim delovima hifa, pojedinačno ili u kraćim nizovima, najčešće 2 do 3 hlamidospore u nizu (Slika 34). Hlamidospore su jednoćelijske, svetlo do tamno smeđe boje, sferičnog oblika, obavijene opnom debljine od 0,4 do 1 µm, sa krupnim uljanim kapima, maslinasto zelene boje veličine od 7,1 do 17,8 µm.



Slika 34. Izgled hlamidospora gljive *D. pinodella* (63x)

Referentni izolat K17 je pri svetlosnom režimu 12/12h i temperaturi od 15°C, formirao statistički najveće hlamidospore na WA, odnosno na OAT hranljivoj podlozi na 25°C. Kod ovog izolata na temperaturi od 20°C, nisu uočene statistički značajne razlike u veličini hlamidospora ni na jednoj od ispitivanih podloga. U tami, na 15°C, izolat K17 je obrazovao statistički najveće hlamidospore na PDA i Yeast hranljivim podlogama. Nasuprot njima, pri

temperaturnim režimima od 20°C i 25°C, ovaj izolat je formirao statistički najveće hlamidospore na WA hranljivoj podlozi, odnosno statistički najmanje hlamidospore na V8 hranljivoj podlozi (Tabela 25).

Izolat K63 je na svim hranljivim podlogama pod svim svetlosno-temperaturnim režimima formirao statistički najveće hlamidospore na WA hranljivoj podlozi (Tabela xx).

Izolat K388 je takođe formirao statistički najveće hlamidospore na WA hranljivoj podlozi pri svetlosnom režimu 12h/12h, na 15°C i 25°C, dok je na temperaturi od 20°C, najveći porast hlamidospora uočen na PDA hranljivoj podlozi. U uslovima tame, na 15°C, najveće hlamidospore je formirao na PDA hranljivoj podlozi. Na 20°C u tami statistički najveće hlamidospore su obrazovane na PDA i WA hranljivim podlogama, dok su na 25°C osim na ovim podlogama najveće hlamidospore formirane i na V8 hranljivoj podlozi (Tabela 25).

Izolat K60 je takođe formirao statistički najveće hlamidospore na WA hranljivoj podlozi pod različitim svetlosno-temperaturnim režimom (Tabela 25).

Tabela 25. Prosečna veličina hlamidospora izolata *D. pinodella* u različitim uslovima gajenja

Svetlosni režim	12/12h svetlo-tama				24h tama			
Izolat	K63	K388	K60	K17	K63	K388	K60	K17
	15°C				15°C			
Conn's	10,7 ^b	-	9,9 ^c	7,1 ^d	-	10,8 ^{cd}	9,6 ^c	9,4 ^b
OAT	11,4 ^b	11,4 ^c	11,7 ^b	10,6 ^{bc}	14,5 ^{bc}	12,5 ^c	11,7 ^b	9,2 ^b
PDA	10,7 ^b	11,8 ^c	11,6 ^b	11,2 ^b	12,9 ^c	19,2 ^a	10,9 ^{bc}	10,5 ^a
WA	15,7 ^a	15,9 ^a	17,4 ^a	14,1 ^a	17,8 ^a	15,6 ^b	15,7 ^a	9,6 ^{ab}
Yeast	11,1 ^b	13,9 ^b	11,7 ^b	10,3 ^{bc}	16,2 ^{ab}	11,8 ^c	16,3 ^a	10,5 ^a
V8	-	-	12,6 ^b	9,6 ^c	-	9,0 ^d	-	8,9 ^b
	20°C				20°C			
Conn's	11,4 ^{cd}	11,0 ^b	10,5 ^{cd}	11,7 ^a	-	12,4 ^b	15,1 ^a	9,5 ^d
OAT	12,9 ^{bc}	11,8 ^b	11,9 ^b	11,3 ^a	10,6 ^c	10,6 ^c	13,3 ^b	12,3 ^b
PDA	13,1 ^b	14,0 ^a	9,8 ^d	10,4 ^a	11,0 ^c	14,3 ^a	12,1 ^b	10,5 ^{cd}
WA	16,4 ^a	12,6 ^{ab}	15,6 ^a	10,6 ^a	17,9 ^a	13,9 ^a	16,1 ^a	14,0 ^a
Yeast	11,0 ^d	12,2 ^b	11,0 ^{bc}	11,1 ^a	14,2 ^b	11,2 ^{bc}	11,7 ^b	11,7 ^{bc}
V8	-	-	-	10,8 ^a	13,0 ^b	-	-	7,5 ^e
	25°C				25°C			
Conn's	10,2 ^d	10,2 ^b	11,4 ^b	9,4 ^{bc}	14,0 ^b	10,2 ^b	11,4 ^c	9,9 ^{cd}
OAT	11,1 ^{cd}	10,6 ^b	-	10,5 ^a	10,0 ^d	10,1 ^b	15,3 ^b	10,9 ^{bc}
PDA	14,4 ^b	10,9 ^b	11,6 ^b	8,9 ^c	12,6 ^{bc}	13,1 ^a	11,2 ^c	10,8 ^{bc}
WA	16,6 ^a	14,6 ^a	19,0 ^a	8,9 ^c	15,5 ^a	14,3 ^a	19,1 ^a	12,2 ^a
Yeast	11,6 ^c	10,6 ^b	11,6 ^b	10,0 ^{ab}	12,0 ^c	9,8 ^b	10,7 ^c	11,5 ^{ab}
V8	-	10,6 ^b	-	9,5 ^{bc}	-	13,0 ^a	-	8,9 ^d

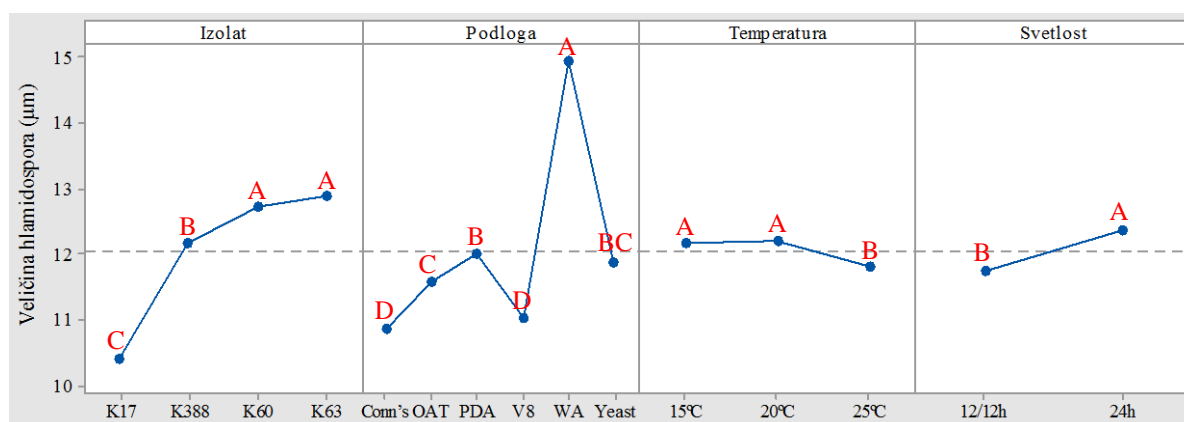
Uticaj svetlosti, temperature i hranljivih podloga na prosečnu veličinu hlamidospora izolata

Ispitivanjem uticaja pojedinačnih faktora na prosečnu veličinu hlamidospora, uočeno je da je referentni izolat K17 obrazovao statistički najmanje hlamidospore (10,4 μm), dok su statistički najveće hlamidospore obrazovali izolati K63 (12,9 μm) i K60 (12,7 μm) (Grafikon 15).

Ispitivanjem uticaja hranljivih podloga na prosečnu veličinu hlamidospora izolata *D. pinodella* je pokazalo da su najveće hlamidospore formirane na WA (14,9 μm), odnosno najmanje na V8 (11,0 μm) i Conn's (10,9 μm) hranljivim podlogama (Grafikon 15).

Statistički najveće hlamidospore izolata *D. pinodella* su obrazovane na temperaturama od 15°C (12,1 μm), i 20°C (12,2 μm) (Grafikon 15).

Ispitivanjem uticaja svetlosnog režima, uočeno je da su testirani izolati formirali prosečno veće hlamidospore pri režimu od 24h tame (Grafikon 15).



Grafikon 15. Uticaj svetlosti, temperature i hranljivih podloga na prosečnu veličinu hlamidospora izolata *D. pinodella*

6.13.4. Morfologija sklerocija

Formirane sklerocije su bile nepravilnog oblika, crne boje (Slika 36), veličine od 0,3 do 2,5 mm. Nakon 20. dana, ni jedan od ispitivanih izolata *D. pinodella*, gajenih pod različitim svetlosno-temperaturnim režimima nije formirao sklerocije na WA, Yeast i V8 podlogama.

Pri oba svetlosna režima, na temperaturi od 15°C, svi testirane izolati, osim izolata K60 su slabo formirali sklerocije na Conn's i OAT hranljivim podlogama. Takođe je uočeno da je pri oba svetlosna režima, jedino izolat K388 slabo formirao sklerocije na PDA hranljivoj podlozi (Tabela 26 i Slika 35).

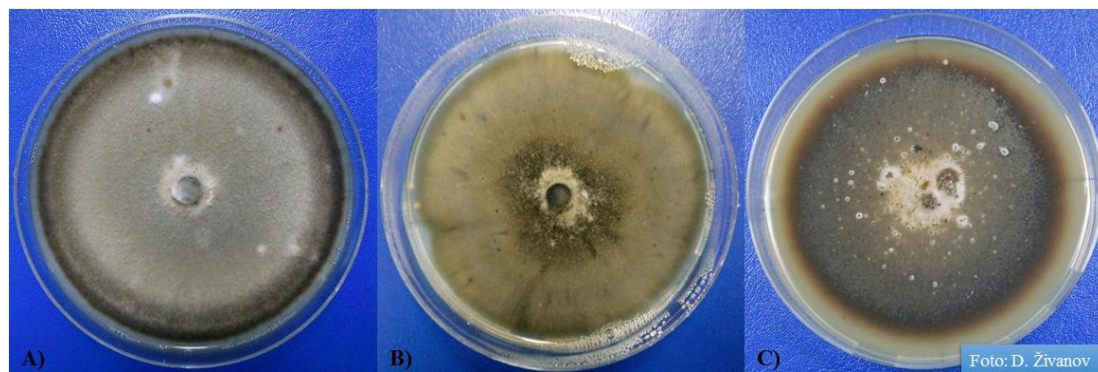
Pri oba svetlosna režima, na temperaturi od 20°C, svi testirani izolati, osim referentnog izolata K17 u tami, su obilato formirali sklerocije na Conn's hranljivoj podlozi. Pored napred navedene podloge, izolat K63 je obilato obrazovao sklerocije i na OAT hranljivoj podlozi. Takođe je uočeno da su svi testirani izolati, osim referentnog izolata K17, slabo formirali sklerocije na OAT i PDA hranljivim podlogama (Tabela 26 i Slika 35).

Pri oba svetlosna režima na temperaturi od 25°C, svi testirani izolati su obilato formirali sklerocije na Conn's, kao i izolati K63 i K388 na OAT hranljivoj podlozi. Pri istim odgajivačkim uslovima uočeno je slabo obrazovanje sklerocija kod referentnog izolata K17 (OAT), kao i kod izolata K63, K388 i K17 na PDA hranljivoj podlozi. Jedino izolat K60 nije formirao sklerocije na OAT i PDA hranljivim podlogama (Tabela 26 i Slika 35).

Tabela 26. Formiranje sklerocija izolata *D. pinodella* u različitim uslovima gajenja

Svetlosni režim	12/12h svetlo-tama				24h tama			
Izolat	K63	K388	K60	K17	K63	K388	K60	K17
	15°C				15°C			
Conn's	+	+	-	+	+	+	-	+
OAT	+	+	-	+	+	+	-	+
PDA	-	+	-	-	-	+	-	-
	20°C				20°C			
Conn's	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
OAT	+++	+	+	++	+++	+	+	+
PDA	+	+	+	+	+	+	+	+
	25°C				25°C			
Conn's	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
OAT	+++	+++	-	+	+++	+++	-	+
PDA	+	+	-	+	+	+	-	+

*slabo formira +; srednje formira ++; obilato formira +++; ne formira -



Slika 35. Formiranje sklerocija gljive *D. pinodella* u hranljivoj podlozi: A) Slabo; B) Srednje; C) Obilato



Slika 36. Izgled sklerocija gljive *D. pinodella* u Conn's hranljivoj podlozi pod uvećanjem:
A) 3,2x; B) 5x

6.14. Mikroskopske morfološke karakteristike izolata vrste *Ascochyta pisi*

Nakon dvadesetog dana, većina testiranih izolati *A. pisi* je dobro sporulisala pod različitim svetlosno-temperaturnim režimom na Conn's, OAT, PDA i V8 hranljivim podlogama, dok je sporulacija u potpunosti izostala kod svih testiranih izolata na WA i Yeast (osim kod referentnog izolata K6 i izolat K502 pri režimu svetlosti 24h tama, na temperaturi od 15°C) hranljivim podlogama (Tabela 27).

Referentni izolat K6 nije sporulisao na 15°C, pri oba testirana svetlosna režima na OAT hranljivoj podlozi, kao ni na Conn's hranljivoj podlozi u tami. Izolati K22 i K502 pri oba svetlosna režima nisu sporulisali na Conn's hranljivoj podlozi na 15°C, i Conn's i V8 podlogama na 25°C. Dodatno, izolat K502 nije sporulisao ni na OAT hranljivoj podlozi na 15°C

pri režimu 12/12h svetlo-tama. Kod izolata K21, sporulacija je izostala na 25 °C pri svetlosnom režimu 12/12h svetlo-tama na Conn's i V8 hranljivim podlogama (Tabela 27).

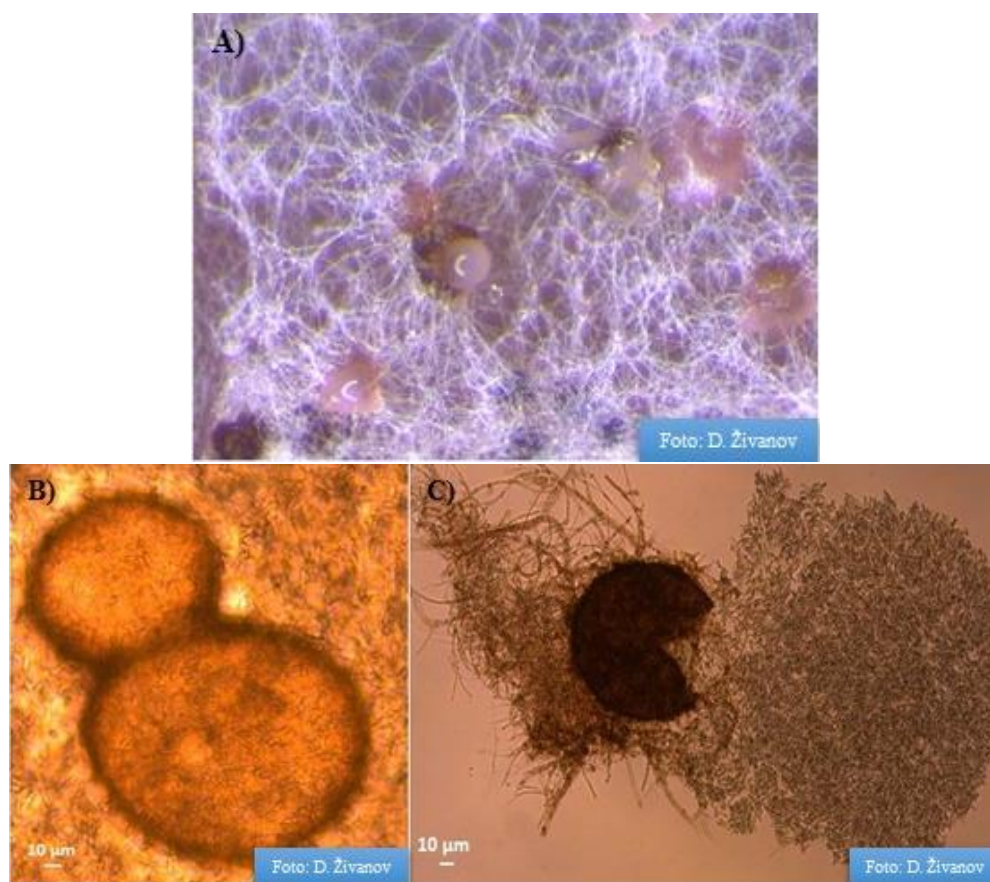
Tabela 27. Sporulacija izolata *A. pisi* u različitim uslovima gajenja

Svetlosni režim	12/12h svetlo-tama					24h tama				
Izolat	K505	K21	K22	K502	K6	K505	K21	K22	K502	K6
15°C						15°C				
Conn's	+/-	+/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-	-/-	-/-	-/-
OAT	+/-	+/-	+/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-/-
PDA	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
WA	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Yeast	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+	-/+
V8	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
20°C						20°C				
Conn's	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
OAT	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
PDA	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
WA	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Yeast	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
V8	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
25°C						25°C				
Conn's	+/-	- / -	- / -	- / -	+/-	+/-	+/-	-/-	-/-	+/-
OAT	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
PDA	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
WA	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Yeast	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
V8	+/-	+/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-	-/-	-/-	+/-

* piknospore / hlamidospore + formirane, - nisu formirane

6.14.1 Morfologija piknida i piknospora

Na hranljivim podlogama, izolati *A. pisi* su obrazovali ovalne piknide, od žuto narandžaste do tamno braon boje, vidljive golim okom (Slika 37B), veličine 70-240 μm. Pritiskom na piknide oslobađala se sluzava masa svetlo roze boje ispunjena piknosporama (Slika 37A i 37C).



Slika 37. Piknidi i piknospore *A. pisi*: A) oslobađanje piknidospora (3,2 x); B) Izgled piknida u PDA podlozi (10x); C) oslobađanje piknospora (10x)

Piknospore su hijalne, prave ili blago povijene, izduženog eliptičnog oblika. Uglavnom imaju jednu, a ređe dve ili tri septe (Slika 38B i 38C), na kojima su blago ulegnute. Na suprotnim krajevima konidija nalaze se pojedinačne uljane kapljice (Slika 38A.) U zavisnosti od uslova gajenja, prosečna veličina piknospora se kretala od 8,5-13,8 x 2,9-4,4 µm. Prosečna veličina piknospora sa tri septe je iznosila 17,36 x 3,22 µm, a sa dve 11,72 x 3,21 µm.



Slika 38. Piknospore *A. pisi*. A) piknospore sa uljanim kapima (63x); B) piknospore izolata K21 na Conn's hranljivoj podlozi (63x): a) 1-septa, b) 2-septe, c) 3-septe; C) referentni izolat K6 - piknospora sa 3 septe na PDA hranljivoj podlozi (63x)

Prosečne dimenzije piknospora - a) dužina

Kod referentnog izolata K6, na oba svetlosna režima, pri temperaturi od 15°C, nisu uočene statistički značajne razlike u dužini obrazovanih piknospora ni na jednoj od ispitivanih hranljivih podloga. Pri režimu svetlosti 12/12h svetlo-tama, na 20°C statistički najduže piknospore su se formirale na Conn's i PDA, odnosno na Conn's i OAT hranljivim podlogama na 25°C. U tami, na 20°C i 25°C, statistički najduže piknospore su obrazovane na OAT hranljivoj podlozi.

Izolat K505 je pri svetlosnom režimu 12h/12h, i temperaturi od 15°C, formirao statistički najduže piknospore na Conn's hranljivoj podlozi (Tabela 28). Takođe, pri 12/12h svetlosnom režimu, isti izolat je na 20°C i 25°C obrazovao statistički najduže piknospore na OAT, odnosno na PDA hranljivim podlogama. U tami, na 15°C nisu uočene statistički značajne razlike u dužini piknospora na ispitivanim hranljivim podlogama. Na 20°C i 25°C, u tami, statistički najveću dužinu su imale piknospore formirane na Conn's hranljivoj podlozi.

Izolat K21, je pri režimu svetlosti 12/12h svetlo-tama i 15°C, obrazovao statistički najduže piknospore na Conn's i PDA hranljivim podlogama, dok je na 20°C statistički najduže piknospore formirao na PDA hranljivoj podlozi (Tabela 28). Na temperaturi od 25°C nije bilo statistički značajnijih razlika u odnosu na dužinu formiranih piknospora na različitim hranljivim podlogama. U tami na 15°C, izolat K21 je obrazovao statistički najduže piknospore na Conn's, odnosno na V8 hranljivoj podlozi na 20°C. Takođe, u tami na 25°C, izolat K21 je formirao statistički najduže piknospore na Conn's i OAT hranljivim podlogama (Tabela 28).

Pri režimu svetlosti 12/12h svetlo-tama, izolat K22 je obrazovao statistički najduže piknospore na V8 (15°C), Conn's (20°C) i PDA (25°C) hranljivim podlogama (Tabela 28). U tami, na 15°C i 25°C, nisu uočene značajne razlike u dužini piknospora, dok su se na 20°C formirale statistički najduže piknospore na OAT i V8 hranljivim podlogama.

Kod izolata K502, na oba svetlosna režima i pri temperaturama od 15°C i 25°C, nisu uočene statistički značajne razlike u dužini formiranih piknospora (Tabela 28). Međutim, na temperaturi od 20°C pri oba svetlosna režima, izdvojila se V8 hranljiva podloga na kojoj su formirane najkraće piknospore.

Tabela 28. Prosečna dužina piknospora izolata *A. pisi* u različitim uslovima gajenja

Svetlosni režim	12/12h svetlo-tama					24h tama				
	Izolat	K505	K21	K22	K502	K6	K505	K21	K22	K502
	15°C					15°C				
Conn's	13,5 ^a	13,4 ^a	-	-	11,9 ^a	12,5 ^a	13,8 ^a	-	-	-
OAT	12,2 ^b	11,9 ^b	13,0 ^{ab}	-	-	12,0 ^a	12,7 ^b	12,3 ^a	12,3 ^a	-
PDA	11,1 ^c	12,7 ^a	12,6 ^b	11,3 ^a	11,8 ^a	12,9 ^a	12,5 ^b	12,6 ^a	11,5 ^a	11,2 ^a
V8	11,3 ^{bc}	11,2 ^b	13,3 ^a	11,6 ^a	11,2 ^a	12,1 ^a	12,6 ^b	13,1 ^a	12,0 ^a	11,7 ^a
	20°C					20°C				
Conn's	10,3 ^c	11,3 ^c	13,5 ^a	11,9 ^a	12,3 ^a	12,6 ^a	12,4 ^b	11,2 ^b	12,0 ^b	11,8 ^{ab}
OAT	11,8 ^a	12,8 ^{ab}	12,7 ^b	12,4 ^a	11,5 ^b	11,2 ^b	12,7 ^{ab}	12,4 ^a	13,1 ^a	12,0 ^a
PDA	11,7 ^{ab}	13,3 ^a	10,8 ^c	12,0 ^a	12,8 ^a	11,1 ^b	12,6 ^b	11,3 ^b	12,1 ^b	11,0 ^b
V8	10,9 ^{bc}	12,1 ^{bc}	11,2 ^c	10,8 ^b	11,3 ^b	11,6 ^b	13,7 ^a	12,4 ^a	11,8 ^c	11,4 ^{ab}
	25°C					25°C				
Conn's	9,3 ^a	-	-	-	12,0 ^a	11,5 ^a	11,7 ^a	-	-	10,6 ^c
OAT	8,5 ^b	3,2 ^a	-	11,3 ^a	11,7 ^a	10,7 ^{ab}	11,5 ^a	11,6 ^a	11,3 ^a	13,2 ^a
PDA	9,4 ^a	3,2 ^a	12,2 ^a	10,7 ^a	10,8 ^b	10,1 ^b	11,2 ^{ab}	12,2 ^a	10,8 ^a	11,8 ^b
V8	8,6 ^b	3,4 ^a	10,6 ^b	-	10,7 ^b	10,2 ^b	10,3 ^b	-	-	11,8 ^b

Prosečne dimenzije piknospora - b) širina

Referentni izolat K6 je na 15°C i 20°C u režimu 12/12h svetlo-tama, formirao statistički najšire piknospore na PDA, odnosno na V8 hranljivoj podlozi na 25°C. U tami, na temperaturi od 15°C nisu uočene statistički značajne razlike u širini formiranih piknospora. Na 20°C u tami, izmerene su najšire piknospore na OAT i PDA hranljivim podlogama, kao i na V8 hranljivoj podlozi na 25°C.

Izolat K505 je na 15°C i 20°C u režimu 12/12h svetlo-tama, formirao statistički najšire piknospore na OAT i PDA hranljivim podlogama, dok na temperaturi od 25°C, nisu uočene statistički značajne razlike u širini piknospora na ispitivanim hranljivim podlogama (Tabela 29). Isti izolat, u uslovima tame na 15°C i 25°C, je obrazovao statistički najuže piknospore na PDA hranljivoj podlozi, dok na temperaturi od 20°C nisu uočene statistički značajne razlike u širini piknospora.

Izolat K21 je na temperaturi od 15°C, u oba svetlosna režima, formirao statistički najšire piknospore na PDA hranljivoj podlozi. Isti izolat je na 20°C i 25°C u uslovima tame formirao statistički najšire piknospore na OAT i PDA hranljivim podlogama, dok u režimu 12/12h svetlo-tama, na ovim temperaturama nisu uočene statistički značajne razlike u širini formiranih piknospora (Tabela 29).

Izolat K22 je u oba svetlosna režima na temperaturama od 15°C i 25°C, formirao statistički najšire piknospore na PDA hranljivim podlogama (Tabela 29). Na 20°C, najšire piknospore izolat K22 je formirao na Conn's podlozi u 12/12h svetlosnom režimu, odnosno na PDA i V8 podlogama u tami.

Kod izolata K502, na 15°C, pri režimu svetlosti 12/12h svetlo-tama, nisu uočene statistički značajne razlike u širini piknospora na ispitivanim hranljivim podlogama, dok su u uslovima tame, statistički najšire piknospore formirane na OAT i PDA hranljivoj podlozi (Tabela 29). Na temperaturi od 20°C, pri oba svetlosna režima, ovaj izolat je formirao statistički najšire piknospore na Conn's i OAT hranljivim podlogama. Pri temperaturi od 25°C, statistički najšire piknospore su obrazovane na PDA hranljivoj podlozi u 12/12h svetlosnom režimu, odnosno OAT podlozi u tami.

Tabela 29. Prosečna širina piknospora izolata *A. pisi* u različitim uslovima gajenja

Svetlosni režim	12/12h svetlo-tama					24h tama				
	Izolot	K505	K21	K22	K502	K6	K505	K21	K22	K502
	15°C					15°C				
Conn's	3,6 ^b	4,2 ^{ab}	-	-	3,1 ^b	3,9 ^a	3,8 ^{ab}	-	-	-
OAT	3,8 ^a	4,1 ^b	3,8 ^b	-	-	3,7 ^a	3,6 ^b	4,1 ^a	4,0 ^a	-
PDA	3,8 ^a	4,4 ^a	4,2 ^a	3,8 ^a	3,5 ^a	3,4 ^b	4,1 ^a	3,8 ^b	3,9 ^a	3,4 ^a
V8	3,7 ^{ab}	3,7 ^c	4,1 ^a	3,9 ^a	3,2 ^b	3,8 ^a	3,6 ^b	4,3 ^a	3,5 ^b	3,3 ^a
	20°C					20°C				
Conn's	3,7 ^b	3,9 ^a	4,3 ^a	4,2 ^a	3,8 ^b	3,8 ^a	3,2 ^c	3,8 ^b	3,8 ^a	2,9 ^b
OAT	4,0 ^a	3,9 ^a	4,2 ^a	4,2 ^a	3,2 ^c	3,8 ^a	3,8 ^{ab}	3,7 ^c	3,8 ^a	3,2 ^a
PDA	4,0 ^a	3,9 ^a	4,1 ^a	3,8 ^b	4,3 ^a	3,7 ^a	4,0 ^a	4,0 ^a	3,5 ^b	3,3 ^a
V8	3,7 ^b	4,0 ^a	3,7 ^b	3,9 ^{ab}	3,4 ^c	3,9 ^a	3,7 ^b	4,0 ^a	3,3 ^b	2,9 ^b
	25°C					25°C				
Conn's	3,0 ^a	-	-	-	3,0 ^c	3,6 ^a	3,0 ^b	-	-	3,2 ^b
OAT	3,2 ^a	3,2 ^a	3,6 ^b	3,5 ^b	3,3 ^{ab}	3,8 ^a	3,6 ^a	3,8 ^b	3,8 ^a	3,7 ^a
PDA	3,2 ^a	3,2 ^a	4,2 ^a	4,1 ^a	3,2 ^{bc}	2,9 ^b	3,7 ^a	4,3 ^a	3,5 ^b	3,5 ^a
V8	3,3 ^a	3,4 ^a	-	-	3,5 ^a	3,8 ^a	3,3 ^b	-	-	3,6 ^a

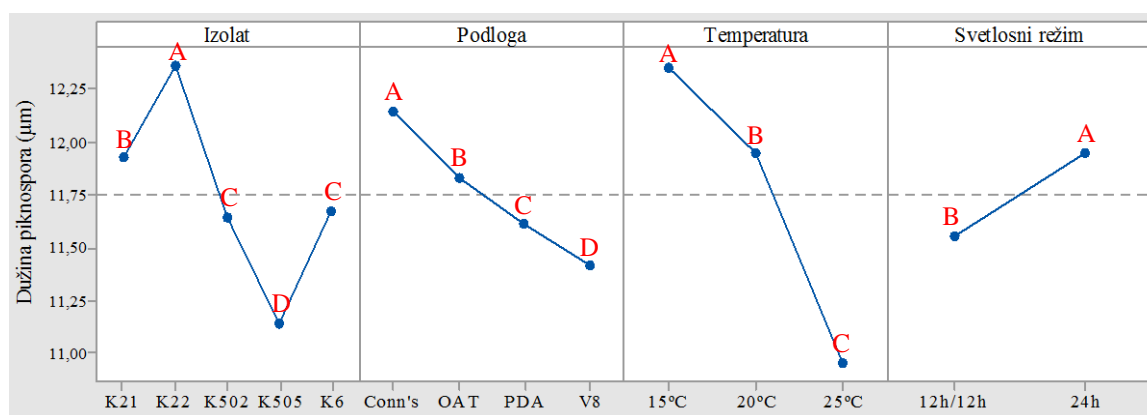
Uticaj svetlosti, temperature i hranljivih podloga na prosečnu dužinu i širinu piknospora

Od svih ispitivanih izolata *A. pisi*, izolat K22 je obrazovao piknospore sa najvećom prosečnom dužinom (12,4 μm), dok je izolat K505 formirao piknospore sa najmanjom prosečnom dužinom (11,1 μm) (Grafikon 16).

Ispitivanje uticaja hranljivih podloga na prosečnu dužinu piknospora *A. pisi* pokazalo je da je hranljiva podloga Conn's (12,1 μm) najpovoljnije uticala za prosečnu dužinu piknospora. Nasuprot njoj, hranljiva podloga V8 (11,4 μm) je najnepovoljnije uticala na prosečnu dužinu piknospora (Grafikon 16).

Statistički najveća prosečna dužina piknospora izolata *A. pisi* je ostvarena na temperaturi od 15°C (12,4 μm), dok je temperatura od 25°C najnepovoljnije uticala na dužinu piknospora (Grafikon 16).

Ispitivanjem uticaja svetlosnog režima, uočeno je da su izolati gajeni u tami imali statistički veću prosečnu dužinu piknospora (11,9 μm) (Grafikon 16).



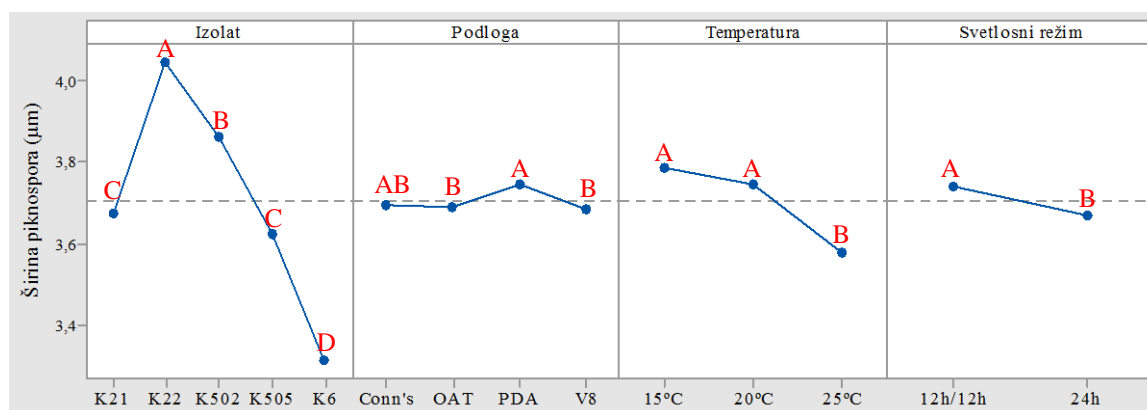
Grafikon 16. Uticaj svetlosti, temperature i hranljivih podloga na prosečnu dužinu piknospora izolata *A. pisi*

Od svih ispitivanih izolata *A. pisi*, izolat K22 je obrazovao piknospore sa najvećom prosečnom širinom (4,0 µm), a izolat K6 piknospore sa najmanjom prosečnom širinom (3,3 µm) (Grafikon 17).

Ispitivanjem uticaja hranljivih podloga na prosečnu širinu piknospora *A. pisi*, uočeno je da je PDA hranljiva podloga najpovoljnije uticala na prosečnu širinu piknospora (Grafikon 17). Nasuprot ovome, na hranljivim podlogama OAT i V8 je ostvarena statistički najmanja prosečna širina piknospora ispitivanih izolata *A. pisi*.

Statistički najveća prosečna širina piknospora izolata *A. pisi* od 3,8 µm je ostvarena pri temperaturama od 15°C i 20°C (Grafikon 17).

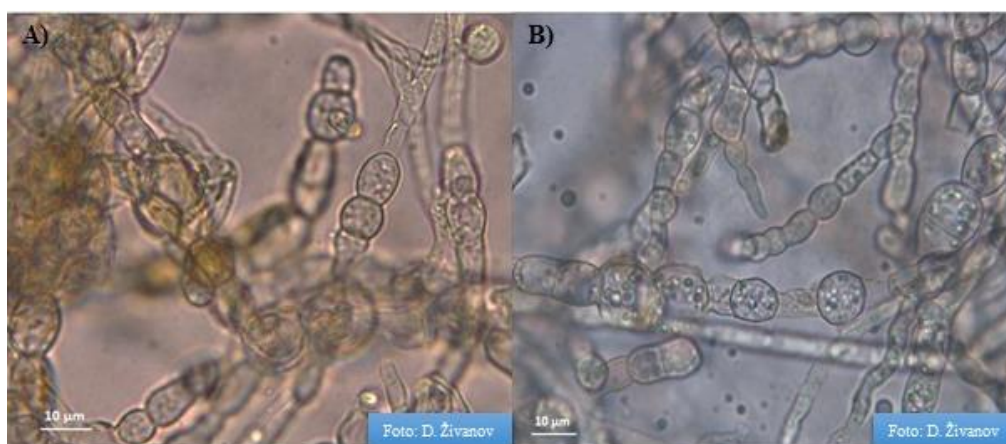
Ispitivanjem uticaja svetlosnog režima, uočeno je da su izolati imali statistički veću prosečnu širinu piknospora pri svetlosnom režimu 12/12h svetlo-tama (Grafikon 17).



Grafikon 17. Uticaj svetlosti, temperature i hranljivih podloga na prosečnu širinu piknospora izolata *A. pisi*

6.14.2. Morfologija i dimenzije hlamidospora

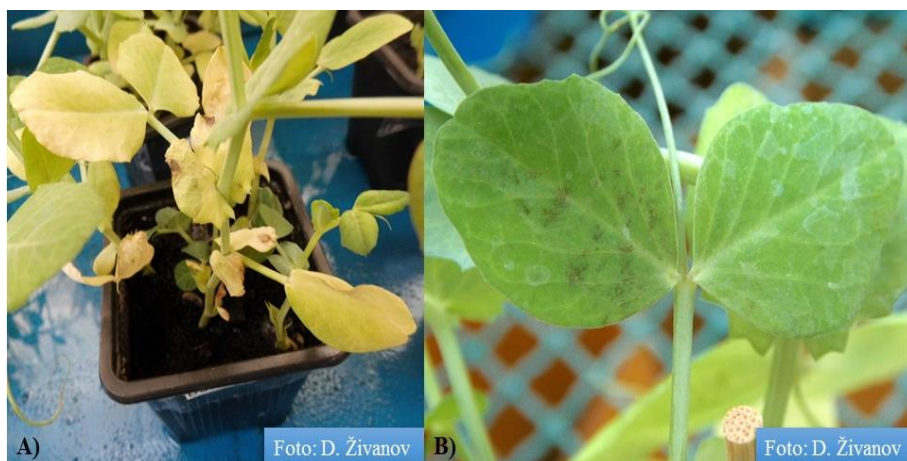
Referentni izolat K6 i izolat K502 su obrazovali hlamidospore u tama na temperaturi od 15°C (Slika 39). Hlamidospore navedenih izolata su se formirale pojedinačno ili u manjim nizovima (2-3), okruglog do jajastog oblika, prozirne boje. Prosečna veličina hlamidospora je iznosila 9,4 µm kod referentnog izolata K6, i 11,1 µm kod izolata K502.



Slika 39. Izgled hlamidospora gljive *A. pisi*: A) izolat K6; B) izolat K502, na Yeast hranljivoj podlozi (63x)

6.15. Patogenost izolata *Ascochyta* spp. na različitim genotipovima stočnog graška

Prvi simptomi pegavosti na listovima izazvani izolatima K517 (Dukat, NS Junior) (Slika 40A i 40B) i AP (Kosmaj, Junior, NS Mraz) (Slika 41A i 41B) su se pojavili 4. dana nakon inokulacije, dok su se simptomi izazvani ostalim izolatima javili 8. dana nakon inokulacija na svim ispitivanim genotipovima stočnog graška (Slika 42 i 43). Pored karakterističnih simptoma pegavosti na inokulisanim listovima stočnog graška, izolati K63 (Slika 44B i 46B), K528 (Slika 46A) i K388 (Slika 46C), suspenzija grupa izolata MIX (Slika 44D), i suspenzija izolata DP (Slika 45B), su prouzrokovali i nekrozu u prizemnom delu stabla biljaka, kao i njihovo uvenuće nakon 14. dana.



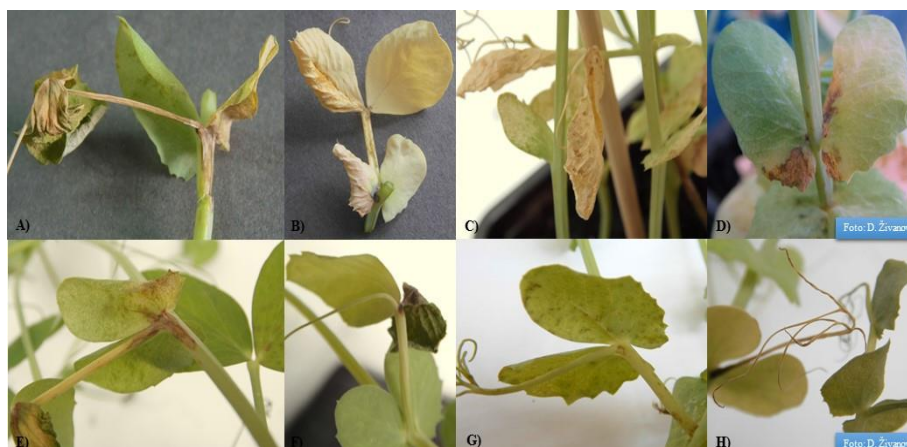
Slika 40. Početni simptomi na listovima stočnog graška inokulisani izolatom K517 (*D. pinodes*) na sortama: A) Dukat; B) NS Junior



Slika 41. Početni simptomi na biljkama stočnog graška inokuliranim suspenzijom izolata AP (*A. pisi*) na sortama: A - B) Kosmaj; C) NS Junior; D) NS Mraz



Slika 42. Biljke graška inokulisane mešavinom suspenzija grupa izolata MIX (AP+ MP+ PMP) nakon 14. dana, na sortama: A) Dukat; B) NS Mraz; C) NS Junior; D) Partner; E) Zlatar; F) Kosmaj



Slika 43. Simptomi pegavosti na listovima i viticama na različitim sortama stočnog graška nakon 14. dana od inokulacije, izolatima: *D. pinodes*: A) izolat K528 (Zlatar); B) izolat K517 (Kosmaj); C) izolat K18 (NS Mraz); *D. pinodella*: D) izolat K63 (Dukat); E) izolat K17 (Dukat); *A. pisi*: F) izolat K505 (Dukat), G) izolat K22 (NS Mraz); H) izolat K6 (Partner)



Slika 44. Simptomi na listovima i viticama na različitim sortama stočnog graška, nakon 14. dana od inokulacije izolatima: *D. pinodes*: A) izolat K528 (Partner i Dukat); *D. pinodella*: B) izolat K63 (Dukat); C) *A. pisi*: K22 (Dukat i Partner); D) mešavinom suspenzija grupa izolata MIX (Kosmaj)



Slika 45. Simptomi na listovima i prizemnom delu stabla različitim sortama stočnog graška, nakon 14. dana od inokulacije pojedinačnim izolatom i suspenzijom izolata: *D. pinodes*: A) Izolat K514 (Kosmaj); B) DP (Dukat)



Slika 46. Simptomi na prizemnom delu stabla na različitim sortama stočnog graška, nakon 14. dana od inokulacije izolatima: *D. pinodes*: A) izolat K528 (Kosmaj); *D. pinodella*: B) izolat K63 (NS Junior), C) izolat K388 (Dukat)

Za poređenje reakcije između testiranih genotipova stočnog graška prema testiranim izolatima izračunata je prosečna AUDPC vrednost (eng. Area Under Disease Protection Curve). Na taj način je takođe dobijen još jedan pokazatelj koji ukazuje na patogenost ispitivanih izolata.

6.15.1. Patogenost izolata vrste *Didymella pinodes*

Analizom varijanse utvrđene su statistički značajne razlike između svih ispitivanih genotipova graška i testiranih izolata *D. pinodes* (Tabela 30).

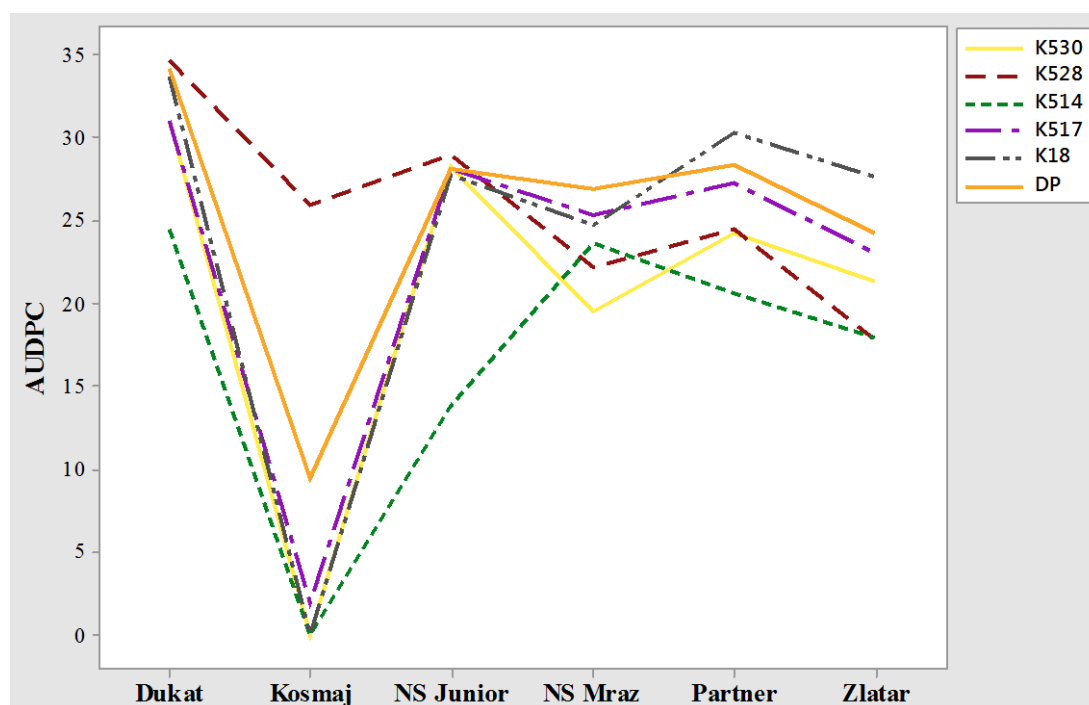
Tabela 30. Analiza varijanse ispitivanih genotipova graška u zavisnosti od ispitivanih izolata *D. pinodes*

	Faktori variranja	DF	SS	MS	F	P
K530	Genotip	5	36338	7267,65	366,16	0,000**
	Greška	354	7026	19,85		
K528	Genotip	5	10014	2002,73	98,23	0,000**
	Greška	354	7218	20,39		
K514	Genotip	5	24645	4928,94	265,82	0,000**
	Greška	354	6564	18,54		
K517	Genotip	5	33387	6677,36	297,16	0,000**
	Greška	354	7955	22,47		
K18	Genotip	5	44230	8846,04	528,76	0,000**
	Greška	354	5922	16,73		
DP	Genotip	5	21194	4238,77	166,16	0,000**
	Greška	354	9031	25,51		

*Statistički značajna razlika ($p < 0,05$); **Statistički visoko značajna razlika ($p < 0,01$)

Na osnovu AUDPC vrednosti uočene su značajne razlike u osetljivosti ispitivanih genotipova stočnog graška prema patogenu *D. pinodes*. Takođe, uočena je i velika varijabilnost između patogenosti izolata *D. pinodes* prema sortama graška. Najveća prosečna AUDPC vrednost je ostvarena kod sorte Dukat, što ga čini najosetljivijim prema patogenu *D. pinodes*, dok je sorta Kosmaj bila najtolerantnija prema većini testiranih izolata sa izuzetkom izolata K528 (Grafikon 18). Ostali testirani genotipovi graška su se nalazili u sličnoj grupi osetljivosti prema ispitivanim izolatima.

Izolat K528 je bio najpatogeniji za sorte Dukat, Kosmaj i NS Junior, dok je referentni izolat K18 bio najpatogeniji za sorte Partner i Zlatar. Jedino kod sorte NS Mraz je suspenzija svih izolata (DP) ispoljila najveću patogenost. Najslabiju patogenost kod svih sorti graška je ispoljio izolat K514, izuzev kod sorte NS Mraz gde je najslabiju patogenost imao izolat K530 (Grafikon 18).



Grafikon 18. Prosečne AUDPC vrednosti kod različitih genotipova stočnog graška, inokulisanim pojedinačnim izolatima kao i grupom izolata *D. pinodes*

6.15.2. Patogenost izolata vrste *Didymella pinodella*

Analizom varijanse utvrđene su statistički značajne razlike između svih ispitivanih genotipova graška i testiranih izolata *D. pinodella* (Tabela 31).

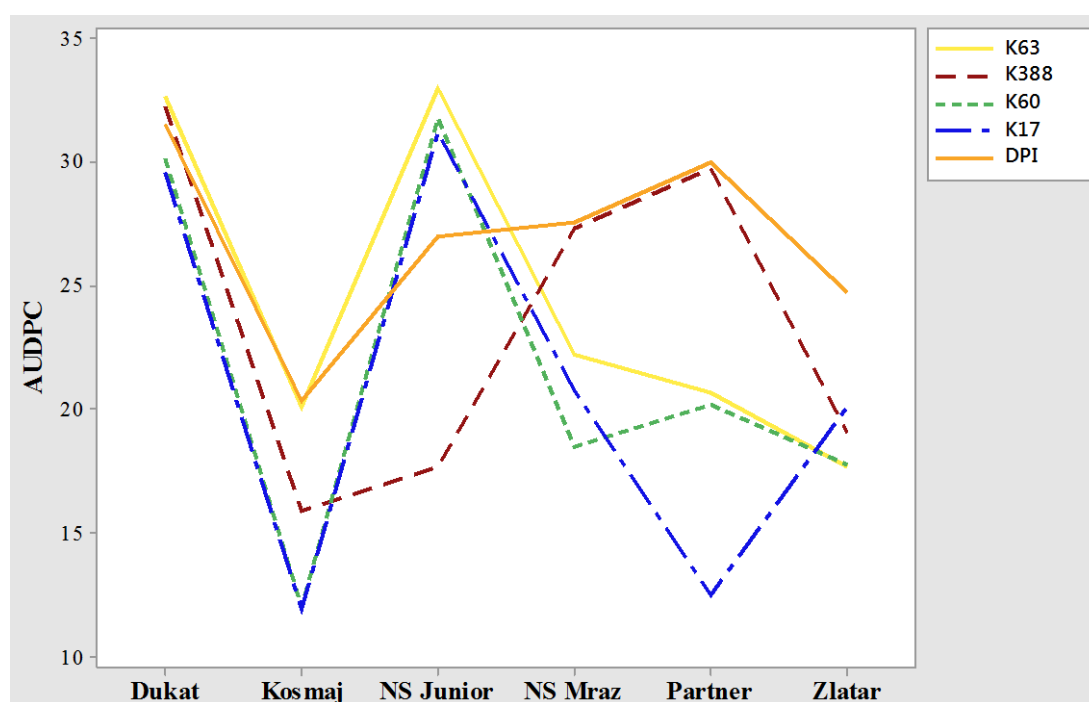
Tabela 31. Analiza varijanse ispitivanih genotipova graška u zavisnosti od ispitivanih izolata *D. pinodella*

	Faktori variranja	DF	SS	MS	F	P
K63	Genotip	5	13492	2698,45	112,65	0,000**
	Greška	354	8480	23,95		
K388	Genotip	5	14501	2900,22	139,56	0,000**
	Greška	354	7356	20,78		
K60	Genotip	5	17761	3552,19	92,01	0,000**
	Greška	354	13667	38,61		
K17	Genotip	5	19974	3994,76	119,0	0,000**
	Greška	354	11884	33,57		
DPI	Genotip	5	4712	942,49	38,03	0,000**
	Greška	354	8773	24,78		

*Statistički značajna razlika ($p < 0,05$); **Statistički visoko značajna razlika ($p < 0,01$)

Na osnovu AUDPC vrednosti uočene su značajne razlike u osetljivosti ispitivanih genotipova stočnog graška prema patogenu *D. pinodella*. Takođe, uočena je i velika varijabilnost u patogenosti između testiranih izolata *D. pinodella* prema sortama graška. Najveća prosečna AUDPC vrednost je ostvarena kod sorte Dukat, što ga čini najosetljivijim prema patogenu *D. pinodella*, dok je sorta Kosmaj bila najtolerantnija prema većini testiranih izolata, sa izuzetkom izolata K63 i suspenzije izolata (DPI) (Grafikon 19). Ostali testirani genotipovi graška su se nalazili u sličnoj grupi osetljivosti prema ispitivanim izolatima.

Izolat K63 je bio najpatogeniji za sorte Dukat i NS Junior, dok je suspenzija svih izolata (DPI) bila najpatogenija za sve ostale ispitivane sorte graška. Najslabiju patogenost je ispoljio referentni izolat K17 kod sorte Dukat, Kosmaj i Partner, odnosno izolat K388 kod sorte NS Junior i izolat K60 kod sorti NS Mraz i Zlatar. (Grafikon 19).



Grafikon 19. Prosečne AUDPC vrednosti kod različitih genotipova stočnog graška, inokulisanim pojedinačnim izolatima kao i grupom izolata *D. pinodella*

6.15.3. Patogenost izolata vrste *Ascochyta pisi*

Analizom varijanse utvrđene su statistički značajne razlike između svih ispitivanih genotipova graška i testiranih izolata *A. pisi* (Tabela 32).

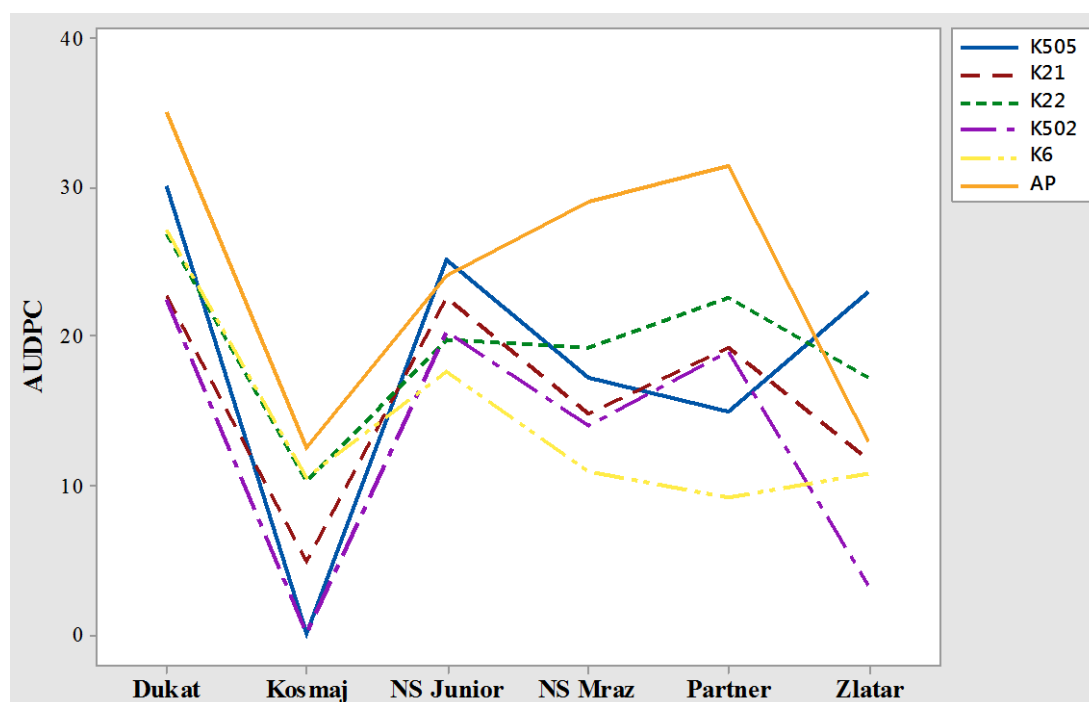
Tabela 32. Analiza varijanse ispitivanih genotipova graška u zavisnosti od ispitivanih izolata *A. pisi*

	Faktori variranja	DF	SS	MS	F	P
K505	Genotip	5	33350	6670,01	295,76	0,000**
	Greška	354	7983	22,55		
K21	Genotip	5	14692	2938,42	122,54	0,000**
	Greška	354	8489	23,98		
K22	Genotip	5	9292	1858,37	67,35	0,000**
	Greška	354	9768	27,59		
K502	Genotip	5	26641	5328,23	138,35	0,000**
	Greška	354	13633	38,51		
K6	Genotip	5	14501	2900,24	80,86	0,000**
	Greška	354	12697	35,87		
	Genotip	5	27367	5473,37	282,88	0,000**
	Greška	354	6849	19,35		

*Statistički značajna razlika ($p < 0,05$); **Statistički visoko značajna razlika ($p < 0,01$)

Na osnovu AUDPC vrednosti uočene su značajne razlike u osetljivosti ispitivanih genotipova stočnog graška prema patogenu *A. pisi*. Takođe, uočena je i velika varijabilnost u patogenosti između izolata *A. pisi* prema sortama graška. Najveća prosečna AUDPC vrednost je ostvarena kod sorte Dukat, što ovu sortu čini najosetljivijom prema patogenu *A. pisi*, dok je sorta Kosmaj bila najtolerantnija prema većini testiranih izolata sa izuzetkom AP izolata (Grafikon 20). Ostali testirani genotipovi graška su se nalazili u sličnoj grupi osetljivosti prema ispitivanim izolatima.

Suspenzija svih izolata (AP) je bila najpatogenija prema svim ispitivanim sortama stočnog graška, izuzev kod sorte NS Junior gde je najpatogeniji bio izolat K505. Najslabiju patogenost su ispoljili izolati K502 kod sorti Dukat, Kosmaj i Zlatar, i referentni izolat K6 kod sorte NS Junior, NS Mraz i Partner (Grafikon 20).



Grafikon 20. Prosečne AUDPC vrednosti kod različitih genotipova stočnog graška, inokulisanim pojedinačnim izolatima kao i grupom izolata *A. pisi*

6.15.4. Patogenost grupa izolata vrsta *Didymella pinodes*, *Didymella pinodella* i *Ascochyta pisi*

Analizom varijanse utvrđene su statistički značajne razlike između svih ispitivanih genotipova graška i testiranih suspenzija grupa izolata - *DP*, *DPI*, *AP* i *MIX* (Tabela 33).

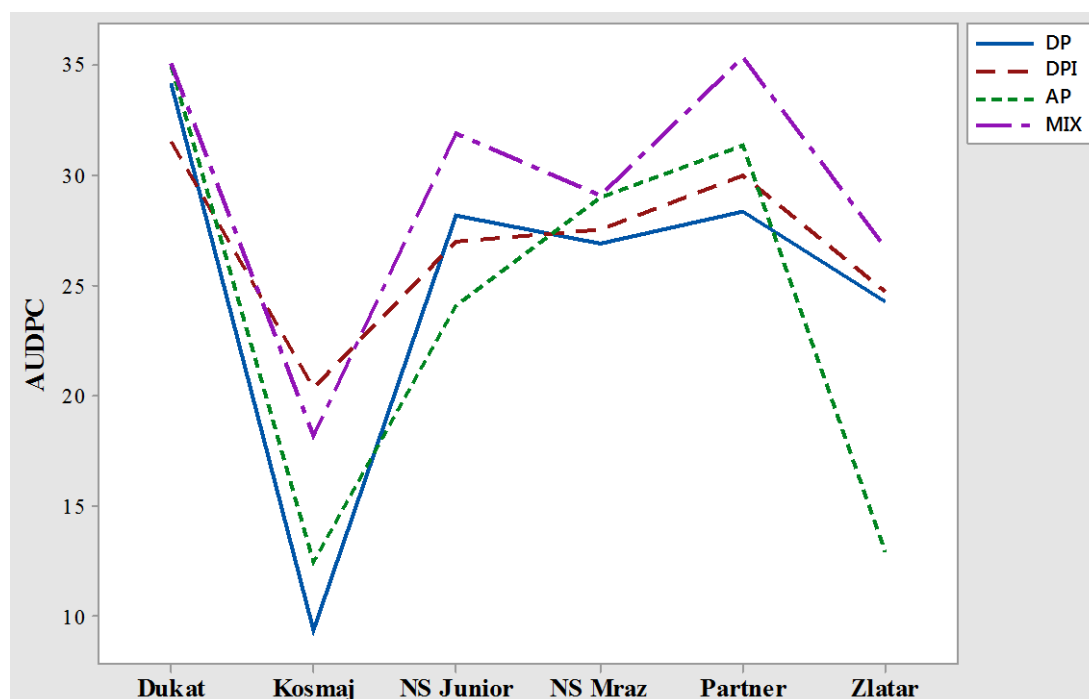
Tabela 33. Analiza varijanse ispitivanih genotipova graška u zavisnosti od ispitivanih grupa izolata *DP*, *DPI*, *AP* i *MIX*

	Faktori variranja	DF	SS	MS	F	P
DP	Genotip	5	21194	4238,77	166,16	0,000**
	Greška	354	9031	25,51		
DPI	Genotip	5	4712	942,49	38,03	0,000**
	Greška	354	8773	24,78		
AP	Genotip	5	27367	5473,37	282,88	0,000**
	Greška	354	6849	19,35		
MIX	Genotip	5	12419	2483,87	163,73	0,000**
	Greška	354	5370	15,17		

*Statistički značajna razlika ($p < 0,05$); **Statistički visoko značajna razlika ($p < 0,01$)

Na osnovu AUDPC vrednosti uočene su značajne razlike u osetljivosti ispitivanih genotipova stočnog graška prema grupi izolata *D. pinodes*, *D. pinodella*, *A. pisi*. Takođe, uočena je i velika varijabilnost patogenosti između grupa DP, DPI, AP i MIX prema sortama graška. Najveća prosečna AUDPC vrednost je ostvarena kod sorte Dukat, što je čini najosetljivijom prema napred navedenim grupama, dok je sorta Kosmaj bila najtolerantnija prema većini suspenzija sa izuzetkom DPI izolata (Grafikon 21). Ostali testirani genotipovi graška su se nalazili u sličnoj grupi osetljivosti prema testiranim suspenzijama.

Suspenzija svih izlota (MIX) je bila najpatogenija prema svim ispitivanim sortama stočnog graška, izuzev kod sorte Kosmaj gde je bila najpatogenija grupa izolata DPI. Najslabiju patogenost su ispoljile suspenzije DPI kod sorte Dukat, DP kod sorti Kosmaj, NS Mraz i Partner, i AP kod sorti NS Junior i Zlatar (Grafikon 21).



Grafikon 21. Prosečne AUDPC vrednosti kod različitih genotipova stočnog graška, inokulisanim grupama (DP, DPI, AP) i suspenzijom izolata (MIX)

7. DISKUSIJA

Simptomi bolesti

Opisani simptomi bolesti iz kojih su izolovane gljive *D. pinodes*, *D. pinodella* i *A. pisi* su u skladu sa opisima u drugim istraživanjima (Jones, 1927; Punithalingham i Holliday, 1972a, 1972b; Lawyer, 1984; Smith i sar., 1988; Jovičević i Milošević 1990; Roger i Tivoli, 1996a; Garry i sar., 1996; Kraft i Pflieger 2001; Ivanović i Ivanović, 2001; Bretag i sar., 2006; Tivoli i Banniza, 2007; Tadjia, 2012; Mijatović i sar., 2007; Turo, 2016; Sivachandrakumar, 2016). Simptomi pegavosti su se najčešće ispoljavali na listovima i stablu, a zatim na viticama, mahunama, cvetu i semenu. Vizuelnim pregledom biljaka nije bilo moguće razlikovati simptome *D. pinodes*, *D. pinodella* i *A. pisi* jedne od drugih. Najkarakterističniji simptomi *A. pisi* su se ispoljili na mahunama i semenu graška u vidu ulegnutih nekrotičnih pega tamno mrke boje. Simptomi na cvetovima prouzrokovani od strane *A. pisi* su bili slični simptomima opisanim od strane Punithalingham i Holliday (1972b). Identične simptome na cvetovima takođe prouzrokuje i gljiva *D. pinodes* (INRA, 2018).

Molekularna identifikacija

Tadjia i sar. (2009) su na osnovu PCR produkata (550 bp) amplifikacije ITS regiona *A. pinodes* i *A. pinodella*, ustanovili da ne postoji polimorfizam između navedenih vrsta, kao i da se vrsta *A. pisi* jasno izdvaja od ostale dve vrste. Navedena istraživanja su u saglasnosti sa rezultatima naših istraživanja, na osnovu dobijenih sekvenci produkata amplifikacije ITS regiona testiranih izolata, kao i da je na osnovu filogenetske analize ITS sekvenci rDNK regiona *Ascochyta* spp. moguće razdvojiti *A. pisi* od *D. pinodes* i *D. pinodella*, ali ne i poslednje dve vrste međusobno. Fatehi i sar (2003), su uspeli da razdvoje *D. pinodes* od *D. pinodella* na osnovu restrikcione digestije celokupne mitohondrijalne DNK, ali ne i digestijom ITS i dela β -tubulin sekvenci. Rezultati naših istraživanja se podudaraju sa istraživanjima u kojima je potvrđena sličnost između *D. pinodes* i *D. pinodella* (Faris-Mokaiesh i sar., 1996; Onfroy i sar., 1999; Barve i sar., 2003; Peever i sar., 2007; Aveskamp i sar., 2010; Davidson i sar., 2011; Woudenberg i sar., 2012).

Sličnost izolata *A. pisi* (K169, K1, K168 i K489) sa *D. pinodes* i *D. pinodella* se može objasniti rezultatima Santos i sar., (2010) koji ukazuju na prisustvo dve različite ITS vrste poreklom iz istog plodonosnog tela, i sugerišu da na osnovu TEF₁- α gena radi o istoj vrsti, u ovom slučaju o *A. pisi*.

Na osnovu PCR produkta amplifikacije TEF₁- α gena ispitivanih izolata *Ascochyta* spp., dobijeni su fragmenti dužine 330bp. Filogenetska analiza protein kodirajućeg gena (TEF₁- α) je pokazala da *Ascochyta* vrste formiraju klastere sa visokom bootstrap vrednošću. Izolati *D. pinodella* su se izdvojili u poseban klaster. Peever i sar. (2007) na osnovu filogenetske analize TEF₁- α gena navode da su izolati *Ascochyta* spp. izolovani sa istog domaćina, poreklom iz različitih geografskih područja grupisali i formirali stabinu granu, pri tome sugerisući da se *Ascochyta* vrste mogu smatrati filogenetskim vrstama. Takođe, u rezultatima je potvrđena i filogenetska bliskost između *D. pinodes* i *A. pisi*, sa visokim bootstrap vrednostima. Idenični rezultati su potvrđeni od strane Kövics i sar. (2014), koji navode da su se izolati *Phoma pinodella* i *P.homa sojicola* izdvojili od ostalih *Ascochyta* vrsta pri tome formirajući poseban klaster, dok su se vrste *A. pisi* i *Didymella fabae* zasebno grupisale.

Prilikom ispitivanja različitih prajmera u detekciji *Ascochyta* vrsta, utvrđeno je da IGS1 prajmeri (LR12R i MpPmpRev1), dizajnirani od strane Vilgalys (1994) i Chilvers (2009) omogućavaju pouzdanu i nedvosmislenu identifikaciju pojedinačnih vrsta *D. pinodes*, *D. pinodella* i *A. pisi*, na osnovu dužine amplikona. Amplifikacijom izolata, dobijeni su fragmenti sledećih veličina: 450-470bp (*D. pinodes*), 520-530bp (*D. pinodella*), dok su kod vrste *A. pisi* dobijena tri PCR produkta veličine: 450bp, 500bp i 530bp. Dužina dobijenih amplikona *D. pinodes* i *D. pinodella* je u saglasnosti sa dužinama koje su dobijene u istraživanju Le May i sar. (2018). Autori navode da je dužina amplikona *D. pinodes* iznosila 449bp, a kod *D. pinodella* 525bp. Prema našim saznanjima navedeni prajmerski par je po prvi put primenjen na *A. pisi*, i takođe je pokazao nedvosmislena razdvajanja kao i kod predhodnih vrsta.

Zastupljenost Ascochyta vrsta

Crna pegavost graška je kompleksno oboljenje prouzrokovano od strane tri patogena: *D. pinodes*, *D. pinodella* i *A. pisi*. Patogeni koji egzistiraju unutar navedenog kompleksa, pojavljuju se pojedinačno ili u kombinaciji prilikom izolacije iz obolelih delova biljaka (Onfroy i sar., 1999; Davidson i sar., 2009). Prema literaturnim navodima, *A. pisi* je prvi put konstatovana u našoj zemlji početkom dvadesetog veka (Jovićević i Milošević, 1990). Međutim, od tada pa sve do današnjih dana prisustvo drugih *Ascochyta* vrsta u okviru ovog kompleksnog oboljenja, kao i njihova distribucija na teritoriji Srbije nije bila poznata.

Morfološko – molekularnim analizama sakupljenih izolata sa različitih lokaliteta, prvi put je potvrđeno prisustvo *D. pinodes* i *D. pinodella* na teritoriji Srbije. Od ukupnog broja ispitivanih izolata, 62% je identifikovano kao *D. pinodes*, 4% kao *D. pinodella* i 34% izolata

kao *A. pisi*. Dobijeni rezultati ukazuju na sličnu distribuciju patogena i dominantnost vrste *D. pinodes* kao i u drugim zemljama sveta. U Severozapadnoj Indiji, Padder i sar. (2012), su na osnovu identifikacije 38 DNK sekvenci ITS regiona, ustanovili da 36 izolata pripada vrsti *D. pinodes*, kao i po jedan izolat *D. pinodella* i *A. pisi*. Ahmed i sar. (2015) su identifikovali 275 izolata poreklom iz centralne Alberte, i na osnovu kulturoloških i morfoloških karakteristika došli do zaključka da 99% izolata pripada vrsti *D. pinodes*, a ostalih 1% vrsti *D. pinodella*. Dominantnost patogena *D. pinodes* u ispitivanim regionima Srbije se može objasniti visokim prisustvom inokuluma u zemljištu i na žetvenim ostacima, kao i gajenjem graška u monokulturi i nakon drugih biljnih vrsta iz familije leguminoza. Poslednjih decenija, sa povećanjem padavina i temperatura tokom zimskih meseci dolazi do stvaranja povoljnih uslova za preživljavanje, umnožavanje i razvoj zemljišnih patogena (Chakraborty i sar., 2000). Zaraženo zemljište predstavlja osnovni izvor inokuluma za *D. pinodes* i *D. pinodella*, ali ne i za *A. pisi* (Bretag i sar., 2006) zbog slabe saprofitske i kompetitivne aktivnosti sa drugim mikroorganizmima iz zemljišta (Dickinson i Sheridan, 1968). McDonald i Peck (2009) su utvrdili prisustvo inokuluma *D. pinodes* i *D. pinodella* u zemljištu na kojem se grašak nije gajio duži niz godina. Hlamidospore mogu da održe svoju vitalnost u zemljištu više od godinu dana na temperaturi od -20°C do 25°C, pa čak i na temperaturi od 100°C u trajanju od 12 do 15h (Wallen i sar., 1967). McDonald i Peck (2009) navode da zaraženi biljni ostaci graška predstavljaju važan izvor inokuluma *D. pinodes* u nastupajućoj godini. Oslobođene askospore *D. pinodes* nošene vetrom mogu biti prenete na razdaljine veće od 1,5 km, i na taj način dospevaju na susedna polja graška (Lawyer, 1984; Setti i sar. 2009).

Osnovni izvor inokuluma *A. pisi* predstavlja zaraženo seme (Pag, 1998; Bretag i sar., 2006), u kome zadržava vitalnost od 4 do 7 godina (Ivanović i Ivanović, 2001). U našoj zemlji određen broj poljoprivrednih proizvođača uprkos apelima stručnjaka i dalje praktikuje zasnivanje useva semenom „sa tavana“. Na osnovu atestiranih količina prodatog semena stočnog graška i zasnovanih površina pod ovom kulturom, može se zaključiti da je između 20 i 30% površina zasnovano konvencionalnim semenom. Takvo seme je često netretirano fungicidima i nepoznatog zdravstvenog stanja, te upravo ovo može biti jedan od razloga prisutnosti *A. pisi* na 11 od 27 ispitivanih lokaliteta u Srbiji.

Pregledom literature, ustanovili smo da izolovani i molekularno identifikovani izolati (K501, K502, K503 i K504) poreklom iz Bosne i Hercegovine sa lokaliteta Velika Ilova predstavljaju prve nalaze *A. pisi* u ovoj zemlji.

Izolovani patogeni *A. pisi* (K33) i *D. pinodella* (K60 i K63) poreklom iz Turske su u skladu sa literaturnim navodima o prisustvu navedenih vrsta u toj zemlji (Soylu i Dervis, 2011). Dominantnost patogena *D. pinodes* (K2, K3, K4 i K5) među ispitivanim izolatima poreklom iz Francuske, kao i prisustvo *A. pisi* (K1) su takođe u skladu sa istraživanjima mnogih autora iz navedenih zemalja (Tivoli i Lemarchand, 1992; Onfroy i sar., 1999; Tadjia, 2012).

Makroskopske morfološke karakteristike Ascochyta spp.

Rezultati naših istraživanja podudaraju se sa istraživanjima Kosiada (2012) u kojima je takođe utvrđena varijabilnost u brzini porasta svih testiranih izolata *Ascochyta* spp., gajenih na različitim hranljivim podlogama pod različitim svetlosno-temperaturnim režimima. Iz dobijenih rezultata sledi da je većina izolata *D. pinodes* i *D. pinodella* ostvarili najveći i najbrži porast od prvog do petog, odnosno do 10. dana inkubacije kod izolata *A. pisi*. Većina izolata *Ascochyta* spp. gajenih pod različitim svetlosno-temperaturnim režimima su ostvarili najmanju brzinu porasta na Yeast i V8 hranljivim podlogama.

Kod izolata *Ascochyta* spp., takođe je uočena najmanja brzina porasta na temperaturi od 15°C pri oba režima svetlosti. Pri istim uslovima gajenja većina izolata *D. pinodes* nije dostigla maksimalan porast ni posle 20. dana, za razliku od izolata *D. pinodella* koji su ispunili Petri kutiju već nakon 15., odnosno 20. dana (*A. pisi*). Na 15°C, Onfroy i sar. (1999) i Le May i sar. (2018) su takođe ustanovili brži porast izolata *D. pinodella* u odnosu na izolate *D. pinodes*.

Uočeno je i da nije bilo značajnijih razlika u brzini porasta izolata *Ascochyta* vrsta od 1. do 15. dana, kao i da je većina izolata *D. pinodes* i *D. pinodella* ispunila Petri kutiju već nakon 15. dana inkubacije na temperaturi od 20°C, dok je kod izolata *A. pisi* zabeležen nešto sporiji porast, i oni su ispunili Petri kutiju tek nakon 20. dana. Na temperaturi od 25°C pri oba svetlosna režima, većina izolata *D. pinodes* i *A. pisi* je ispunila Petri kutije 15. dana, dok su izolati *D. pinodella* imali nešto brži porast i dostigli svoj maksimum nakon 10. dana inkubacije.

Nakon dvadesetog dana inkubacije, utvrđena je velika varijabilnost u porastu kolonija izolata *Ascochyta* spp., gajenih na različitim hranljivim podlogama pod različitim svetlosno-temperaturnim uslovima. Dobijeni rezultati su u skladu sa istraživanjima Liu i sar. (2016), koji navode postojanje statistički značajnih razlika između izolata *D. pinodes* gajenih na OAT, PDA, WA, PLA, CM hranljivim podlogama pri temperaturi od 25°C. Među ispitivanim hranljivim podlogama, kao najpovoljnije za rast kolonija *Ascochyta* vrsta., izdvojile su se Conn's i WA, odnosno OAT kod *D. pinodella* i *A. pisi*. V8 i Yeast hranljive podloge su se pokazale kao najnepovoljnije za porast izolata *Ascochyta* vrsta. Ispitujući uticaj 8 vrsta hranljivih podloga na

porast izolata *Phoma exigua*, Zhao i Shamoun (2006) su ustanovili inhibitorno dejstvo Yeast hranljive podloge prema ovom patogenu, što se potvrdilo i našim istraživanjem. Izolati K517 (*D. pinodes*), K17 i K388 (*D. pinodella*), K6 i K22 (*A. pisi*) su imali statistički najveći porast kolonija u odnosu na ostale testirane izolate. Takođe je uočeno da su temperature od 20°C i 25°C, kao i svetlosni režim 12/12h svetlo-tama bile najpovoljnije za porast kolonija *D. pinodes*.

Nasuprot navedenoj vrsti, temperatura od 20°C je bila najpovoljnija za porast kolonija *D. pinodella* i *A. pisi*, dok svetlosni režim nije imao uticaja na porast izolata ovih vrsta. Optimalna temperatura za rast micelije *Ascochyta* vrsta pre svega varira od geografskog porekla sakupljenih izolata (Kaiser, 1973).

Sagledavanjem interakcija između različitih uslova gajenja i testiranih izolata *D. pinodes*, *D. pinodella* i *A. pisi*, uočene su statistički značajne intraspecijske varijacije u pogledu porasta kolonija ovih vrsta. Do sličnih zaključaka su došli i Zhao i Shamoun (2006) koji su ustanovili statistički značajne interakcije između svetlosnog režima i hranljive podloge na porast kolonije izolata *Phoma exigua*. Pored rasta micelije, autori takođe navode da su ove interakcije značajno uticale i na sporulaciju i klijanje konidija.

Varijabilnost u boji i gustini vazdušne micelije izolata, kao i pigmentacija u podlozi, je uočena zavisno od tipa hranljive podloge kao i uslova gajenja kod svih testiranih izolata *Ascochyta* spp., što je u skladu sa navodima Lawyer (1984). Ustanovljene su i zajedničke karakteristike svih ispitivanih izolata *Ascochyta* spp. kao što su ravan obod kolonije i slabija ili jača koncentrična zoniranost. Iz rezultata takođe sledi da su svi izolati *D. pinodes*, *D. pinodella* i *A. pisi* imali nešto tamniju vazdušastu miceliju, kao i pigmentaciju u podlozi pri režimu 24h tama nezavisno od temperature gajenja.

Prema literaturnim navodima boja kolonije *D. pinodes* varira od svetlosive, tamnosive, braon i crne u zavisnosti od uslova gajenja (Lawyer, 1984; Punithalingam i Holliday, 1972a; Bretag i Ramsey, 2001; Padder i sar., 2012; Tadjia, 2018). U našim istraživanjima pored napred navedenih boja, konstatovane su i svetlije boje poput: bele, krem, smeđe, žućkaste i oker boja vazdušne micelije, dok je pigmentacija u podlozi varirala od bele, krem, žute, svetlo roze, ljubičaste, oker, smeđe i crne, boje. Na Yeast hranljivoj podlozi pri različitim svetlosno-temperaturnim režimima svi ispitivani izolati *D. pinodes* su formirali kožastu miceliju. Formiranje kožaste micelije je takođe uočeno na OAT i PDA hranljivim podlogama pri oba svetlosna režima na 20°C. Ustanovljeno je i obrazovanje jastučastih formacija kod svih ispitivanih izolata *D. pinodes* gajenih na Conn's hranljivoj podlozi pri 20°C i 25°C na oba

svetlosna režima. U dosadašnjoj literaturi nema podataka o pojavi jastučastih formacija na hranljivim podlogama.

Uočeno je da su svi ispitivani izolati *D. pinodella* imali nešto tamniju miceliju kao i pigmentaciju u podlozi u odnosu na izolate *D. pinodes*. Punithalingham i Gibson (1976) navode da tamnija boja kolonija izolata *D. pinodella* nastaje usled preplitanja vazdušaste micelije sa tamnim hlamidosporama, što je bio slučaj i u našim istraživanjima.

Na OAT hranljivoj podlozi *D. pinodella* obrazuje bezbojne, blede maslinaste, sivo maslinaste i žućkaste kolonije sa tamnim pigmentacijom podloge (Iryni i sar., 2009), dok Padder i sar. (2012) navode i tamno braon boju kolonije. Na PDA hranljivoj podlozi patogen obrazuje miceliju tamnosive i crne (Lawyer, 1984) kao i tamno zelene (Tadja, 2018) boje. U našim istraživanjima su zapažene varijacije u boji kolonije koje su se kretale od bele, oker, krem, ružičaste, svetlo ljubičaste, smeđe i crne, dok je boja pigmenta u podlozi varirala od krem, boje kajsije, citron žute, roze, sivoljubičaste, tamnoljubičaste, žuto-smeđe, oker-smeđe, tamno smeđe, sive i crne. U rezultatima je takođe uočeno da su izolati *D. pinodella* obrazovali kožastu miceliju na PDA (15°C), OAT (15°C i 25°C) i Yeast (25°C) hranljivim podlogama. Kao i kod predhodne vrste, uočeno je formiranje jastučastih formacija na Conn's (pri svim ispitivanim uslovima gajenja) i PDA (15°C i 25°C) hranljivim podlogama. S obzirom na veoma oskudne dosadašnje literaturne navode o odgajivačkim karakteristikama ovog patogena, postoje teškoće u poređenju dobijenih rezultata sa rezultatima drugih autora.

Noordeloos i sar. (1993) u svojim istraživanjima navode da su izolati *D. pinodella*, gajeni na Malt dekstroznom agaru u tami pri temperaturi od 20°C, obrazovali bele kristale u podlozi, koji su bili razgranati i u obliku lepeze ili paperija. U našim istraživanjima je takođe zapaženo formiranje belih kristala lepezastog, pahuljastog i paperjastog oblika. Kristali su formirani kod referentnog izolata K17 (oba svetlosna režima) i izolata K60 (24h tama), gajenih na PDA hranljivoj podlozi pri temperaturi od 20°C. Noordeloos i sar. (1993) navode da se kristali formiraju kao sposobnost gljive *D. pinodella* da proizvode makrolide (pinodellalide A i B).

Uočeno je da su svi ispitivani izolati *A. pisi* imali nešto svetliju miceliju kao i pigmentaciju u podlozi u odnosu na izolate *D. pinodes* i *D. pinodella*, što se podudara sa istraživanjima Bretag i Ramsey (2001). Takođe je uočena slaba intraspecijska varijabilnost *A. pisi* u boji i pigmentaciji podloge u odnosu na ostale vrste iz *Ascochyta* kompleksa pri istim uslovima gajenja. Boja micelije izolata *A. pisi* je varirala od blede roze, krem, lila i žućkaste

boje, dok je boja pigmenta u podlozi varirala od bele, krem, žućkaste, oker, svetlo smeđe, rozikaste, narandžaste i smeđe-crne boje. Prema literaturnim navodima boja micelije *A. pisi* kao i pigmenatacija u hranljivoj podlozi može varirati od bele, krem, narandžaste do roze boje (Bretag i Ramsey, 2001; Tadjia, 2012; Terbeche i sar., 2015). U našem istraživanju je uočeno i da su određeni izolati *A. pisi* obrazovali kožastu miceliju na PDA i Yeast (25°C) hranljivim podlogama. Ustanovljeno je i obrazovanje jastučastih formacija kod svih ispitivanih izolata *A. pisi* gajenih na WA hranljivoj podlozi pod različitim svetlosno-temperaturnim režimom. Formiranje jastučastih formacija na WA hranljivoj podlozi može se objasniti kao pokušaj gljive da formira piknide, ali usled slabe nutritivne vrednosti WA podloge do toga nije došlo.

Mikroskopske morfološke karakteristike Ascochyta spp.

D. pinodes je homotalusni biljni patogen, stoga izolati *D. pinodes* dobijeni monospornom ili monokonidijalnom izolacijom mogu formirati pseudotecije (Punithalingam i Holiday, 1972a; Onfroy i sar., 1999). Vrsta hranljive podloge značajno utiče na sporulaciju i porast micelije (Zhao i Shamoun, 2006). Prema literaturnim navodima, peritecije, piknidi i hlamidospore *Ascochyta* spp. se mogu formirati na različitim hranljivim podlogama, među kojima su najčešće korišćene PDA, OAT i V8 hranljive podloge (Lawyer, 1984; Onfroy i sar., 1999; Padder i sar., 2012; Tadjia, 2012, Tadjia, 2018).

Nakon dvadesetog dana inkubacije, ni jedan od ispitivanih izolata *D. pinodes*, gajenih pod različitim svetlosno-temperaturnim režimima na OAT, PDA, WA, Yeast i V8 hranljivim podlogama nije obrazovao peritecije i piknide. Prema literaturnim navodima peritecije *D. pinodes* se najčešće formiraju na podlogama siromašnim hranljivim materijama, dok za formiranje piknida *Ascochyta* spp. su potrebne hranljive podloge sa visokim sadržajem nutrienata (Roger i Tivoli, 1996b). Pored hranljive podloge, svetlosno-temperaturni režim takođe je veom značajan za obrazovanje peritecija. Ispitujući različite temperaturne uslove za razvoj peritecija *D. pinodes*, Davidson (2012) navodi da 16°C predstavlja optimalnu temperaturu za razvoj peritecija, dok sa porastom temperature na 20°C njihov broj značajno opada, a pri temperaturama iznad 24°C ne dolazi do njihovog formiranja. Većina peritecija se obrazuje i sazreva nakon 25 do 30 dana pri temperaturi od 16°C (Lawyer, 1984), a sa smanjnjem temperature ispod 16°C produžava se period njihovog obrazovanja i sazrevanja (Davidson, 2012). Svetlosni režim značajno povećava stepen sporulacije gljiva, međutim nije neophodna za razvoj kulture (Zhao i Shamoun, 2006). Vrsta hranljive podloge značajno utiče na porast micelije, sporulaciju i klijanje konidija (Zhao i Shamoun, 2006), što je potvrđeno i u našim

istraživanjima. Formiranje peritecija i piknida je jedino uočeno na Conn's hranljivoj podlozi na 15°C u tami (K18 i K528) i 20°C pri oba svetlosna režima (svi ispitivani izolati), dok na 25°C nije registrovano obrazovanje spora. Dobijeni rezultati su takođe u skladu sa istraživanjima Roger i Tivoli (1996b) koji su ustanovili dobro formiranje peritecija na 20°C sa fotoperiodom 16h/8h dan-noć. Ispitujući uticaj različitih hranljivih podloga i svetlosno-temperaturnog režima, takođe smo ustanovili varijabilnost između testiranih izolata u pogledu formiranja hlamidospora. Utvrđeno je da su oba svetlosna režima i temperature od 20°C i 25°C bile najpovoljnije za sporulaciju *D. pinodes*.

D. pinodes u teleomorfnom stadijumu obrazuje peritecije (pseudotecije) tamne boje, u kojima se formiraju cilindrični, malo povijeni bitunikatni askusi cilindrično-paličastog oblika veličine 50-80 x 10-15 µm (Lawyer, 1984). Prema literaturnim navodima askospore *D. pinodes* su nejednakih dimenzija, dvoćelijske, sužene na mestu obrazovanja septi (Wilson i Kaiser 1995; Kaiser i sar., 1997), nepravilno zadebljale na krajevima u kojim se uočavaju kapljice ulja (Lawyer, 1984; Skoglund i sar., 2011; Tadj, 2012), što je potvrđeno u ovom istraživanju kod izolata koji su formirali peritecije na Conn's hranljivoj podlozi. U zavisnosti od izolata *D. pinodes*, na Conn's hranljivoj podlozi veličina askospora se kretala od 9,8-12,1 x 4,1-5,1 µm, što su nešto manje dimenzije od opisanih u literaturi: Lawyer (1984) navodi da su prosečne dimenzije 17,2 x 7,9 µm, dok su prema Skoglund i sar., (2011) askospore dimenzija 11-18 x 4-8 µm. Takođe, nisu uočene statistički značajne razlike u dužini i širini askospora između testiranih izolata u različitim uslovima gajenja.

Piknidi *D. pinodes* su sferičnog oblika, tamno braon do crne boje, veličine 60-200 µm (Mel'nik, 2000; Skoglund i sar., 2011), u kojima se nalaze hijalne piknospore. Piknospore su prave ili blago povijene na mestu obrazovanja septi sa zaobljenim krajevima, u kojima se uočavaju sitne kapljice ulja (Lawyer, 1984), sa jednom, a ređe sa dve (Ahmed i sar., 2015.) ili tri septe (Lawyer, 1984). Svi testirani izolati su obrazovali piknide sferičnog oblika, tamno braon do crne boje, veličine od 70 do 205 µm u kojima su se obrazovale elipsoidne i hijalne piknospore, sa jednom septom. Na suprotnim krajevima konidija su se uočavale brojne kapljice ulja. Kod pojedinih izolata uočene su statistički značajne razlike u dužini i širini piknospora pri različitim uslovima gajenja. Dimenzije piknospora su se kretale od 6,8-9,6 x 2,5-3,6 µm. Slične dimenzije piknospora su registrovane u istraživanjima Ahmed i sar. (2015).

D. pinodes formira jednoćelijske hlamidospore direkno na vršnim ili središnjim delovima hifa u vidu kraćih lanaca, najčešće do tri u nizu. U zavisnosti od uslova gajenja,

prosečna veličina hlamidospora *D. pinodes*, se kretala od 7,1 do 21,9 μm . Hlamidospore su bile od svetlo do tamno braon boje, okruglog do jajastog oblika, obavijene opnom debljine od 0,5 μm do 1 μm . Unutar hlamidospora su uočene krupne uljane kapi, maslinasto zelene boje. Opisane hlamidospore su u saglasnosti sa opisima drugih autora (Lawyer, 1984; Irinyi i sar., 2009; Watanabe, 2010).

Ispitujući uticaj različitih uslova gajenja na veličinu obrazovanih hlamidospora *D. pinodes*, ustanovljeno je da nije bilo statistički značajnih razlika između domaćih izolata, kao i da su se najveće hlamidospore formirale na WA (16,6 μm), a najmanje na V8 hranljivoj podlozi (9,0 μm). Takođe, ustanovljen je najpovoljniji uticaj temperature od 15°C na prosečnu veličinu hlamidospora, dok je temperatura od 25°C bila najnepovoljnija. Svetlosni režim nije imao uticaja na prosečnu veličinu hlamidospora. U dosadašnjoj literaturi nema podataka o ovim ispitivanim parametrima.

Ispitujuću uticaj različitih uslova gajenja, uočeno je formiranje sklerocija kod izolata *D. pinodes* - K528 i K517 na Conn's hranljivoj podlozi. Pri oba svetlosna režima, na temperaturi od 20°C zabeleženo je slabo, a na 25°C obilato formiranje sklerocija. Rezultati, takođe ukazuju da svetlosni režim nije uticao na gustinu obrazovanih sklerocija. Formirane sklerocije su bile nepravilnog oblika, crne boje, veličine od 0,5 do 2 mm. Prema našem saznanju, ovo je prvi nalaz da su se sklerocije formirale u laboratorijskim uslovima kod vrste *D. pinodes*.

U dosadašnjoj literaturi ne postoje podaci o ispitivanju uticaja pojedinačnih faktora na sporulaciju gljive *D. pinodella*. Prilikom ovih istraživanja ustanovljena je dobra sporulacija većine testiranih izolata *D. pinodella* na Conn's, OAT i PDA hranljivim podlogama pod različitim svetlosno-temperaturnim režimom. Piknidi *D. pinodella* su bile sferičnog do bubrežastog oblika, veličine od 55-190 μm , tamno braon do crne boje, u kojima su se obrazovale hijalne, aseptirane piknospore ovalnog do cilindričnog oblika, zaobljene na krajevima. Opisani piknidi i piknospore su u skladu sa opisima u drugim istraživanjima (Watanabe, 2010; Skoglund i sar., 2011). U zavisnosti od uslova gajenja, prosečna veličina piknospora se kretala od 4,4-8,5 x 1,6-3,4 μm , što je u skladu sa istraživanjima: Lawyer, (1984) (4,5-8 x 2-3 μm), Leath (1990) (4-15 x 2,4 μm), Irinyi i sar., (2009) (4-8 x 2-3,5 μm), Watanabe, (2010) (3,5-5,5 x 1,2-2,5 μm), i Djebali, (2013) (4,9-7,1 x 2,0-2,9 μm).

Na osnovu dobijenih rezultata uočena je intraspecijska varijabilnost izolata *D. pinodella* u dužini i širini obrazovanih piknospora. Najveće piknospore su se formirale kod izolata K60 poreklom iz Turske (6,8 x 2,8 μm), odnosno najmanje kod referentnog izolata K17 (4,8 x 2,1

µm) poreklom iz Holandije. Takođe je uočeno da su se najduže piknospore obrazovale na Conn's (6,1 µm) i PDA (6,0 µm) podlogama. Nasuprot navedenim podlogama, najšire piknospore (2,7 µm) su zabeležene na OAT hranljivoj podlozi. Rezultati takođe ukazuju da se sa povećanjem temperature povećava i prosečna veličina piknospora, pa tako na temperaturi od 15°C su se obrazovale najmanje, a na 25°C najveće piknospore.

Hlamidospore *D. pinodella* su po opisu i načinu formiranja bile identične kao kod predhodno opisane vrste *D. pinodes*, ali nešto manjih dimenzija od 7,1 do 17,8 µm. Irinyi i sar. (2009) navode dimenzije hlamidospora od 7 – 20 µm. Dobijeni rezultati ukazuju da je većina izolata *D. pinodella* obrazovala hlamidospore u različitim uslovima gajenja, kao i da su najveće hlamidospore formirali izolati K63 (12,9 µm) i K60 (12,7 µm), dok je referentni izolat K17 obrazovao najmanje hlamidospore (10,4 µm). Takođe je zabeležen i značajan uticaj hranljivih podloga na prosečnu veličinu obrazovanih hlamidospora, pa su najveće hlamidospore formirane na WA (14,9 µm), odnosno najmanje na V8 (11,0 µm) i Conn's (10,9 µm) hranljivim podlogama. Svetlosno-temperaturni režim je takođe uticao na prosečnu veličinu hlamidospora. Iz rezultata sledi da su testirani izolati formirali hlamidospore prosečno većih dimenzija pri režimu od 24h tame, kao i pri temperaturama od 15°C i 20°C.

Nakon 20. dana uočeno je formiranje sklerocija kod većine gajenjih izolata *D. pinodella* na Conn's, OAT i PDA hranljivim podlogama. Pri oba svetlosna režima, na temperaturi od 15°C zabeleženo je slabo formiranje sklerocija na ovim podlogama. Na Conn's podlozi uočeno je obilato formiranje sklerocija na 25°C i 20°C, dok su na OAT podlozi one formirane slabo do obilato u zavisnosti od izolata, a nezavisno od temperature. Na PDA podlozi sklerocije su formirane slabo u svim ispitivanim uslovima gajenja. Rezultati takođe ukazuju da svetlosni režim nije značajnije uticao na gustinu obrazovanih sklerocija. Formirane sklerocije su bile nepravilnog oblika, crne boje, veličine od 0,3 do 2,5 mm. Ispitujući morfološke osobine vrste *Phoma koolunga*, Davidson i sar., (2009) navode da su neki izolati formirali pseudosklerocije na OAT hranljivoj podlozi.

Proučavanjem mikroskopskih karakteristika izolata *A. pisi*, u različitim uslovima gajenja, ustanovili smo da je većina izolata dobro sporulisala pod različitim svetlosno-temperaturnim režimom na Conn's, OAT, PDA i V8 hranljivim podlogama, dok je sporulacija u potpunosti izostala kod svih testiranih izolata na WA i Yeast (sa izuzetkom izolata K6 i K502 na 15°C u tami) hranljivim podlogama. Izolati *A. pisi* su obrazovali ovalne piknide, od žuto narandžaste do tamno braon boje, vidljive golim okom, veličine 70-240 µm, što je u skladu sa

istraživanjima Mel'nik (2000). Isti autor navodi veličinu piknospora od 10-19 x 2,5-5 μm , dok prema Skoglund i sar., (2011) veličina piknospora iznosi 10-16 x 3-4,5 μm . Navedene dimenzije odgovaraju dimenzijama iz naših istraživanja: 8,5-13,8 x 2,9-4,4 μm . U istraživanjima su takođe uočene piknospora sa tri (17,36 x 3,22 μm) i dve (11,72 x 3,21 μm) septe. Ispitivanjem različitih uslova gajenja na izolate *A. pisi*, uočeno je da je najveće piknospore formirao izolat K22 (12,4 x 4 μm). Iz rezultata dalje sledi da su hranljive podloge značajno uticale na dužinu i širinu piknospora. Najduže i najkraće piknospore su formirane na Conn's i V8 hranljivim podlogama, dok su na podlogama PDA i Conn's obrazovane najšire, odnosno najuže piknospore na OAT i V8 hranljivim podlogama. Jamal i sar. (2005) navode različite dimenzije piknospora između 10 testiranih izolata *A. pisi* gajenih na hranljivoj podlozi pripremljenoj od semena graška. Na dužinu piknospora najpovoljnije je uticala temperatura od 15°C, a na širinu temperature od 15°C i 25°C. Takođe je uočeno da su u tami formirane najduže, a pri smeni svetla i tame najuže piknospore. Usled nedostataka literaturnih podataka, nije moguće uporediti dobijene rezultate sa rezultatima drugih autora.

Većina istraživača kao siguran dijagnostički znak prilikom razdvajanja *A. pisi* od *D. pinodes* i *D. pinodella*, navodi odsustvo hlamidospora (Kraft i sar., 1998; Onfroy i sar., 1999; Bretag i Ramsey, 2001; Fatehi i sar., 2003; Tadjia i sar., 2009), međutim jedan broj istraživača navodi da se one ipak mogu formirati (Wallen i Jeun, 1968; Punithalingham i Holliiday, 1972b; Bretag i sar., 2006). Iz rezultata sledi da su hlamidospore formirane kod referentnog izolata K6 i K502 na Yeast hranljivoj podlozi u tami pri temperaturi od 15°C. Marić (1991) navodi da se hlamidospore počinju formirati pri nepovoljnim uslovima za razvoj gljive, što bi u našim istraživanjima bila Yeast hranljiva podloga. Hlamidospore navedenih izolata su formirane pojedinačno ili u manjim nizovima (2-3), okruglog do jajastog oblika, prozirne boje. Prosečna veličina hlamidospora je bila nešto manjih dimenzija u odnosu na *D. pinodes* i *D. pinodella*, i kretala se od 9,4 μm do 11,1 μm . Iz svega navedenog može se zaključiti da prisustvo ili odsustvo hlamidospora kod *Ascochyta* vrsta ne može biti pouzdan dijagnostički pokazatelj.

Patogenost izolata Ascochyta spp.

Potruga za rezistentnim genotipovima graška počela je u prvoj polovini dvadesetog veka (Liu i sar., 2016). Međutim, samo umeren nivo otpornosti prema *D. pinodes* je do sada utvrđen kod komercijalnih sorti graška (Nasir i Hoppe, 1997; Khan i sar., 2013). U dosadašnjim istraživanjima otpornost prema ovom patogenu, iako nepotpuna, identifikovana je uglavnom u divljim formama graška (Wroth, 1998; Fondevilla i sar., 2005). Prema literaturnim navodima,

prvi simptomi pegavosti uzrokovanih gljivama *D. pinodes* i *D. pinodella* na inokulisanim biljkama graška pojavljuju se nakon 24h i 72h od ostvarene infekcije (Davidson i sar., 2009; Carrillo, 2013), odnosno 6 do 8 dana za infekcije ostvarene gljivom *A. pisi* (Lawyer, 1984). U našim istraživanjima zapaženo je nešto kasnije pojavljivanje simptoma pegavosti u odnosu na istraživanja drugih autora. Prvi simptomi na testiranim genotipovima graška su registrovani četvrtog dana nakon inokulacije izolatima K517 – *D. pinodes* (Dukat, NS Junior) i AP (Kosmaj, Junior, NS Mraz), dok su se simptomi izazvani ostalim izolatima javili osmog dana na svim ispitivanim genotipovima stočnog graška. Nakon 14. dana, izolati K63, MIX, DP, K528 i K388 su prouzrokovali nekrozu u prizemnom delu stabla biljaka, kao i njihovo uvenuće.

Uočena je i velika varijabilnost između patogenosti izolata *D. pinodes*, *D. pinodella* i *A. pisi*, kao i između grupa izolata DP, DPI, AP i MIX prema testiranim sortama stočnog graška. Najveća prosečna AUDPC vrednost je zabeležena kod sorte Dukat, što je čini najosetljivijim, dok je sorta Kosmaj bila najtolerantnija prema većini testiranih izolata. Međutim, treba napomenuti da je sorta Kosmaj, izuzetno, pokazala visoku osetljivost prema izolatu K528. Suspenzija svih izlota (MIX) je ispoljila najveću patogenost prema svim ispitivanim sortama stočnog graška, izuzev prema sorti Kosmaj. Sorta Kosmaj je bila najtolerantnija prema izolatima *A. pisi* i AP, dok je za ovu sortu bila najpatogenija grupa izolata DPI. Tolerantnost sorte Kosmaj je u skladu sa istraživanjima Marinković i sar. (1981) koji su utvrdili dobru otpornost ove sorte prema *A. pisi*. Ostali genotipovi graška su ispoljili manju ili veću osetljivost prema svim testiranim izolatima i gupama izolata. U zavisnosti od geografske distribucije patogena iz *Ascochyta* spp. kompleksa, Lawyer (1984) kao jednu od mere borbe, ističe važnost u gajenju lokalnih sorti graška, čija je otpornost predhodno testirana na lokalne populacije patogena. Tivoli i sar. (1996) su ustanovili vezu između smanjenja prinosa u odnosu na procenat zaraženosti internodija i stipula. Ukoliko je zaraženost biljaka ≤ 2 na skali od 0 do 5, onda se može očekivati potencijalni gubitak prinosa za 20% (Salam i sar., 2001b).

Pronalaženje izvora otpornosti predstavlja veliki i težak korak, jednim delom zbog velikog broja linija graška koje je potrebno analizirati (Xue i sar., 1996), a drugim delom zbog velike intra- i interspecijske morfološke i molekularne raznovrsnosti patogena čiji je proces adaptacije na biljnog domaćina kontinuiran i dugotrajan.

8. ZAKLJUČAK

Na osnovu proučavanja morfološko molekularnih karakteristika patogena iz *Ascochyta* spp. kompleksa mogu se doneti sledeći zaključci:

Vizuelni pregled stabla, listova, lisnih i cvetnih drški i vitica ne omogućuje pouzdano razlikovanje simptoma *D. pinodes*, *D. pinodella* i *A. pisi* jedne od drugih. Stoga je rađena identifikacija navedenih patogena na morfološkom i molekularnom nivou.

Tokom trogodišnjeg istraživanja, utvrđeno je prisustvo *Ascochyta* spp. na 27 različitih lokaliteta u Republici Srbiji, kao i na po jednom lokalitetu u Bosni i Hercegovini, Turskoj i Francuskoj.

Identifikacija svih 89 izolata urađena molekularnim metodama. Od ukupnog broja identifikovanih izolata, 77 izolata je poreklom iz Republike Srbije, 4 iz Bosne i Hercegovine, 3 iz Turske, i 5 iz Francuske.

Od ukupnog broja izolata poreklom iz Srbije, 48 izolata (62%) pripada vrsti *D. pinodes*, 26 izolata (34%) vrsti *A. pisi* i 3 izolata (4%) vrsti *D. pinodella*.

Na osnovu filogenetske analize ITS sekvenci rDNK regiona je bilo moguće razdvojiti vrstu *A. pisi* od vrsta *D. pinodes* i *D. pinodella*, ali ne i poslednje dve vrste međusobno.

Na osnovu analize ITS sekvenci četiri izolata *A. pisi* je identifikovano kao *D. pinodes* i *D. pinodella*. Međutim, primenom IGS1 prajmera i TEF₁- α gena zaključeno je da se radi o vrsti *A. pisi*.

Na osnovu filogenetske analize TEF₁- α sekvenci bilo je moguće razdvojiti vrstu *D. pinodella* od *D. pinodes* i *A. pisi*, ali ne i poslednje dve vrste međusobno.

Na osnovu dužine amplicona, IGS1 prajmeri su omogućili pouzdanu i nedvosmislenu identifikaciju pojedinačnih vrsta *D. pinodes*, *D. pinodella* i *A. pisi*. Navedeni prajmerski par je po prvi put uspešno primenjen na vrsti *A. pisi*.

Morfološko - molekularnim analizama sakupljenih izolata sa različitih lokaliteta, prvi put je potvrđeno prisustvo *D. pinodes* i *D. pinodella* na teritoriji Republike Srbije. Analize su takođe potvrdile da sva četiri izolata poreklom iz Bosne i Hercegovine pripadaju vrsti *A. pisi*, što je ujedno i prvi nalaz *A. pisi* u ovoj državi.

Sagledavanjem interakcija između različitih uslova gajenja i testiranih izolata *D. pinodes*, *D. pinodella* i *A. pisi*, uočene su statistički značajne intraspecijske varijacije u pogledu porasta kolonija.

Utvrđeno je da su Yeast i V8 hranljive podloge negativno uticale na brzinu i porast većine izolata *Ascochyta* spp., dok su Conn's i WA podloge bile najpovoljnije za rast sve tri ispitivane vrste. Nezavisno od svetlosno-temperaturnog režima i hranljive podloge, većina izolata *D. pinodes* i *D. pinodella* je ostvarila brži porast u odnosu na izolate *A. pisi*.

Brzina porasta većine testiranih izolata *Ascochyta* spp., pri oba svetlosna režima i na različitim hranljivim podlogama, je bila najmanja na 15°C, a najveća na 25°C kod vrsta *D. pinodella* i *A. pisi*, i na 20°C i 25°C kod *D. pinodes*.

Temperature od 20°C i 25°C, kao i svetlosni režim 12/12h svetlo-tama, su bili najpovoljniji za prosečan porast kolonija *D. pinodes*, a temperatura od 20°C je bila najpovoljnija za prosečan porast kolonija *D. pinodella* i *A. pisi* dok svetlosni režim nije imao uticaja na razvoj izolata ove dve vrste.

U različitim uslovima gajenja, uočena je velika intra- i interspecijska varijabilnost u pigmentaciji podloge i vazdušne micelije kolonija, s tim što je intraspecijska varijabilnost bila najslabije izražena kod izolata *A. pisi*. Izolati *A. pisi* su obrazovali nešto svetliju vazдушnu miceliju kao i pigmentaciju u podlozi u odnosu na izolate *D. pinodes* i *D. pinodella*, dok su ispitivani izolati *D. pinodella* obrazovali tamniju pigmentaciju u podlozi i vazdušne micelije u odnosu na izolate *D. pinodes*.

Kod ispitivanih izolata *D. pinodes*, *D. pinodella* i *A. pisi*, na PDA, OAT i Yeast hranljivim podlogama uočeno je obrazovanje „kožaste“ micelije.

Jastučaste formacije u vazdušnoj miceliji su se formirale kod *D. pinodes* i *D. pinodella* izolata na Conn's hranljivoj podlozi, odnosno WA hranljivoj podlozi kod izolata *A. pisi* pod određenim svetlosno-temperaturnim režimom.

Kod pojedinih izolata vrste *D. pinodella* registrovano je formiranje belih kristala lepezastog, pahuljastog i paperjastog oblika na PDA hranljivoj podlozi pri temperaturi od 20°C.

Peritecije gljive *D. pinodes* su se formirale samo na Conn's hranljivoj podlozi na 15°C u tami, kao i na 20°C pri oba svetlosna režima.

Prilikom istraživanja uticaja različitih uslova gajenja na sporulaciju ispitivanih izolata *Ascochyta* spp. kompleksa, utvrđeni su povoljni uticaji temperature od 20°C i Conn's hranljive podloge kod izolata vrste *D. pinodes*, odnosno Conn's, OAT i PDA hranljivih podloga kod izolata *D. pinodella* i *A. pisi*, a dodatno i povoljan uticaj V8 podloge na sporulaciju izolata *A. pisi*.

Izolati *D. pinodes*, *D. pinodella* i *A. pisi* ispoljili su veliku varijabilnost u dužini i širini obrazovanih piknospora u različitim uslovima gajenja.

Formiranje hlamidospora registrovano je kod sve tri ispitivane *Ascochyta* vrste, s tim što je prosečna veličina hlamidospora *A. pisi* bila nešto manjih dimenzija u odnosu na hlamidospore koje su obrazovali izolati vrsta *D. pinodes* i *D. pinodella*. Ispitujući uticaj različitih uslova gajenja na veličinu obrazovanih hlamidospora, utvrđeno je da su svetlosno-temperaturni režim i hranljive podloge različito uticale na veličinu hlamidospora.

Formiranje sklerocija je registrovano kod izolata vrsta *D. pinodes* i *D. pinodella*, i ovo je prvi nalaz formiranja sklerocija u ispitivanim laboratorijskim uslovima. Sklerocija vrste *D. pinodes* su se formirale samo na Conn's hranljivoj podlozi, a *D. pinodella* na Conn's, OAT i PDA hranljivim podlogama.

Prvi simptomi na testiranim genotipovima graška su registrovani četvrtog dana nakon inokulacije izolatima K517 – *D. pinodes* (Dukat, NS Junior) i AP (Kosmaj, Junior, NS Mraz), dok su se simptomi izazvani ostalim izolatima javili osmog dana na svim ispitivanim genotipovima stočnog graška.

Uočena je i velika varijabilnost u patogenosti između izolata *D. pinodes*, *D. pinodella* i *A. pisi*, kao i između grupa izolata DP, DPI, AP i MIX prema testiranim sortama stočnog graška.

Sorta Dukat je bila najosetljivija na ispitivane patogene *Ascochyta* spp. kompleksa, dok je sorta Kosmaj bila najtolerantnija prema većini testiranih izolata *Ascochyta* spp., naročito prema izolatima *A. pisi* i AP.

Suspenzija svih testiranih izolata *Ascochyta* spp. (MIX) je ispoljila najveću patogenost prema svim ispitivanim sortama stočnog graška, izuzev prema sorti Kosmaj.

9. LITERATURA

1. Ahmed, H., Chang, K. F., Hwang, S. F., Fu, H., Zhou, Q., Strelkov, S., Conner R., Gossen, B. (2015): Morphological characterization of fungi associated with the ascochyta blight complex and pathogenic variability of *Mycosphaerella pinodes* on field pea crops in central Alberta. *The Crop Journal*, 3(1): 10-18.
2. Allmann, M., Candrian, U., Hofelein, C., Luthy, J. (1993): Polymerase chainreaction (PCR): a possible alternative to immunochemical methods assuring safety and quality of food – detection of wheat contamination in non-wheat food-products. *Z Lebensm Unters Forsch*, 196: 248–251.
3. Atlas, R. M. (2010): *Handbook of microbiological media*. CRC press.
4. Aveskamp, M. M., De Gruyter, J., Woudenberg, J. H. C., Verkley, G. J. M., Crous, P. W. (2010): Highlights of the Didymellaceae: a polyphasic approach to characterise *Phoma* and related pleosporalean genera. *Studies in Mycology*, 65: 1-60.
5. Balaž, F., Balaž, J., Tošić, M., Stojšin, V., Bagi, F. (2010): *Fitopatologija-bolesti ratarskih i povrtarskih biljaka*. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
6. Banniza, S., Vandenberg, A. (2003): The influence of plant injury on development of *Mycosphaerella pinodes* in field pea. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 25: 304–311.
7. Barve, M. P., Arie, T., Salimath, S., Muehlbauer, F. J., Peever, T. L. (2003): Cloning and characterization of the mating type (MAT) locus from *Ascochyta rabiei* (teleomorph: *Didymella rabiei*) and a MAT phylogeny of legumeassociated *Ascochyta* spp. *Fungal Genetics Biology*, 39: 151–167.
8. Boros, L. I., Marcinkowska, J. (2010): Assessment of selected pea genotypes reaction to ascochyta blight under field conditions and the impact of disease severity on yield components. *Journal of Agricultural Science*, 2(3): 84-91.
9. Bowness, R. (2013): *Sensitivity of Mycosphaerella pinodes to pyraclostrobin and optimizing fungicide application in field pea*. University of Alberta (Canada).
10. Bretag, T. W., Keane, P. J., Price, T. V. (2006): The epidemiology and control of ascochyta blight in field peas: a review. *Australian Journal of Agricultural Research*, 57(8): 883-902.
11. Bretag, T. W., Ramsey, M. (2001): Foliar diseases caused by fungi. *Ascochyta* spp. In J. M. Kraft, F. L. Pflieger (eds.), *Compendium of pea diseases and pests*. Second edition

- (pp. 24–28). St Paul, Minnesota, USA: APS Press, The American Phytopathological Society
12. Bretag, T. W., Smith, L. M., Ward, D. J. (2001): Effect of soil-borne ascochyta blight fungi on the grain yield of field peas. In 10th Australian Agronomy Conference'. Hobart, Tasmania. (Australian Society of Agronomy).
 13. Carbone, I., Kohn, L.M. (1999): A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 553-556.
 14. Carrillo, E., Rubiales, D., Pérez-de-Luque, A., Fondevilla, S. (2013): Characterization of mechanisms of resistance against *Didymella pinodes* in *Pisum* spp. *European journal of plant pathology*, 135(4): 761-769.
 15. Chakraborty, S. V., Tiedemann, A., Teng, P. S. (2000): Climate change: potential impact on plant diseases. *Environmental Pollution*, 108(3): 317–326.
 16. Chen, Q., Hou, L. W., Duan, W. J., Crous, P. W., Cai, L. (2017): Didymellaceae revisited. *Studies in mycology*, 87: 105-159.
 17. Chilvers, M. I. (2009): Spatial distribution of *Didymella pinodes* petrak and *Ascochyta pinodella* Jones on Austrian winter pea plants. *Ascochyta workshop 2009*, Washington State University, June 28-July 2, 2009, USA.
 18. Chilvers, M. I., Rogers, J. D., Dugan, F. M., Stewart, J. E., Chen, W., Peever, T. L. (2009): *Didymella pisi* sp. nov., the teleomorph of *Ascochyta pisi*. *Mycological research*, 113(3): 391-400.
 19. Conner, R. L., Gossen, B. D., Hwang, S. F., Chang, K. F., McRae, K. B., Penner, W. C. (2012): Field assessment of partial resistance to *Mycosphaerella* blight in *Pisum* subspecies accessions. *Canadian Journal of Plant Science*, 92: 289–296.
 20. Česnulevičienė, R., Gaurilčikienė, I., Ramanauskienė, J. (2014): Control of ascochyta blight (*Ascochyta* complex) in pea under Lithuanian conditions. *Zemdirbyste-Agriculture*, 101(1): 101-108.
 21. Davidson, J. A. (2012): Epidemiology and management of ascochyta blight of field pea (*Pisum sativum*) in South Australia. (Doctoral dissertation).
 22. Davidson, J. A., Hartley, D., Priest, M., Kryszynska-Kaczmarek, M., Herdina, McKay, A., Scott, E. S. (2009): A new species of *Phoma* causes ascochyta blight symptoms on field peas (*Pisum sativum*) in South Australia. *Mycologia*, 101(1): 120-128.

23. Davidson, J. A., Krysinska-Kaczmarek, M., Wilmshurst, C. J., McKay, A., Scott, E. S. (2011): Distribution and survival of ascochyta blight pathogens in field-pea-cropping soils of Australia. *Plant disease*, 95(10): 1217-1223.
24. Dickinson, C. H., Sheridan, J. J. (1968): Studies on the survival of *Mycosphaerella pinodes* and *Ascochyta pisi*. *Annals of Applied Biology*, 62: 473-483.
25. Djebali, N. (2013): Aggressiveness and host range of *Phoma medicaginis* isolated from *Medicago* species growing in Tunisia. *Phytopathologia Mediterranea*, 52(1): 3-15.
26. Ebbels, D. L., Allen, D. J. (1979): A supplementary and annotated list of plant diseases, pathogens and associated fungi in Tanzania. *Phytopathology Papers*, 22: 1-89.
27. FAOSTAT (2012): Food and agriculture organization of the United Nations. FAO Statistic division. <http://www.fao.org> (pristupano 10.10.2012.).
28. Faris-Mokaiesh, S., Boccara, M., Denis, J. B., Derrien, A., Spire, D. (1996): Differentiation of the “Ascochyta complex” fungi of pea by biochemical and molecular markers. *Current Genetics*, 29(2): 182-190.
29. Fatehi, J., Bridge, P. D., Punithalingam, E. (2003): Molecular relatedness within the “*Ascochyta pinodes* complex”. *Mycopathologia*, 156: 317–327.
30. Fernández-Aparicio, M., Amri, M., Kharrat, M., Rubiales, D. (2010): Intercropping reduces *Mycosphaerella pinodes* severity and delays upward progress on the pea plant. *Crop protection*, 29(7): 744-750.
31. Fondevilla, S., A.´vila, C. M., Cubero, J. I., Rubiales, D. (2005): Response to *Mycosphaerella pinodes* in a germplasm collection of *Pisum* spp. *Plant Breeding*, 124(3): 313–315.
32. Fondevilla, S., Rotter, B., Krezdorn, N., Jüngling, R., Winter, P., Rubiales, D. (2014): Identification of genes involved in resistance to *Didymella pinodes* in pea by deepSuperSAGE transcriptome profiling. *Plant molecular biology reporter*, 32(1), 258-269.
33. Garry, G., Tivoli, B., Jeuffroy, M. H., Citharel, J. (1996): Effects of Ascochyta blight caused by *Mycosphaerella pinodes* on the translocation of carbohydrates and nitrogenous compounds from the leaf and hull to the seed of dried-pea. *Plant Pathology*, 45(4): 769-777.
34. Gorfu, D. (2000): Yield loses of field pea due to ascochyta blight caused by (*Mycosphaerella pinodes*) in central Ethiopia. *Pest Management Journal of Ethiopia*, 4 : 85- 90.

35. Gossen, B., Hwang, S., Conner, R., Chang, K. (2011): Managing the ascochyta blight complex on field pea in western Canada. *Prairie Soils and Crops Journal*, 4: 135–141.
36. Guillon, F., Champ, M. J. (2002): Carbohydrate fractions of legumes: uses in human nutrition and potential for health. *British Journal of Nutrition*, 88(S3): 293-306.
37. Hagedorn, D. J. (1984): *Compendium of pea diseases*. American Phytopathological Society
38. Heath, M. C., Wood, R. K. S. (1969): Leaf spot induced by *Ascochyta pisi* and *Mycosphaerella pinodes*. *Annals of Botany*, 35: 451-474.
39. Hwang, S. F., Conner, R. L., Chang, K. F., Gossen, B. D., Sul, H., Howard, R. J., Turnbull, G. D., (2006): Impact of seeding rate and depth on mycosphaerella blight and seed yield of field pea. *Canadian Journal of Plant Science*, 86(3): 845–853.
40. Irinyi, L., Kövics, G. J., Sándor, E. (2009): Taxonomical re-evaluation of *Phoma*-like soybean pathogenic fungi. *Mycological research*, 113(2): 249-260.
41. INRA (2018): Fungal databases- Fungus-Host Distributions. <https://www7.inra.fr/hyp3/pathogene/6ascpin.htm#haut> (pristupano 20.03.2018.).
42. Ivanović, M. S., Ivanović, D. M. (2001): Mikoze i pseudomikoze biljaka. De-eM-Ve.
43. Jamali, A. R., Iqbal, S.M., Rauf, C.S., Akram, A. (2005): Studies on the pathogenic variability in *Ascochyta pisi*. *International Journal of Agriculture and Biology*.
44. Jones, .L. K. (1927): Studies on the nature and control of blight, leaf and pod spot, and foot-rot of peas caused by species of *Ascochyta*. *New York State Agric. Exper. Stn., Research Report*, 547: 1–46.
45. Jovičević, B., Milošević, M. (1990): *Bolesti semena*. Dnevnik.
46. Kaiser, W. J. (1973): Factors affecting growth, sporulation, pathogenicity, and survival of *Ascochyta rabiei*. *Mycologia*, 2: 444-457.
47. Kaiser, W. J. (1997): The teleomorph of *Ascochyta rabiei* and its significance in breeding chickpea. Application of DNA fingerprinting for crop improvement: Marker-assisted selection of chickpea for sustainable agriculture in the dry areas, 3-21.
48. Kalentić, M. (2010): Otpornost genotipova pšenice prema prouzročivaču sive pegavosti lista *Septoria tritici* Rob. Ex Desm. Magistarska teza. Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet.
49. Khan, T. N., Timmerman-Vaughan, G. M., Rubiales, D., Warkentin, T. D., Siddiquem K. H. M., Erskine, W., Barbetti, M. J. (2013): *Didymella pinodes* and its management in field pea: challenges and opportunities. *Field Crop Research*, 148: 61–77.

50. Khani, M. (2015): Aspects of epidemiology of *Phoma koolunga* (ascochyta blight of field pea) (Doctoral dissertation).
51. Kimura, M. (1980): A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16:1 11-120.
52. Kosiada, T. (2012): In vitro growth of some species of *Ascochyta* Lib. *Open Life Sciences*, 7(6): 1076-1083.
53. Kövics, G. J., Sándor, E., Rai, M. K., Irinyi, L. (2014): *Phoma*-like fungi on soybeans. *Critical reviews in microbiology*, 40(1): 49-62.
54. Kraft, J. M., Larsen, R. C., Inglis, D. A. (1998): Diseases of pea. *The Pathology of Food and Pasture Legumes*, 325-370.
55. Kraft, J.M., Pflieger, F.L. (2001): Compendium of pea diseases. American Pathological Society Press. St.Paul, Minnesota.
56. Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2016): MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7): 1870-1874.
57. Lawyer, A. S. (1984): Diseases caused by *Ascochyta* spp. In: D.J. Hagedorn (ed.), *Compendium of Pea Diseases*. The American Phytopathological Society, 11-15.
58. Le May, C., Chilvers, M. I., Saucereau, A. L., Guibert, M., Peever, T. L. (2018): Spatiotemporal distribution of *Ascochyta pinodes* and *Ascochyta pinodella* during the winter growing season in France. *Plant Pathology*.
59. Le May, C., Guibert, M., Baranger, A., Tivoli, B. (2014): A wide range of cultivated legume species act as alternative hosts for the pea aschochyta blight fungus, *Didymella pinodes*. *Plant pathology*, 63(4): 877-887.
60. Le May, C., Guibert, M., Leclerc, A., Andrivon, D., Tivoli, B. (2012): A single, plastic population of *Mycosphaerella pinodes* causes ascochyta blight on winter and spring peas (*Pisum sativum*) in France. *Applied and environmental microbiology*, 78(23): 8431-8440.
61. Leath, K. T., (1990): Spring black stem and leaf spot. In: *Compendium of Alfalfa Diseases* (second edition). (D.L. Stuteville, D.C. Erwin, ed.), The American Phytopathological Society, APS Press, St. Paul, MN, USA, 16–17.
62. Leslie, J.F., Summerell, B.A. (2006): *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA.

63. Li, Y. P., You, M. P., Finnegan, P. M., Khan, T. N., Lanoiselet, V., Eyres, N., Barbetti, M. J. (2012): First report of black spot caused by *Boeremia exigua* var. *exigua* on field pea in Australia. *Plant Disease*, 96(1): 148-148.
64. Li, Y. P., You, M. P., Khan, T. N., Finnegan, P. M., Barbetti, M. J. (2011): First report of *Phoma herbarum* on field pea (*Pisum sativum*) in Australia. *Plant disease*, 95(12): 1590-1590.
65. Libert, M. A. (1830): Mémoire concernant les plantes cryptogames qui peuvent être réunies sous le nom d' Ascoxytacei. *Mem. Soc. Sci. Agr. Lille 1829-1830 (1831)*:174-176.
66. Liener, I. E. (1982): Toxic constituents in legumes. In: Arora, S. K. (ed.) *Chemistry and biochemistry of legumes*, Oxford and IBH Publishing Co., New Delhi, 217-257.
67. Liu, N., Xu, S., Yao, X., Zhang, G., Mao, W., Hu, Q., Gong, Y. (2016): Studies on the Control of Ascochyta Blight in Field Peas (*Pisum sativum* L.) Caused by *Ascochyta pinodes* in Zhejiang Province, China. *Frontiers in microbiology*, 7: 481.
68. Marcinkowska, J., Klos, B., Shcherbakova, A. (1991): Ascochitine production by fungi responsible for Ascochyta diseases of pea. *Journal of Phytopathology*, 131: 253-258.
69. Marić, A. (1991): Opšta fitopatologija. Domentijan.
70. Marinković, N., Aleksić, D., Aleksić, Ž. (1981): Ispitivanje otpornosti nekih sorti i linija graška prema *Ascochyta pisi* Lib. *Zaštita bilja*, 150: 109-113.
71. McDonald, G. K., Peck, D. (2009): Effects of crop rotation, residue retention and sowing time on the incidence and survival of ascochyta blight and its effect on grain yield of field peas (*Pisum sativum* L.). *Field Crops Research*, 111(1-2): 11-21.
72. Mel'nik, V. A. (2000): Key to the fungi of the genus *Ascochyta* Lib.(Coelomycetes). Parey.
73. Mihailović, V., Mikić, A., Ćupina, B., Erić, P. (2005): Field pea and vetches in Serbia and Montenegro. *Grain Legumes*, 44: 25-26.
74. Mijatović, M., Obradović, A., Ivanović, M. (2007): Zaštita povrća od bolesti, štetočina i korova. Agromivas.
75. Morgan-Jones, G., Burch, K. B. (1987): Studies in the genus *Phoma*. VIII. Concerning *Phoma pinodella*. *Mycotaxon*, 29: 477-487.
76. Mułenko, W., Majewski, T., Ruskiewicz-Michalska, M. (2008): A preliminary checklist of micromycetes in Poland. W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences.

77. Nasir, M., Hoppe, H. H. (1997): Evaluation of varietal susceptibility in peas to *Mycosphaerella pinodes*. Test Agrochem Cv, 18: 32–33.
78. Noordeloos, M. E., De Gruyter, J., Van Eijk, G. W., Roeijmans, H. J. (1993): Production of dendritic crystals in pure cultures of *Phoma* and *Ascochyta* and its value as a taxonomic character relative to morphology, pathology and cultural characteristics. Mycological Research, 97(11): 1343-1350.
79. O'Donnell, K., Cigilink, E., Nirenberg, H. I. (1998): Molecular systematics and phylogeography of the *Giberella fujikuroi* species complex. Mycologia, 90: 465–493.
80. Onfroy, C., Tivoli, B., Corbiere, R., Bouznad, Z. (1999): Cultural, molecular and pathogenic variability of *Mycosphaerella pinodes* and *Phoma medicaginis* var. *pinodella* isolates from dried pea (*Pisum sativum*) in France. Plant Pathology, 48(2): 218-229.
81. Padder, B. A., Kapoor, V., Kaushal, R. P., Sharma, P. N. (2012): Identification and genetic diversity analysis of *Ascochyta* species associated with blight complex of pea in a northwestern hill state of India. Agricultural Research, 1(4): 325-337.
82. Pag, P. L. (1998): Diseases of Field Pea (*Pisum Sativum* L.) in the Peace River Region of Alberta.
83. Peever, T. L., Barve, M. P., Stone, L. J., Kaiser, W. J. (2007): Evolutionary relationships among *Ascochyta* species infecting wild and cultivated hosts in the legume tribes *Ciceraceae* and *Vicieae*. Mycologia, 99(1): 59-77.
84. Peregrine, W. T. H., Ahmad, K. B. (1982): Brunei: A first annotated list of plant diseases and associated organisms. Phytopatholog., 27: 1-87.
85. Peregrine, W. T. H., Kassim, B. A. (1982): Brunei: A first annotated list of plant diseases and associated organisms. Commonwealth Agricultural Bureaux.
86. Petrović, K., Riccioni, L., Valente, M. T., Đorđević, V., Živanov, D., Jevtić, R., Malidža, G. (2017): First Report of *Peyronellaea lethalis* Associated With *Ascochyta* Blight Complex of Field Pea in Serbia. Plant Disease, 101(8): 1551.
87. Poczai, P., Hyvönen, J. (2010): Nuclear ribosomal spacer regions in plant phylogenetics: problems and prospects. Molecular biology reports, 37(4): 1897-1912.
88. Porter, C. H., Collins, F. H. (1991): Species-diagnostic differences in the ribosomal DNA internal transcribed spacer from the sibling species *Anopheles freeborni* and *Anopheles hermsi* (Diptera: Culicidae). The American journal of tropical medicine and hygiene, 45(2): 271-279.

89. Punithalingham E, Holliday P. (1972a): *Mycosphaerella pinodes*. *CMI Descriptions of Fungi and Bacteria*, (34): 340.
90. Punithalingham, E., Gibson, I. A. S. (1976): *Phoma medicaginis* var. *pinodella*. *CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria*, (518): 1-2.
91. Punithalingham, E., Holliday, P. (1972b): *Ascochyta pisi*. *CMI descriptions of Pathogenic fungi and bacteria*, (334): 1-2.
92. Rappilly, F. (1968): *Les Techniques de Mycologie en Pathologie Végétale*. INRA, Paris.
93. Roger, A. J., Sandblom, O., Doolittle, W. F., Philippe, H. (1999): An evaluation of elongation factor 1 alpha as a phylogenetic marker for eukaryotes. *Molecular biology and evolution*, 16(2): 218-233.
94. Roger, C., Tivoli, B. (1996a): Spatio-temporal development of pycnidia and perithecia and dissemination of spores of *Mycosphaerella pinodes* on pea (*Pisum sativum*). *Plant Pathology*, 45(3): 518-528.
95. Roger, C., Tivoli, B. (1996b): Effect of culture medium, light and temperature on sexual and asexual reproduction of four strains of *Mycosphaerella pinodes*. *Mycological Research*, 3(100): 304-306.
96. Salam, M.U., Galloway, J., MacLeod, W.J., Davidson, J.A., Seymour, M., Pritchard, I., Salam, K.P., Diggle, A.J., Maling, T., (2011a): G1 Blackspot Manager model predicts the maturity and release of ascospores in relation to ascochyta blight on field pea. *Australasian Plant Pathology*, 40(6): 621–631.
97. Salam, M.U., MacLeod, W.J., Maling, T., Pritchard, I., Seymour, M., Barbetti, M.J. (2011b): A meta-analysis of severity and yield loss from ascochyta blight on field pea in Western Australia. *Australasian Plant Pathology*, 40(6): 591–600.
98. Santos, J. M., Correia, V. G., Phillips, A. J. L. (2010): Primers for mating-type diagnosis in *Diaporthe* and *Phomopsis*: their use in teleomorph induction in vitro and biological species definition. *Fungal Biology*, 114: 255-270.
99. Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Miller, A. N. (2012): Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16): 6241-6246.
100. Schoeny, A., Jumel, S., Rouault, F., Le May, C., Tivoli, B. (2007): Assessment of airborne primary inoculum availability and modelling of disease onset of ascochyta blight in field peas. *European journal of plant pathology*, 119(1): 87–97.

101. Schoeny, A., Jumel, S., Rouault, F., Lemarchand, E., Tivoli, B. (2010): Effect and underlying mechanisms of pea-cereal intercropping on the epidemic development of ascochyta blight. *European journal of plant pathology*, 126(3): 317-331.
102. Setti, B., Bencheikh, M., Henni, J., Neema, C. (2009): Effect of pea cultivar, pathogen isolate, inoculum concentration and leaf wetness duration on *Ascochyta* blight caused by *Mycosphaerella pinodes*. *Phytopathologia Mediterranea*, 47(3): 214-222.
103. Sivachandrakumar, N. T. (2016): Evaluation of the relative importance of *Ascochyta pisi* in the *Ascochyta* blight complex of pea in Saskatchewan (Doctoral dissertation).
104. Skoglund, L. G., Harveson, R. M., Chen, W., Dugan, F., Schwartz, H. F., Markell, S. G., Goswami, R. (2011): *Ascochyta* blight of peas. *Plant Health Prog*, 10.
105. Smith, I. M., Dunez, J., Lelliott, R. A., Phillips, D. H., Archer, S. A. (1988): *European handbook of plant diseases*. Blackwell Scientific Publications.
106. Somma, M. (2004): Extraction and purification of DNA. In M. Querci, M. Jermini, G. Van den Eede (ed.), *The analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms (Special Publication No. I.03.114) (Session 4, 13–17)*. European Commission DG-JRC.
107. Soyulu, S., Dervis, S. (2011): Determination of prevalence and incidence of fungal disease agents of pea (*Pisum sativum* L.) plants growing in Amik plain of Turkey. *Research on Crops*, 12(2): 588-592.
108. Stojanović, S. (2004): *Poljoprivredna fitopatologija*. Srpsko biološko društvo „Stevan Jakovljević”. Kragujevac.
109. Stojšin, V., Bagi, F., Balaž, F. (2008): *Mikoze i pseudomikoze ratarskih i povrtarskih biljaka (praktikum iz fitopatologije)*, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
110. Stone, R. E. (1915): "Life History of *Ascochyta* on Some Leguminous Plants. II." *Phytopathology*, 5: 4.
111. Tadjia, A. (2012): *Caractérisation et pathogénicité de *Ascochyta* sp. sur *pisum sativum**. Editions universitaires europeennes.
112. Tadjia, A. (2018): Morphological and Genotypic Characterization of Fungi Associated with the *Ascochyta* Blight Complex in Western Regions of Algeria. *European Scientific Journal*, ESJ, 14(9).
113. Tadjia, A., Benkada, M. Y., Rickauer, M., Bendahmane, B. S., Benkhelifa, M. (2009): Characterization of *Ascochyta* as pathological species of pea (*Pisum sativum* L.) at the north-west of Algeria. *Journal of Agronomy*, 8(3).

114. Tar'an, B., Warkentin, T., Somers, D.J., Miranda, D., Vandenburg, A., Blade, S., Woods, S., Bing, D., Xue, A., DeKoeper, D., Penner, G., (2003): Quantitative trait loci for lodging resistance, plant height and partial resistance to *Mycosphaerella* blight in field pea (*Pisum sativum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 107(8): 1482–1491.
115. Taylor, P. W., Ford, R. (2007): Diagnostics, genetic diversity and pathogenic variation of ascochyta blight of cool season food and feed legumes. *European Journal of Plant Pathology*, 119(1): 127-133.
116. Tegegn, A., Teshome, E. (2017): Grain Yield and Yield Components of Field Pea (*Pisum sativum* L.): As Influenced by Ascochyta Blight (*Mycosphaerella pinodes*) Disease in the Highlands of Bale, Oromia. *American Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences (ASRJETS)*, 35(1): 15-24.
117. Terbeche, R., Karkachi, N. E, Gharbi, S., Kihal, M., Henni, J. E. (2015): Isolation and physicochemical test studies of *Ascochyta pisi*. *International Journal of Biosciences*, 6(1): 9-19.
118. Tivoli, B., Banniza S (2007): Comparison of the epidemiology of ascochyta blights on grain legumes. *European Journal of Plant Pathology*, 119(1): 59-76.
119. Tivoli, B., Béasse, C., Lemarchand, E., Masson, E. (1996): Effect of ascochyta blight (*Mycosphaerella pinodes*) on yield components of single pea (*Pisum sativum*) plants under field conditions. *Annals of Applied Biology*, 129(2): 207-216.
120. Tivoli, B., Lemarchand, E., (1992): Fungal and bacterial foliar disease survey of combining pea in France in 1991. In: 1st European Conference on Grain Legumes, ITCF, Angers, France, 363–364.
121. Tran, H. S., You, M. P., Lanoiselet, V., Khan, T. N., Barbetti, M. J. (2014): First report of *Phoma glomerata* associated with the ascochyta blight complex on field pea (*Pisum sativum*) in Australia. *Plant Disease*, 98(3): 427-427.
122. Trinidad, T. P., Mallillin, A. C., Loyola, A. S., Sagum, R. S., Encabo, R. R. (2010): The potential health benefits of legumes as a good source of dietary fibre. *British Journal of Nutrition*, 103(4): 569-574.
123. Turo, C. J. (2016): Genomic Analysis of Fungal Species Causing Ascochyta Blight in Field Pea (Doctoral dissertation, Curtin University).
124. USDA (2016): United States Department of Agriculture Agricultural Research Service. National Nutrient Database for Standard Reference, Release 28 <https://www.usda.gov/> (pristupano 11.10.2017.).

125. USDA (2018): Fungal databases- Fungus-Host Distributions. <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/fungushost/fungushost.cfm> (pristupano 11.01.2018.).
126. Vad, K., de Neergaard, E., Madriz-Ordeñana, K., Mikkelsen, J. D., Collinge, D. B. (1993): Accumulation of defence-related transcripts and cloning of a chitinase mRNA from pea leaves (*Pisum sativum* L.) inoculated with *Ascochyta pisi* Lib. *Plant Science*, 92(1): 69-79.
127. Valenzuela-Lopez, N., Cano-Lira, J. F., Guarro, J., Sutton, D. A., Wiederhold, N., Crous, P. W., Stchigel, A. M. (2018): Coelomycetous Dothideomycetes with emphasis on the families Cucurbitariaceae and Didymellaceae. *Studies in mycology*, 90: 1-69.
128. Vilgalys, R. (1994): Phylogenetic implications of generic concepts in fungal taxonomy: the impact of molecular systematic studies. *Mycologia Helvetica*, 6: 73-91.
129. Wallen, V. R. (1974): Influence of three ascochyta diseases of peas on plant development and yield. *Canadian Plant Disease Survey*, 54(8): 86-90.
130. Wallen, V. R., Jeun, J. (1968): Factors limiting the survival of *Ascochyta* spp. of pea in soil. *Canadian Journal of Botany*, 46(10): 1279–1286.
131. Wallen, V. R., Wong, S. I., Jeun, J. (1967): Isolation, incidence, and virulence of *Ascochyta* spp. of peas from the soil. *Canadian Journal of Botany*, 45(12): 2243-2247.
132. Wang, H., Hwang, S. F., Chang, K. F., Turnbull, G. D., Howard, R. J. (2000): Characterization of *Ascochyta* isolates and susceptibility of pea cultivars to the ascochyta disease complex in Alberta. *Plant Pathology*, 49(5): 540-545.
133. Warkentin, T. D., Rashid, K. Y., Xue, A. G. (1996): Fungicidal control of ascochyta blight of field pea. *Canadian journal of plant science*, 76(1): 67-71.
134. Watanabe, T. (2010): Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species. CRC press.
135. Wheeler, W. C., Honeycutt, R. L. (1988): Paired sequence difference in ribosomal RNAs: evolutionary and phylogenetic implications. *Molecular Biology and Evolution*, 5(1): 90-96.
136. White, J. F., Morgan-Jones, G. (1987): Studies on the genus *Phoma*. VI. Concerning *Phoma medicaginis* var. *pinodella*. *Mycotaxon*, 28(1): 241-248.
137. White, T. J, Burns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990): Amplification and sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J, editors. *PCR protocols. A guide to methods and applications*. San Diego, Calif: Academic Press, 315–322.

138. Wilson, A. D., Kaiser, W. J. (1995): Cytology and genetics of sexual compatibility in *Didymella rabiei*. *Mycologia* 87(6): 795–804.
139. Woudenberg, J. H., De Gruyter, J., Crous, P. W., Zwiers, L. H. (2012): Analysis of the mating-type loci of co-occurring and phylogenetically related species of *Ascochyta* and *Phoma*. *Molecular plant pathology*, 13(4): 350-362.
140. Wroth, J. M. (1998): Possible role for wild genotypes of *Pisum* spp to enhance ascochyta blight resistance in pea. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 38:469–479.
141. Xue, A.G., Warkentin, T.D., Greeniaus, M.T., Zimmer, R.C. (1996): Genotypic variability in seed borne infection of field pea by *Mycosphaerella pinodes* and its relation to foliar disease severity. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 18(4): 370-374.
142. Zeven, A. C., Zhukovsky, P. M. (1975): Dictionary of cultivated plants and their centers of diversity. Center for Agricultural Publishing and Documentation.
143. Zhao, S., Shamoun, S. F. (2006): Effects of culture media, temperature, pH, and light on growth, sporulation, germination, and bioherbicidal efficacy of *Phoma exigua*, a potential biological control agent for salal (*Gaultheria shallon*). *Biocontrol science and technology*, 16(10): 1043-1055.
144. Živanov, D., Jevtić, R., Mikić, A., Karagić, Đ., Mihailović, V., Milošević, B., Maširević, S. (2013): The most important diseases in forage legumes in Serbia. Book of abstracts. First legume society conference 2013: A Legume odyssey, Novi Sad, 09-11.05.2013, 224-224.
145. Živanov, D., Jevtić, R., Tančić, S., Vasiljević, S., Maširević, S. (2014): Control of winter forage pea diseases by pea-oat intercropping under field conditions. *Pesticidi i fitomedicina*, 29(2): 131-136.

10. PRILOZI

Prilog 1

Sastav CTAB pufera za ekstrakciju i precipitaciju (1000 ml)

Reagens	CTAB pufer (ekstrakcija)	CTAB pufer (precipitacija)
CTAB	20 g (2%)	10 g (1%)
1 M Tris-HCl (pH 8,0)	100 ml	50 ml
0,5 M EDTA (pH 8,0)	40 ml	---
1,4 M NaCl	81,8 g	---

Prilog 2

Spisak objavljenih ITS sekvenci *Ascochyta* spp.*Didymella pinodes*

1. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K. (2017): *Didymella pinodes* isolate K4 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. GenBank: KY703844.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703844.1
2. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K. (2017): *Didymella pinodes* isolate K517 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703845.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703845.1
3. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K. (2017): *Didymella pinodes* isolate K515 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. GenBank: KY703846.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703846.1
4. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K. (2017): *Didymella pinodes* isolate K34 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. GenBank: KY703847.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703847.1
5. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K. (2017): *Didymella pinodes* isolate K36 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703848.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703848.1
6. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K. (2017): *Didymella pinodes* isolate K3 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. GenBank: KY703849.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703849.1
7. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K. (2017): *Didymella pinodes* isolate K390 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. GenBank: KY703850.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703850.1
8. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K. (2017): *Didymella pinodes* isolate K551 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703851.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703851.1
9. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K. (2017): *Didymella pinodes* isolate K498 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete

- sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703852.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703852.1
10. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Tancic-Zivanov, S. (2017): *Didymella pinodes* isolate K532 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703824.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703824.1
 11. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Tancic-Zivanov, S. (2017): *Didymella pinodes* isolate K544B small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703825.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703825.1
 12. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Tancic-Zivanov, S. (2017): *Didymella pinodes* isolate K511 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703826.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703826.1
 13. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Tancic-Zivanov, S. (2017): *Didymella pinodes* isolate K513 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703827.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703827.1
 14. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Tancic-Zivanov, S. (2017): *Didymella pinodes* isolate K547 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703828.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703828.1
 15. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Tancic-Zivanov, S. (2017): *Didymella pinodes* isolate K524 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703829.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703829.1
 16. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Tancic-Zivanov, S. (2017): *Didymella pinodes* isolate K43 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703830.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703830.1
 17. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Tancic-Zivanov, S. (2017): *Didymella pinodes* isolate K48 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703831.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703831.1

18. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Tancic-Zivanov, S. (2017): *Didymella pinodes* isolate K496 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703832.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703832.1
19. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Tancic-Zivanov, S. (2017): *Didymella pinodes* isolate K522 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703833.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703833.1
20. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Tancic-Zivanov, S. (2017): *Didymella pinodes* isolate K514 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703834.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703834.1
21. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Tancic-Zivanov, S. (2017): *Didymella pinodes* isolate K528 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703835.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703835.1
22. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Tancic-Zivanov, S. (2017): *Didymella pinodes* isolate K491 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703836.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703836.1
23. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Tancic-Zivanov, S. (2017): *Didymella pinodes* isolate K530 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703837.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703837.1
24. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Tancic-Zivanov, S. (2017): *Didymella pinodes* isolate K56 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703838.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703838.1
25. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Tancic-Zivanov, S. (2017): *Didymella pinodes* isolate K525 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703839.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703839.1
26. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Tancic-Zivanov, S. (2017): *Didymella pinodes* isolate K45 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal

- transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703840.1.
www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703840.1
27. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Tancic-Zivanov, S. (2017): *Didymella pinodes* isolate K527 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703841.1.
www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703841.1
28. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Tancic-Zivanov, S. (2017): *Didymella pinodes* isolate K52 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703842.1.
www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703842.1
29. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Tancic-Zivanov, S. (2017): *Didymella pinodes* isolate K497 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703843.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703843.1
30. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Karagic, Dj. (2017): *Didymella pinodes* isolate K540 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703804.1.
www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703804.1
31. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Karagic, Dj. (2017): *Didymella pinodes* isolate K549 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703805.1.
www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703805.1
32. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Karagic, Dj. (2017): *Didymella pinodes* isolate K521 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703806.1.
www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703806.1
33. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Karagic, Dj. (2017): *Didymella pinodes* isolate K379 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703807.1.
www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703807.1
34. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Karagic, Dj. (2017): *Didymella pinodes* isolate K2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703808.1.
www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703808.1

35. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Karagic, Dj. (2017): *Didymella pinodes* isolate K555 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703809.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703809.1
36. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Karagic, Dj. (2017): *Didymella pinodes* isolate K548 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703810.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703810.1
37. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Karagic, Dj. (2017): *Didymella pinodes* isolate K490 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703811.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703811.1
38. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Karagic, Dj. (2017): *Didymella pinodes* isolate K518 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703812.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703812.1
39. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Karagic, Dj. (2017): *Didymella pinodes* isolate K5 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703813.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703813.1
40. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Karagic, Dj. (2017): *Didymella pinodes* isolate K544A small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703814.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703814.1
41. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Karagic, Dj. (2017): *Didymella pinodes* isolate K516 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703815.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703815.1
42. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Karagic, Dj. (2017): *Didymella pinodes* isolate K492 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703816.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703816.1
43. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Karagic, Dj. (2017): *Didymella pinodes* isolate K512 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed

- spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703817.1
www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703817.1
44. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Karagic, Dj. (2017): *Didymella pinodes* isolate K509 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703818.1
www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703818.1
45. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Karagic, Dj. (2017): *Didymella pinodes* isolate K536 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703819.1
www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703819.1
46. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Karagic, Dj. (2017): *Didymella pinodes* isolate K44 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703820.1
www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703820.1
47. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Karagic, Dj. (2017): *Didymella pinodes* isolate K535 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703821.1
www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703821.1
48. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Karagic, Dj. (2017): *Didymella pinodes* isolate K546 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703822.1
www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703822.1
49. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Karagic, Dj. (2017): *Didymella pinodes* isolate K529 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703823.1
www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703823.1
50. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Karagic, Dj. (2017): *Didymella pinodes* isolate K469 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY660680.1
www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/1158626211
51. Zivanov, D., Nagl, N., Taski-Ajdukovic, K. (2018): *Didymella pinodes* isolate K182 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. GenBank: MG696895.1
www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MG696895.1

52. Zivanov, D., Nagl, N., Taski-Ajdukovic, K. (2018): *Didymella pinodes* isolate K184 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. GenBank: MG696896.1 www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MG696896.1

Didymella pinodella

53. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Vasiljevic, S., Djordjevic, V., Milosevic, B., Katanski, S. (2017): *Didymella pinodella* isolate K388 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703773.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703773.1
54. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Vasiljevic, S., Djordjevic, V., Milosevic, B., Katanski, S. (2017): *Didymella pinodella* isolate K63 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703774.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703774.1
55. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Vasiljevic, S., Djordjevic, V., Milosevic, B., Katanski, S. (2017): *Didymella pinodella* isolate K60 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703775.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703775.1
56. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K. (2018): *Didymella pinodella* isolate K171 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: MG655182.1 www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MG655182.1
57. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K. (2018): *Didymella pinodella* isolate K170 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: MG655183.1 www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MG655183.1

Ascochyta pisi

58. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Jevtic, R. (2017): *Ascochyta pisi* isolate K543 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703785.1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703785.1>
59. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Jevtic, R. (2017): *Ascochyta pisi* isolate K501 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703786.1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703786.1>

60. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Jevtic, R. (2017): *Ascochyta pisi* isolate K503 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703787.1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703787.1>
61. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Jevtic, R. (2017): *Ascochyta pisi* isolate K500 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703788.1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703788.1>
62. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Jevtic, R. (2017): *Ascochyta pisi* isolate K499 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703784.1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703784.1>
63. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Jevtic, R., Zupunski, V., Lalosevic, M. (2017): *Ascochyta pisi* isolate K541 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703779.1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703779.1>
64. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Jevtic, R., Zupunski, V., Lalosevic, M. (2017): *Ascochyta pisi* isolate K523 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703780.1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703780.1>
65. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Jevtic, R., Zupunski, V., Lalosevic, M. (2017): *Ascochyta pisi* isolate K550 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703781.1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703781.1>
66. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Jevtic, R., Zupunski, V., Lalosevic, M. (2017): *Ascochyta pisi* isolate K22 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703782.1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/1191947246>
67. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Jevtic, R., Zupunski, V., Lalosevic, M. (2017): *Ascochyta pisi* isolate K531 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703783.1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703783.1>

68. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Mikic, A., Ignjatov, M., Savic, A., Petrovic, G. (2017): *Ascochyta pisi* isolate K505 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703776.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703776.1
69. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Mikic, A., Ignjatov, M., Savic, A., Petrovic, G. (2017): *Ascochyta pisi* isolate K507 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703777.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703777.1
70. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Mikic, A., Ignjatov, M., Savic, A., Petrovic, G. (2017): *Ascochyta pisi* isolate K504 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703778.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703778.1
71. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Stojsin, V. (2017): *Ascochyta pisi* isolate K21 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703789.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703789.1
72. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Stojsin, V. (2017): *Ascochyta pisi* isolate K502 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703790.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703790.1
73. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Stojsin, V. (2017): *Ascochyta pisi* isolate K169 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. GenBank: KY703791.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703791.1
74. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Stojsin, V. (2017): *Ascochyta pisi* isolate K1 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. GenBank: KY703792.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703792.1
75. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Stojsin, V. (2017): *Ascochyta pisi* isolate K542 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703793.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703793.1
76. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Stojsin, V. (2017): *Ascochyta pisi* isolate K508 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2,

- partial sequence. GenBank: KY703794.1.
www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703794.1
77. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Stojsin, V. (2017): *Ascochyta pisi* isolate K538 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703795.1.
www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703795.1
78. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Stojsin, V. (2017): *Ascochyta pisi* isolate K545 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703796.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703796.1
79. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Stojsin, V. (2017): *Ascochyta pisi* isolate K526 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703797.1.
www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703797.1
80. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Stojsin, V. (2017): *Ascochyta pisi* isolate K537 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703798.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703798.1
81. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Stojsin, V. (2017): *Ascochyta pisi* isolate K168 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. GenBank: KY703799.1.
www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703799.1
82. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Stojsin, V. (2017): *Ascochyta pisi* isolate K506 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703800.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703800.1
83. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Stojsin, V. (2017): *Ascochyta pisi* isolate K554 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703801.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703801.1
84. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Stojsin, V. (2017): *Ascochyta pisi* isolate K489 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: KY703802.1. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703802.1
85. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K., Stojsin, V. (2017): *Ascochyta pisi* isolate K533 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. GenBank: KY703803.1
www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY703803.1

86. Nagl, N., Zivanov, D. (2018): *Ascochyta pisi* isolate K186 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: MG696897.1 www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MG696897.1
87. Nagl, N., Zivanov, D. (2018): *Ascochyta pisi* isolate K190 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence. GenBank: MG696898.1 www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MG696898.1

Spisak objavljenih TEF- α sekvenci *Ascochyta* spp.

Didymella pinodella

1. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K. (2018): *Didymella pinodella* isolate K60 translation elongation factor 1-alpha gene, partial cds. GenBank: MG460310.1 www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MG460310.1
2. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K. (2018): *Didymella pinodella* isolate K388 translation elongation factor 1-alpha gene, partial cds. GenBank: MG460311.1 www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MG460311.1
3. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K. (2018): *Didymella pinodella* isolate K63 translation elongation factor 1-alpha gene, partial cds. GenBank: MG460312.1 www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MG460312.1

Ascochyta pisi

4. Nagl, N., Zivanov, D., Taski-Ajdukovic, K. (2018): *Ascochyta pisi* isolate K504 translation elongation factor 1-alpha gene, partial cds. GenBank: MF974609.1 www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MF974609.1

BIOGRAFIJA

Dipl. inž.- master Dalibor Živanov je rođen 12.07.1987. godine u Nišu. Osnovnu školu „Sever Đurkić“ završio je u Bečeju, a srednju poljoprivrednu školu „Poljoprivredna škola sa domom učenika - Futog“, u Futogu.

Poljoprivredni fakultet u Novom Sadu, smer Fitomedicina, upisao je školske 2006/2007. Diplomirao je 14.09.2010. sa prosečnom ocenom 8,88. Diplomski rad pod nazivom „Pojava prouzrokovala bele truleži (*Sclerotinia sclerotiorum*) (Lib.) De Bary i volovoda (*Orobanche cumana* Wallr.) na suncokretu u 2009. godini“ odbranio je sa ocenom 10.

Akadske master studije na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu, studijski program – Fitomedicina, modul – Fitopatologija, upisao je školske 2010/2011. Master studije je završio sa prosečnom ocenom 9,86. Master rad pod naslovom „Otpornost nekih genotipova suncokreta prema volovodu (*Orobanche cumana* Wallr.)“ odbranio je 11.06.2012. ocenom 10.

U Institutu za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu, zaposlen je od aprila 2012., kao istraživač na poslovima fitopatologije u Odeljenju za krmno bilje.

Tokom 2012. godine, učestvovao je na projektu „Monitoring pojave genetski modifikovanog kukuruza u AP Vojvodini“ (2012, broj 114-451-2355/2012-01), finansiran od strane Pokrajinskog sekretarijata za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

Trenutno je angažovan na projektu Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, TR-31024 pod nazivom „Povećanje tržišnog značaja krmnih biljaka oplemenjivanjem i optimizacijom tehnologije proizvodnje semena“.

Trenutno je angažovan i na projektu EUCLEG u okviru H2020 projekta.

Bio angažovan i na 2 evropska projekta pod nazivom LEGATO (LEGumes for the Agriculture of Tomorrow) u okviru FP7 projekta, i na IPA projektu pod nazivom PEASMAKERS.

Bio je uključen u rad i organizaciju međunarodnog skupa Društva za mahunarke, „First Legume Society Conference“ kao član Sekretarijata, koja se održala u Novom Sadu od 9. do 11. maja 2013. godine.

Član je Društva: zaštite bilja Srbije, Američkog fitopatološkog društva i Međunarodnog društva za mahunarke.

Autor i koautor je više naučnih radova. Registrovan je u Pokrajinskom sekretarijatu za nauku pod brojem naučnog kartona APVNT 4203

Govori engleski jezik.