

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

mr Danijela T. Ristić

**KARAKTERIZACIJA VRSTA RODA *Fusarium*
PATOGENA SIRKA [*Sorghum bicolor* (L.)
Moench] U SRBIJI I UTVRĐIVANJE
OSETLJIVOSTI GENOTIPOVA**

doktorska disertacija

Beograd, 2012.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE

Danijela T. Ristić, MsC

**CHARACTERIZATION OF *Fusarium* SPECIES
PATHOGEN FOR SORGHUM [*Sorghum bicolor*
(L.) Moench] IN SERBIA AND GENOTYPE
SUSCEPTIBILITY**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

Komisija za ocenu i odbranu:

Mentor: dr Aleksandra Bulajić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu–Poljoprivredni fakultet

Članovi komisije: dr Mirko Ivanović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu–Poljoprivredni fakultet

dr Janoš Berenji, naučni savetnik
Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad

dr Branka Krstić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu–Poljoprivredni fakultet

dr Jelena Lević, naučni savetnik
Institut za kukuruz „Zemun Polje“, Beograd

Datum odbrane: _____

Posebnu zahvalnost želim da izrazim svom mentoru, dr Aleksandri Bulajić, vanr. prof. koja mi je pružila neizmernu podršku, znanje i iskustvo, ne samo u izradi doktorske disertacije, već uopšte u naučnom radu.

Zbog velikodušne mudrosti i neprocenjive pomoći i podrške veliku zahvalnost dugujem dr Branki Krstić, red. prof.

Zahvaljujem i dr Janošu Berenjiju, naučnom savetniku na pomoći i korisnim savetima tokom realizacije eksperimentalnog dela i završne verzije teksta.

Posebnu zahvalnost dugujem dr Mirku Ivanoviću, red. prof. i dr Jeleni Lević, naučnom savetniku na korisnim savetima i sugestijama koji su doprineli poboljšanju kvaliteta završne verzije teksta.

Zahvalnost dugujem mr Dragosavu Mutavdžiću, istraživaču saradniku za pruženu pomoć pri obradi statističkih podataka.

Takođe, želim da izrazim svoju zahvalnost dr Ivani Stanković, doc., Ani Vučurović, dipl. inž., Katarini Milojević, dipl. inž., Dušanu Nikoliću, dipl. inž. i Dragani Đurić, teh. saradniku zbog njihove podrške i pomoći koju su pružili mom istraživanju i stvaranju ove disertacije.

Beskrajno sam zahvalna svojoj porodici, koja je uvek uz mene i čija ljubav i podrška ne znaju za granice.

KARAKTERIZACIJA VRSTA RODA *Fusarium* PATOGENA SIRKA [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] U SRBIJI I UTVRĐIVANJE OSETLJIVOSTI GENOTIPOVA

Rezime. Tokom trogodišnjeg perioda od 2009. do 2011. godine, pregledom četiri lokaliteta gajenja sirka u Vojvodini, zabeležena je pojava intenzivnih simptoma truleži korena i stabla. Intenzitet zaraze useva sirka, bio je veoma visok, a sušenje i brzo propadanje zaraženih biljaka rezultiralo je procenjenim gubicima od preko 90%. Sa ciljem da se dobije uvid u prisustvo vrsta roda *Fusarium* i tako rasvetli etiologija oboljenja u Srbiji, obavljena je identifikacija na osnovu proučavanja morfoloških svojstava i molekularne karakterizacije izolata dobijenih iz zaraženih biljaka u polju i semena. Na osnovu obavljenih istraživanja ustanovljeno je da odabrani izolati pripadaju vrstama roda *Fusarium*: *F. equiseti*, *F. proliferatum*, *F. graminearum* i *F. thapsinum*, kao i vrsti *Epicoccum nigrum*.

Proučavana svojstva ispitivanih izolata analizirana su kao mogući taksonomski kriterijum za razlikovanje vrsta roda *Fusarium* i preporučuje se korišćenje najmanje dva taksonomska kriterijuma i to morfoloških svojstava i molekularne karakterizacije.

Analize nukleotidnih sekvenci pet genomnih regiona, DNK iz ITS regiona, gena koji kodiraju elongacioni faktor TEF-1 α , β -tubulin i calmodulin, kao i mitohondrijalne male podjedinice ribozomske DNK, pokazale su različite potencijale za preciznije razdvajanje vrsta roda *Fusarium*. Rekonstrukcijom filogenetskih stabala dat je doprinos u rasvetljavanju evolutivne međupovezanosti različitih vrsta, kao i izolata u okviru jedne vrste i pružilo je uvid u prisustvo i rasprostranjenost vrsta *Fusarium* u našoj zemlji.

Ispitivanja u okviru ove disertacije ukazala su na postojanje različitih vidova osetljivosti komercijalnih sorti i oplemenjivačkog materijala *in vitro* i u poljskim ogledima u uslovima prirodne zaraze i veštačke inokulacije sa prevalentnim vrstama *F. equiseti* i *F. proliferatum*. Dobijeni rezultati dalje će se koristiti u programima oplemenjivanja gajenog sirka na otpornost.

Ključne reči: gajeni sirak, fuzariozna trulež, taksonomski kriterijumi, osetljivost genotipova

Naučna oblast: Biotehničke nauke

Uža naučna oblast: Fitopatologija

UDK: 632.95:633.17(043.3)

CHARACTERIZATION OF *Fusarium* SPECIES PATHOGEN FOR SORGHUM [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] IN SERBIA AND GENOTYPE SUSCEPTIBILITY

Abstract. Intensive symptoms of root and stem rot of sorghum were recorded in four sorghum growing localities in the province of Vojvodina, during a three year investigation period from 2009 to 2011. Estimated loss of inspected crops was over 90%, because of drying and deterioration of infected sorghum plants in highly infected crops. In order to get better insight into the presence of *Fusarium* species and to clarify etiology of the disease in Serbia, the identification was carried out based on the study of morphological properties and molecular characterization of isolates originating from infected plants in the field and seeds. On the basis of the investigations it was found that the selected isolates belong to the species of the genus *Fusarium*: *F. equiseti*, *F. proliferatum*, *F. graminearum* and *F. thapsinum*, as well as, to the species *Epicoccum nigrum*.

Studied properties of selected isolates were analyzed as a possible taxonomic criterion for distinguishing species of the genus *Fusarium*. Utilization of at least two taxonomic criteria in particular/as follows morphological properties and molecular characterization are recommended.

Nucleotide sequences analysis of five genomic regions of DNA from the ITS region, genes encoding elongation factor TEF-1 α , β -tubulin and calmodulin, as well as, the mitochondrial small subunit ribosomal DNA showed different potentials for delineation of *Fusarium* species. Contribution in clarifying evolutionary interlinkage/interconnections of different species, and strains within a species was given by reconstruction of phylogenetic trees which provided insight into the presence and distribution of *Fusarium* species in our country.

The existence of various forms of susceptibility of commercial varieties and breeding materials were revealed, both *in vitro* and in field experiments, to natural infection and artificial inoculation with *F. equiseti* and *F. proliferatum*. Results obtained in this study will contribute in the deployment of sorghum breeding programs for resistance to these important pathogens.

Keywords: cultivated sorghum, fusarios rot, taxonomic criteria, genotype susceptibility

Scientific field: Biotechnical Science

Scientific discipline: Phytopathology

UDC: 632.95:633.17(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. Privredni značaj i botanička klasifikacija gajenog sirka.....	3
2.2. Najznačajnije agronomske forme gajenog sirka.....	5
2.3. Bolesti gajenog sirka u svetu.....	7
2.4. Bolesti gajenog sirka u Srbiji.....	11
2.5. Gljive roda <i>Fusarium</i> i njihov značaj.....	12
2.5.1. Značajne vrste roda <i>Fusarium</i> opisane na gajenom sirku u svetu.....	13
2.5.2. Značajne vrste roda <i>Fusarium</i> opisane na gajenom sirku u Srbiji.....	14
2.6. Klasifikacija i taksonomija roda <i>Fusarium</i>	16
2.7. Najznačajnije <i>Fusarium</i> vrste kao patogeni gajenog sirka.....	20
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	27
4. MATERIJAL I METOD RADA	28
4.1. Sakupljanje uzoraka obolelih biljaka.....	28
4.2. Izolacija patogena.....	28
4.3. Dobijanje čistih kultura monosporijalnih izolata i njihovo čuvanje.....	29
4.4. Provera patogenosti i izbor izolata za dalja ispitivanja.....	30
4.5. Morfološka svojstva anamorfa.....	32
4.6. Morfološka svojstva teleomorfa (peritecija).....	34
4.7. Molekularna detekcija i identifikacija.....	34
4.7.1. Ekstrakcija DNK.....	35
4.7.2. Lančana reakcija polimeraze (PCR).....	38
4.7.3. Vizuelizacija i analiza produkata PCR reakcija.....	40
4.7.4. Prečišćavanje PCR produkta i sekvencioniranje.....	41
4.7.5. Molekularna identifikacija i karakterizacija.....	42
4.8. Ocenjivanje nivoa osetljivosti različitih genotipova sirka prema <i>Fusarium</i> spp.....	44
4.8.1. Ocenjivanje nivoa osetljivosti klijanaca sirka prema <i>Fusarium</i> spp. u uslovima staklenika.....	44
4.8.2. Ocenjivanje nivoa osetljivosti stabla sirka prema <i>Fusarium</i> spp. u poljskim uslovima.....	45

5. REZULTATI	50
5.1. Simptomi bolesti na biljkama u polju.....	50
5.2. Izolacija patogena i dobijanje monosporijalnih izolata.....	52
5.3. Izolati odabrani za dalja proučavanja.....	53
5.4. Provera patogenosti.....	55
5.5. Morfološka svojstva anamorfa.....	57
5.6. Morfološka svojstva teleomorfa (peritecija).....	68
5.7. Molekularna detekcija gljiva.....	69
5.7.1. Molekularna identifikacija vrsta detektovanih na sirku.....	74
5.7.2. Molekularna karakterizacija <i>Fusarium</i> spp.....	86
5.8. Osetljivost različitih genotipova sirka prema <i>Fusarium</i> spp.....	102
5.8.1. Osetljivost klijanaca sirka prema <i>Fusarium</i> spp. u uslovima staklenika.....	102
5.8.2. Osetljivost stabla sirka prema <i>Fusarium</i> spp. u poljskim uslovima.....	106
6. DISKUSIJA	127
6.1. Simptomi bolesti na biljkama u polju.....	127
6.2. Test patogenosti.....	129
6.3. Morfološka svojstva anamorfa i teleomorfa.....	130
6.4. Molekularna detekcija i identifikacija.....	132
6.5. Molekularna karakterizacija <i>Fusarium</i> spp.....	140
6.6. Ocenjivanje nivoa osetljivosti različitih genotipova sirka.....	145
7. ZAKLJUČAK	153
8. LITERATURA	157
BIOGRAFIJA	
PRILOG	
IZJAVE	

1. UVOD

Sirak (*Sorghum bicolor* (L.) Moench.) spada među najstarije gajene biljke. Po površinama i značaju četvrto je gajeno žito u svetu, odmah posle pirinča, pšenice i kukuruza (**Islam**, 2009). Različiti načini upotrebe zrna, zelene mase ili njihove kombinacije za ljudsku i stočnu ishranu, industriju i specifične namene, ukazuju na to da gajeni sirak ima veliku perspektivu kod nas i očekuje se da površine pod ovom značajnom gajenom vrstom nastave da rastu (**Sikora i Berenji**, 2005).

Više vrsta roda *Fusarium* patogene su za gajeni sirak u svetu i imaju sposobnost da potpuno unište potencijalno visokoprinosne useve najčešće nekoliko nedelja pre žetve, prouzrokujući ekonomske gubitke usled smanjenja tehnološkog kvaliteta semena i prinosa (**Chelkowski**, 1998; **Brennan et al.**, 2005). Zaraze stabla ili korena mogu da smanje prinos i kvalitet zrna, dok poleganje može značajno da oteža ili čak onemogućiti žetvu. Agroekološki uslovi u Srbiji pogoduju pojavi toksikogenih vrsta roda *Fusarium* kao patogena brojnih gajenih biljaka, u širim razmerama i ukupno je do sada identifikovano 63 vrste, 35 varijeteta i 19 specijalizovanih formi osnovnih vrsta (**Lević i sar.**, 2009). Mada su vrste roda *Fusarium* na različitim kulturama dosta proučavane, o kompleksu vrsta patogenih za gajeni sirak u Srbiji ima malo podataka, naročito o njihovoj varijabilnosti i patogenosti.

Ispitivanja u okviru ove doktorske disertacije obuhvatila su utvrđivanje prisustva fitopatogenih gljiva iz roda *Fusarium* na biljkama u polju kao i na semenu, u nekoliko lokaliteta gajenja sirka; njihovu izolaciju iz biljnih delova sa simptomima bolesti i iz komercijalnog semena i semena sakupljenog sa zaraženih biljaka; proveru patogenosti na klijancima odgajenim u zaštićenom prostoru, kao i ispitivanje morfoloških svojstava izolata poreklom iz Srbije i njihovo poređenje sa referentnim izolatima vrsta poreklom iz Australije.

Analize sekvenci više odgovarajućih delova genoma nuklearne i mitohondrijalne DNK pokazale su različite potencijale za preciznije razdvajanje vrsta roda *Fusarium*, u cilju njihove identifikacije. Uspešna primena protokola za molekularnu identifikaciju vrsta kompleksa *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Wollenw., *F. graminearum* Schwabe i *F. equiseti* (Corda) Sacc. na osnovu sekvenci TEF gena koji kodira translacioni faktor izduživanja 1-alfa, gena za β -tubulin i calmodulin predstavljaju početak i osnovu

proučavanja filogeografske distribucije ovih značajnih vrsta u Srbiji. Dobijeni rezultati predstavljaju uvod u bližu genetičku karakterizaciju, i služe za brzo i lako razlikovanje ovih vrsta od morfološki sličnih vrsta iz *G. fujikuroi*, *F. graminearum* i *F. equiseti* kompleksa. Sekvencioniranje većeg broja izolata, uključivanje dodatnih delova genoma, njihovo poređenje i određivanje njihovog međudnosa i odnosa sa drugim izolatima u svetu doprinose poznavanju strukture populacije vrsta *G. fujikuroi*, *F. graminearum* i *F. equiseti* kompleksa iz čega jedino i može da proizađe uspešna strategija kontrole ovih veoma štetnih patogena.

Tokom dve uzastopne godine ispitivana je osetljivost različitih genotipova komercijalnih sorti i oplemenjivačkog materijala gajenog sirka u kontrolisanim uslovima, u stakleniku na klijancima i u polju u uslovima veštačke inokulacije i prirodne zaraze, uz primenu odgovarajuće statističke obrade dobijenih rezultata. Rezultati ovih ispitivanja ukazali su na različit stepen osetljivosti komercijalnih sorti i oplemenjivačkog materijala gajenog sirka prema prevalentnim *Fusarium* spp. Ovi rezultati mogu se dalje koristiti u programima oplemenjivanja gajenog sirka na otpornost prema ovim patogenima, a samim tim dobijeni su realni podaci o potencijalu genofonda gajenog sirka u agroekološkim uslovima Srbije.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Privredni značaj i botanička klasifikacija gajenog sirka

Sirak (*Sorghum bicolor* L. Moench) spada među najstarije gajene biljne vrste. Potiče iz centralne Afrike gde se uzgaja preko 5 000 godina. Odatle je trgovačkim putevima dalje prenet u Indiju i Kinu, što je bio ključni faktor kasnije prirodne međuvrsne hibridizacije između afričkih i azijskih sirkova (**Rooney and Smith, 2000**). Region rasprostranjenosti gajenih sirkova nalazi se od ekvatora do 45° severne, odnosno 35° južne geografske širine, što se podudara sa trajanjem toplog letnjeg perioda, perioda bez mrazeva, približno 125 dana (**Dogget, 1982**; loc. cit. **Sikora, 2005**). Poreklo specijalne forme gajenog sirka, sirka metlaša vezuje se za region Mediterana (**Ball, 1910**; loc. cit. **Dahlberg et al., 2011a**). Ova forma sirka se iz Italije, počev od XVI veka širila u Španiju, Francusku i Podunavske zemlje, Austro-Ugarsku i Nemačku. Smatra se da je u Panonsku niziju stigla polovinom XVII veka (**Sávoly, 1921**; loc. cit. **Dahlberg et al., 2011a**).

Danas je sirak jedna od najznačajnijih prosolikih žita, a po površinama i značaju zauzima četvrto mesto u svetu, posle pirinča, pšenice i kukuruza (**Islam, 2009**). Oko 500 miliona ljudi u preko 30 zemalja smeštenih u semiaridnim tropskim oblastima Azije i Afrike koriste sirak kao osnovnu namirnicu u ishrani (**Gassem, 1999**; **Dahlberg et al., 2011a**). U 2009. godini 82% proizvodnih useva sirka nalazilo se u Africi i Aziji. Prosečan prinos na Afričkom kontinentu iznosio je 904 kg/ha, dok je u Aziji nešto viši i iznosio je 1 096 kg/ha. Iste godine je gajeni sirak u SAD-u posejan na 2,2 miliona ha, a u Evropi na 151 526 ha, a ostvaren prosečan prinos zrna, pojedinačno posmatrano, bio je 4 355 odnosno 4 451 kg/ha (**FAO, 2011**). Sirak šećerac i sudanska trava pokazuju tendenciju porasta prinosa, a prosečan prinos useva krmnog sirka u Nebraski (SAD) dostigao je 23 t/ha za poslednjih 10 godina (**USDA, 2011**). U literaturi postoje podaci koji ukazuju da prinosi biomase mogu biti veći i od 35 t/ha (**Worker and Marble, 1968**).

Privredni značaj sirka proizilazi pre svega iz njegove višestruke upotrebe. Zrno služi za ishranu krupne stoke i živine (u razvijenim područjima sveta), ali i kao ljudska hrana u najvećem delu Afrike i delovima Indije i Kine. Zelena masa koristi se za ishranu stoke u svežem stanju i kao silaža, a pri blagovremenom košenju može da se koristi kao

seno. Silaža od sirka je nešto manje hranljive vrednosti od kukuruzne silaže. Zrno sirka je visokokvalitetna stočna hrana čijom se preradom dobija skrob, glukoza, gluten, alkohol i drugi proizvodi (**Sikora i Berenji**, 2005). Po hemijskom sastavu slično je zrnu kukuruza koje sadrži 72–76% skroba, 8–12% proteina, 3,2% masti, 1,5% sirove celuloze i 1,6% mineralnih materija (**Čobić i sar.**, 1987; **Bačvanski i sar.**, 1988). Od stabla sirka šećerca dobija se šećerni sirup koji sadrži 13–17% saharoze. Metlice sirka metlaša su osnovna sirovina u metlarstvu, za proizvodnju sirkovih metli (**Sikora i Berenji**, 2010). Velika prednost sirka je da se ovakva vrsta proizvodnje može uspešno organizovati i u uslovima postrne setve (**Kunc i sar.**, 1991).

Gajeni sirak je jedinstven među mnogim usevima koji se koriste kao sirovinska baza za obnovljive izvore energije i može se koristiti u različitim procesima proizvodnje biogoriva (skrob za etanol, šećer za etanol i celuloza za biogas). **Dahlberg et al.** (2011a) objavili su istraživanje o agronomskoj proceni sirka za biomasu, pri čemu je zabeleženo da sirak kao krmna biljka može da postigne visok prinos biomase kroz duži niz godina. Teoretski, može se koristiti i za proizvodnju etanola sa prosečnim prinosom od 6 146 l/ha obnovljivih izvora energije. Sa najboljim hibridima može se postići prinos od 8 422 l/ha. Ova otkrića i raznolikost gajenog sirka kao sirovine za obnovljive izvore energije predstavljaju veliki potencijal za Evropu koja nastoji da formira strategiju primene alternativnih izvora bioenergije (**Dahlberg et al.**, 2011b). Slični rezultati su dobijeni i u našim uslovima (**Kišgeci et al.**, 1983; 1988; **Berenji**, 1994).

Botanička klasifikacija. Sirak je monokotiledona, jednogodišnja zeljasta biljka reda Glumiflorae, porodice Poaceae, podporodice Andropogon, rod *Sorghum*. Ovaj rod prvi je opisao još **Linnaeus** 1753. godine pod imenom *Holcus*. Naziv *Sorghum* potiče od **Adansona** (1763), a od roda *Holcus* odvojio ga je **Moench** (1774), (loc. cit. **Sikora**, 2005). Bez obzira što se sirak gaji od davnina, u poljoprivredi do sada nema jedinstvene naučne klasifikacije ovog polimorfnog roda, koji ima više od 34 vrste. Klasifikacija gajenog sirka otežana je ne samo zbog njegovog polimorfizma, već i zbog velike geografske rasprostranjenosti.

De Wet i Huckabay (1967) i **de Wet** (1978) su unutar podroda *Sorghum* izdvojili tri vrste i to dve tetraploidne ($2n=40$) višegodišnje vrste *Sorghum halepense* i *Sorghum propinquum* i jednu diploidnu vrstu ($2n=20$) *Sorghum bicolor*, koja obuhvata

jednogodišnje divlje, korovske i sve gajene sirkove. Ovakva klasifikacija pored morfoloških veliku pažnju poklanja i genetskim svojstvima pojedinih taksona. Prema sistematizaciji koja se koristi danas, botanička pripadnost gajenog sirka je sledeća: porodica trava (familia Poaceae), rod sirak (genus *Sorghum*), vrsta (species) *bicolor* (**Dahlberg, 2000**).

Po agronomskoj klasifikaciji zasnovanoj na načinu gajenja i upotrebe, vrsta *S. bicolor* deli se na takozvane agronomске forme (**Berenji and Dahlberg, 2004**):

- sirak za zrno (*S. vulgare* var. *frumentaceum*);
- sirak metlaš (raniji naziv: tehnički sirak) (*S. vulgare technicum*);
- sirak šećerac ili silažni sirak (*S. vulgare* var. *saccharatum*);
- sudanska trava (*S. vulgare* var. *sudanensis*).

Po agronomskoj podeli gajenih formi sirka, baziranoj na načinu korišćenja, sirak metlaš ubraja se u industrijsko bilje, a ostali gajeni sirkovi među krmno bilje (**Berenji i Mijavec, 1992**).

2.2. Najznačajnije agronomске forme gajenog sirka

Sirak za zrno. Sirak za zrno spada među vodeće kulture u svetu, a i u našim uslovima sve više poprima na značaju, zato što je gajenje sirka za zrno moguće i tamo gde proizvodnja kukuruza nije ekonomična. Različiti načini upotrebe zrna, zelene mase ili njihove kombinacije za ljudsku i stočnu ishranu, industriju i specifične namene, kao i prisutni uslovi potrebni za gajenje, ukazuju na to da sirak za zrno ima značajnu perspektivu i u Srbiji (**Sikora i Berenji, 2005**). Mesto sirka za zrno u ratarskoj proizvodnji određeno je tolerantnošću prema nepovoljnim uslovima spoljne sredine (marginalna zemljišta, suša, viske temperature). Ova tolerantnost je kod sirka izražena više u poređenju sa kukuruzom (**Berenji, 1996; Starčević i Berenji, 1994**). Proizvodnja sirka za zrno pruža mogućnost za ublažavanje štetnih posledica suše u ratarstvu (**Berenji i sar., 2004**) i na tome se najvećim delom i zasniva perspektiva proizvodnje sirka za zrno kod nas (**Berenji i Sikora, 2004**).

Sirak za zrno se po površinama ubraja među pet najznačajnijih ratarskih biljaka u svetu (**FAO, 2004**). Najveće površine pod sirkom za zrno nalaze se u Africi, a najveći prinosi zrna postižu se u Evropi (3 614 kg/ha) i Severnoj Americi (3 751 kg/ha). U

našim agroekološkim uslovima, u sortnim ogledima, postižu se veoma visoki prinosi zrna (preko 10 000 kg/ha), mada su u praksi prinosi nešto niži (**Sikora i Berenji**, 2005).

Privredni značaj sirka za zrno proizilazi iz hemijskog sastava zrna, koji je sličan drugim žitima (sirovi proteini 12,54%; sirova mast 3,48%; sirova vlakna 2,48%; pepeo 1,55%; skrob 81,65%; svarljivi sirovi proteini 99,95 g/ha). Zrno sirka sadrži više proteina, a manje skroba u odnosu na zrno kukuruza. Energetska vrednost i sadržaj svarljivih proteina ukazuju da je zrno sirka izuzetno energetska zrnasto hranivo (**Clark et al.**, 1980; **Berenji i Kunc**, 1995).

Sirak metlaš. Sirak metlaš je industrijska biljka koja se prvenstveno gaji radi metlice sastavljene od dugačkih elastičnih peteljki na čijim se vrhovima nalazi seme. Tokom žetve metlice se sa drškom, koju predstavlja terminalnu internodiju stabla, ručno odsecaju od ostatka stabla. Nakon sušenja neovršenih metlica seme se vrši vršilicom, a ovršene metlice, nakon odsecanja drške daju sirkovu slamu koja služi kao sirovina za proizvodnju sirkovih metli (**Berenji and Kišgeci**, 1996). Finalni proizvod, sirkova metla je u pravom smislu reči biorazgradivi, ekološki artikal, koji se u potpunosti uklapa u moderne trendove upotrebe prirodnih sirovina umesto veštačkih (**Berenji**, 2008).

U Jugoistočnoj Evropi sirak metlaš čini deo specijalizovanog tržišta prirodnih, biorazgradivih metli izrađenih od metlica sirka (**Berenji et al.**, 2011). Više od 90% ukupne proizvodnje sirkovih metli se izvozi na zapadnoevropsko tržište. Stoga su gajenje sirka metlaša i metlarstvo od velikog značaja sa stanovišta izvoza i ostvarivanja finansijske dobiti (**Sikora i Berenji**, 2011). U svetskim razmerama se najveće površine pod sirkom metlašem kao i najobimnija proizvodnja sirkovih metli nalazi u Evropi, gde u tom pogledu pored Mađarske, Rumunije, Turske i Ukrajine, Srbija zauzima značajno mesto (**Berenji and Dahlberg**, 2004). Po površinama na kojima se sirak metlaš gaji, Srbija se ubraja među vodeće proizvođače ove biljke u Evropi pa i u svetu. Zahvaljujući sigurnom plasmanu i povoljnostima u pogledu gajenja ove biljke, proizvodnja sirka metlaša je relativno stabilna i ekonomična. Na ovim činjenicama se zasniva opravdanost gajenja sirka metlaša i njegovog unapređivanja putem oplemenjivanja (**Berenji i Sikora**, 2006).

Tokom prvih 35 godina rada na programu oplemenjivanja sirka metlaša u Institutu za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu formirana je kolekcija od preko 400

genotipova poreklom iz celog sveta (Sikora, 2005; Sikora, 2006; Sikora and Berenji, 2006). Pored starih i sada gajenih domaćih sorti u kolekciji su zastupljene i strane sorte, lokalne populacije i linije proizišle iz različitih programa oplemenjivanja. Pošto se radi o relativno malom programu u okviru koga fizički nije bilo moguće uključanje kompletne kolekcije, iz nje je formirano jezgro od 157 genotipova koji se koriste u ukrštanjima radi rekombinacije svojstava i povećanja varijabilnosti (Berenji, 1996; Sikora and Berenji, 2006; Sikora i Berenji, 2007; Berenji et al., 1987).

2.3. Bolesti gajenog sirka u svetu

Gajeni sirak se među žitima ističe neobično velikim brojem bolesti. Zbog široke upotrebe i različitih prirodnih uslova u kojima se gaji, stalno je pod negativnim uticajem biotskih i abiotskih činioca. U oblastima gde se tradicionalno gaji, sirak je osetljiv prema velikom broju prouzrokovala različitih bolesti koji uglavnom pripadaju gljivama, virusima, bakterijama i fitoplazmama (Frederiksen and Odvody, 2000).

Tabela 1. Bolesti gajenog srka koje u svetu prouzrokuju gljive*

R.br.	Ime bolesti/Simptomi	Patogen/Patogeni
1.	Siva pegavost lista	<i>Exserohilum turcicum</i> (Pass.) K. J. Leonard & E. G. Suggs; <i>Drechslera turcica</i> (Pass.) Subramanian & P. C. Jain); <i>Cercospora sorghi</i> Ellis & Everh.; <i>C. fusimaculans</i> Atk.
2.	Ovalna pegavost lista	<i>Ramulispora sorghicola</i> E. Harris
3.	Zonirana lisna pegavost	<i>Gloeocercospora sorghi</i> (Bain & Edgerton)
4.	Lezije na listu	<i>Phoma insidiosa</i> Tassi; <i>Phyllosticta sorghiphila</i> Saccas; <i>Hadrotrichum sorghi</i> (Pass.) Ferraris & Massa; <i>Septoria pertusa</i> Heald & F.A. Wolf; <i>Leptosphaeria</i> sp., <i>Ascochyta sorghi</i> Sacc.; <i>Coniothyrium sorghi</i> Saccas; <i>Botryodiplodia sorghi</i> Henn.
5.	Bolest epidermisa lista	<i>Rhizoctonia</i> sp.; <i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc.; <i>Ophiobolus</i> spp.
6.	Čađava prugavost lista	<i>Ramulispora sorghi</i> (Ellis & Everh.) L. S. Olive & Lefebvre
7.	„Gruba“ pegavost	<i>Ascochyta sorghina</i> Sacc. i <i>A. sorghi</i> Sacc.
8.	Antraknoza	<i>Colletotrichum graminicola</i> (Ces.) Wilson; <i>C. gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc.
9.	Trulež korena	<i>Pythium arrhenomanes</i> Drechsler; <i>P. graminicola</i> Subram.; <i>P. myriotylum</i> Drechs.; <i>P. periplocum</i> Drechs.;

- | | | |
|-----|-----------------------------------|---|
| 10. | Trulež korena i stabla | <i>Fusarium equiseti</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. verticillioides</i> (Sacc.) Nirenb.; <i>F. napiforme</i> Marasas, Rabie, Lubber, Nelson, Toussoun & Van Wyk; <i>F. nygamai</i> Burgess & Trimboli; <i>F. oxysporum</i> Schlecht.; <i>F. proliferatum</i> (Matsushima) Nirenberg; <i>F. semitectum</i> Berk. & Rav.; <i>F. solani</i> (Martius) Appel & Wollenweber emend. Snyder & Hansen; <i>F. subglutinans</i> (Wollenw. and Reinking) Nelson, Toussoun and Marasas; <i>F. thapsinum</i> Klittich, Leslie, Nelson & Marasas; <i>F. tricinctum</i> (Corda) Saccardo |
| 11. | Ugljenasta trulež korena i stabla | <i>Macrophomina phaseolina</i> (Tassi) G. Goidanich |
| 12. | Plesnivost zrna | <i>Alternaria alternata</i> (Fries) Keissler, Beih; <i>Aspergillus flavus</i> van Tieghem; <i>A. fumigatus</i> Fresenius; <i>A. niger</i> Link; <i>Cladosporium</i> sp., <i>C. graminicola</i> ; <i>Curvularia lunata</i> (Wakk.) Boedijn; <i>Epicoccum nigrum</i> Link; <i>F. semitectum</i> ; <i>F. thapsinum</i> ; <i>F. verticillioides</i> ; <i>F. oxysporum</i> ; <i>Drechslera tetramera</i> (McKinney) Subram. & B.L. Jain; <i>Phoma sorghina</i> (Sacc.) Boerema, Dorenbosch & van Kesteren; <i>Nigrospora</i> sp.; <i>Aspergillus</i> sp.; <i>Penicillium</i> spp.; <i>Rhizopus</i> sp.; <i>Claviceps</i> |
| 13. | Pokrivena gar | <i>Sporisorium sorghi</i> Link in Willd. |
| 14. | Prašna gar | <i>Sporisorium reilianum</i> (Kühn) Langdon & Fullerton; <i>Sporisorium cruentum</i> (Kühn) K. Vánky |
| 15. | „Dugačka“ gar | <i>Sporisorium ehrenbergii</i> Vánky |
| 16. | Rđe | <i>Puccinia purpurea</i> Cooke; <i>P. prunicolor</i> Sydow; <i>P. jaagii</i> Boedijn; <i>P. cesatii</i> J. Schröt.; <i>Uredo geniculata</i> Cummins |
| 17. | Plamenjača | <i>Sclerophthora macrospora</i> (Sacc.) Thirum., C.G. Shaw & Naras.; <i>Peronosclerospora sorghi</i> (Weston & Uppal) C.G. Shaw.; <i>Sclerospora graminicola</i> (Sacc.) Schroet. |
| 18. | Glavnica | <i>Claviceps sorghi</i> B.G.P. Kulk., Seshadri & Hegde; <i>C. africana</i> Freder., Mantle & De Milliano; <i>C. sorghicola</i> |

*Podaci prema: **Mughogho and Pande**, 1983; **Frederiksen**, 1986; **Ivanović i Ivanović**, 2001; **Tsukiboshi et al.**, 1999; **Bogo and Mantle**, 1999; **Pažoutová and Bogo**, 2001; **Johnson and Rajasab**, 2003; **Fakhrunnisa and Ghaffar**, 2006; **Gwary et al.**, 2006; **Muthusubramanian et al.**, 2006; **Tooley et al.**, 2006; **Johnson et al.**, 2008; **Yassin et al.**, 2010

Prisustvo različitih patogenih gljiva na semenu sirka, koje je posljednjih godina sve češće utvrđeno, može biti značajno sa stanovišta smanjenja prinosa i kvaliteta zrna, u pogledu kontaminacije štetnim mikotoksinima, a takođe može dovesti i do indirektnih gubitaka smanjujući klijavost i energiju klijanja semena (**Dawson and Bateman**, 2001;

Singh and Navi, 2001; Erpelding and Prom, 2006). Više fitopatogenih gljiva koje se prenose semenom kao što su *A. alternata*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *Cladosporium* sp., *C. sublineolum*, *Curvularia* spp., *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, *F. pallidoroseum*, *D. tetramera*, *Nigrospora* sp., *Penicillium* spp., *Phoma* sp. i *Rhizopus* sp. često su izolovane sa zrna sirka (**Fakhrunnisa and Ghaffar, 2006; Gwary et al., 2006**). Kao patogen semena sirka opisana je i visoko varijabilna vrsta *E. nigrum* (syn. *E. purpurascens* Ehrenb. ex Schlecht.) (**Yassin et al., 2010**). Prouzrokovaoče plesnivosti zrna čine gljive iz oko 40 rodova, među kojima su najznačajnije *F. thapsinum*, *F. semitectum*, *C. lunata*, *C. graminicola*, *A. alternata* i *P. sorghina* (**Frederiksen and Odvody, 2000**). Plesan ili trulež zrna sirka u skladištu prouzrokuju najčešće gljive iz roda *Aspergillus* i *Penicillium* koje opstaju u zrnu sa relativno niskom vlažnošću. Među potencijalne prouzrokovaoče plesni svrstavaju se i vrste rodova *Alternaria*, *Claviceps* i *Fusarium* koje biosintetišu mikotoksine i mogu značajno smanjiti kvalitet zrna ili ga potpuno uništiti (**Frederiksen and Odvody, 2000**).

Siva pegavost lista predstavlja jednu od najznačajnijih bolesti lista gajenog sirka koju prouzrokuju *E. turcicum* i *C. sorghi* koja je često udružena sa *C. fusimaculans*, prouzrokovaočem uzdužne pegavosti lista. Mnoge druge gljive mogu prouzrokovati razvoj pege na listu sirka, kao što su: *P. insidiosa*, *P. sorghiphila*, *H. sorghi*, *S. pertusa*, *Leptosphaeria* sp., *A. sorghi*, *C. sorghi*, *B. sorghi*. Mali broj ovih patogena ima ekonomski značaj, ali treba ih razmatrati kao potencijalno opasne i štetne (**Frederiksen and Odvody, 2000**).

Vrste roda *Fusarium* parazitiraju gajeni sirak od klijanja semena do žetve, prouzrokujući trulež zrna, klijanaca, korena i stabla. Fuzariozna trulež korena i stabla gajenog sirka, koja utiče na prevremeno sazrevanje i poleganje biljaka, može prouzrokovati štete i do 100% (**Frederiksen and Odvody, 2000**). *Fusarium* spp. koje naseljavaju tkivo korena i stabla gajenog sirka obuhvataju: *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. moniliforme*, *F. napiforme*, *F. nygamai*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. semitectum*, *F. solani*, *F. subglutinans*, *F. thapsinum*, *F. tricinctum* i druge.

Ugljenastu trulež korena i stabla sirka prouzrokuje gljiva *M. phaseolina* (syn. *M. phaseoli* (Maubl.) S. Ashby) koja se javlja u uslovima tropske klime (**Mughogho and Pande, 1983; Frederiksen, 1986**). Polifagne vrste, uglavnom u područjima sa umerenom klimom, *P. arrhenomanes* i *P. graminicola* značajni su prouzrokovaoči truleži

korena sirka. Dokazano je prisustvo i drugih manje značajnih vrsta roda *Pythium*: *P. myriotylum* i *P. periplocum*. Gljive *Rhizoctonia* spp., *Sclerotium rolfsii*, *Ophiobolus* spp. i *G. sorghi* manjeg su ekonomskog značaja, a njihovo prisustvo ograničeno je na tropske oblasti, u kojima prouzrokuju primarne štete na epidermisu lista sirka (**Frederiksen and Odvody, 2000**).

Glavnica sirka je važna i preteća bolest koja prouzrokuje znatne gubitke na globalnom nivou (**Frederickson et al., 1991; Bandyopadhyay et al., 1998; loc. cit. Tooley et al., 2010**). Za ovu bolest odgovorne su tri različite vrste iz roda *Claviceps*: *C. sorghi*, *C. africana* ustanovljene u Indiji i Africi (**Bogo and Mantle, 1999; Pažoutová and Bogo, 2001; Johnson and Rajasab, 2003; Muthusubramanian et al., 2006; Tooley et al., 2006; Johnson et al., 2008**) i *C. sorghicola*, koja je opisana samo u Japanu (**Tsukiboshi et al., 1999**).

Prouzrokovači rđe sirka *P. purpurea* i *P. prunicolor* rasprostranjeni su u celom svetu u područjima gajenja sirka, pri čemu smanjuju kvalitet i kvantitet prinosa. Takođe, druge gljive rđa, *P. jaagii*, *P. cesatii* i *U. geniculata* napadaju i zaražavaju gajeni sirak međutim, štete koje one nanose su neznatne (**Frederiksen and Odvody, 2000**).

Plamenjaču („ludi vrh“) gajenog sirka prouzrokuje *S. macrospora*, pri čemu nastaju veoma značajne štete, koje dovode i do potpunog uništenja prinosa (**Frederiksen and Odvody, 2000**). Gar klasa i metlice sirka ili tzv. prašna gar tipična je bolest generativnih organa gajenog sirka koju prouzrokuje *S. reilianum*. Pokrivena gar sirka predstavlja ekonomski značajnu bolest, a prouzrokovač je *S. sorghi*, dok je prouzrokovač otkrivene gari *S. cruentum* manje rasprostranjen (**Frederiksen and Odvody, 2000**).

Viroze gajenog sirka rasprostranjene su širom sveta i prouzrokuju značajne ekonomske štete u epidemijskim razmerama na svim kontinentima (**Frederiksen, 1982; Toler, 1985; Toler and Giorda, 1992; Ivanović i Berenji, 1996**). Prema **Doggett (1988)** dosad je opisano 17 virusa koji mogu prouzrokovati oboljenja na gajenom sirku. Među njima su najznačajniji virusi iz familije *Potyviriidae* i to: *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV), *Sugar cane mosaic virus* (SCMV), *Sorghum mosaic virus* (SrMV) i *Johnsongrass mosaic virus* (JgMV) (**Frederiksen and Odvody, 2000**). Štete usled zaraza sirka sa virusima iz roda *Potyvirus* su brojne i značajne jer utiču na smanjenje prinosa (30–100%) i visine zaraženih biljaka (do 50%).

Gajeni sirak je osnovni prirodni domaćin virusa iz roda *Furovirus* i to: *Sorghum chlorotic spot virus* (SgCSV) i *Peanut clump* (PCV). Predstavnici familije *Rhabdoviridae* koji zaražavaju žita u SAD, a takođe i gajeni sirak, čine relativno veliki kompleks virusa koji uključuje *Maize mosaic virus* (MMV), *Wheat American striate mosaic virus* (WASMV), *Oat striate mosaic virus* (OSMV) i *Sorghum stunt mosaic virus* (SSMV). Tri predstavnika familije *Reoviridae*, roda *Fijivirus* infektivni su za gajeni sirak i to *Maize rough dwarf virus* (MRDV), *Mal de Rio Cuarto virus* (MRCV) i *Fiji disease virus* (FDV), mada njihova učestalost i štetnost u svetu nije rasvetljena. *Maize streak virus* (MSV) održava se u sirku ukoliko se gaji blizu kukuruza koji je osnovni domaćin (**Frederiksen and Odvody, 2000**). Pored pomenutih virusa sirka vrlo su značajni i *Barley yellow dwarf virus* (BYDV), *Panicum mosaic virus* (PMV) i *Brome mosaic virus* (BMV) zbog njihove rasprostranjenosti i potencijalne štetnosti (**Frederiksen and Odvody, 2000**).

Fitopatogene bakterije takođe na gajenom sirku u pojedinim područjima prouzrokuju ekonomski značajne štetne bolesti. Prouzrokovač bakterijske crtičavosti sirka *Xanthomonas campestris* pv. *holcicola* (Elliott) Dye jedna je od najštetnijih bakterioza gajenog sirka. Bakterijsku crtičavost i prugavost lišća prouzrokuje *Acidovorax avenae* subs. *avenae* Manns, pegavost lišća *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall, a kržljivost, vlažnu trulež i uvelost biljaka prouzrokuje *Erwinia chrysanthemi* Burkholder, McFadden & Dimock. (**Frederiksen and Odvody, 2000**).

Jedina opisana fitoplazmoza na šećernom sirku je *Yellow Sorghum Stunt* (YSS) (**Frederiksen and Odvody, 2000**).

2.4. Bolesti gajenog sirka u Srbiji

Patogeni gajenog sirka u našoj zemlji malo su proučavani. Među fitopatogenim gljivama ističu se varijeteti vrste *F. roseum* Link (*F. roseum* var. *culmorum*, *F. roseum* var. *avenaceum* i *F. roseum* var. *scirpi-acuminatum*), prouzrokovači pega na korenu, stablu, lisnom rukavcu, listu, metlici i znu gajenog sirka (**Martinović, 1969**). „Crnu trulež“ stabla gajenog sirka prouzrokuje *C. graminicola*, pri čemu nastaju značajne štete koje dovode do smanjenja prinosa i lomljenja stabla (**Vilmoš, 1991**). U nas je *M. phaseolina* posebno značajna kao patogen gajenog sirka, koji prouzrokuje ugljenastu trulež korena i stabla (**Ivanović i Ivanović, 2001**). Gar sirka čiji je prouzrokovač

Sphacelotheca sorghi (Link.) Clint u našoj zemlji ne predstavlja ekonomski značajnu bolest, iz razloga što se sirak gaji na manjim površinama. Bolest snižava kvalitet sirka šećerca, zatim krmnog sirka, ali i sirka metlaša, pošto se dobija loš kvalitet metlica (**Ivanović i Ivanović**, 2001). Trulež stabla gajenog sirka prouzrokuju *F. verticillioides*, *F. subglutinans* i *F. graminearum* (**Balaž i sar.**, 1996; **Balaž et al.**, 1997). Iz semena sirka u Srbiji izolovane su i mnoge vrste roda *Fusarium*, i to *F. equiseti*, *F. langsethiae*, *F. proliferatum*, *F. semitectum*, *F. solani*, *F. sporotrichioides*, *F. thapsinum* i *F. verticillioides*, zatim vrste roda *Alternaria*, *Aspergillus*, *Mucor* i *Penicillium*. U proseku, značajno manji intenzitet pojave je utvrđen za vrste *Cladosporium* spp., *Epicoccum* spp., *Gonatobotrys* spp. i *Rhizopus* spp. (**Lević i sar.**, 2008).

Virus mozaične kržljivosti kukuruza (*Maize mosaic virus*, MMV), virus mozaika šećerne trske (*Sugar cane mosaic virus*, SCMV), virus mozaika divljeg sirka (*Johnsongrass mosaic virus*, JgMV) i virus mozaika sirka (*Sorghum mosaic virus*, SrMV), detektovani su kao prouzrokovači viroza gajenog sirka u Vojvodini (**Mijavec et al.**, 1991; **Berenji et al.**, 1993; **Ivanović i Berenji**, 1996; **Bagi i sar.**, 2004; **Bagi**, 2006).

Bakterioznu pegavost lišća prouzrokuje *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (**Panić and Arsenijević**, 1966).

U Institutu za ratarstvo i povrtarstvo Novi Sad koncipiran je program oplemenjivanja sirka metlaša na otpornost prema prevalentnim bolestima ove kulture (**Berenji**, 2000).

2.5. Gljive roda *Fusarium* i njihov značaj

Vrste roda *Fusarium* prisutne su u svim delovima sveta, pojedine vrste su kosmopoliti, druge preovlađuju u tropskim i subtropskim regionima ili u umerenom klimatu ili su ograničene u specifičnim oblastima i združene sa određenim zajednicama biljaka (**Burgess et al.**, 1994). Vitalnost održavaju u različitim supstratima, a izolovane su iz većitog leda na Arktiku, peska u Africi (**Booth**, 1971; **Kommedahl et al.**, 1988; **Burgess et al.**, 1994; **Sangalang et al.**, 1995), konzervisane hrane, uskladištenih hemikalija, avionskog goriva (**Booth**, 1971), kao i iz maltera građevina starih preko 100 godina (**Kwasa**, 1997; loc. cit. **Lević**, 2008).

Vrste roda *Fusarium* poznate su kao patogeni brojnih biljnih vrsta, nešto manje infektivne i manje proučene kao patogeni ljudi i znatno manje kao patogeni životinja.

Konidije vrsta roda *Fusarium* široko su rasprostranjene u spoljašnjoj sredini i čovek je svakodnevno i na svakom mestu u kontaktu s njima (**Zapater and Arrechea, 1975; Lieberman et al., 1979**).

Sekundarni metaboliti koje stvaraju ove vrste gljiva mogu da prouzrokuju poremećaje metabolizma domaćih životinja sa smrtnim ishodom, a zbog svog kancerogenog dejstva sve veću opasnost predstavljaju i za zdravlje ljudi (**Marasas, 2000**). **Vesonder and Golinski (1989)** navode različite grupe metabolita, hormone, pigmente, mikotoksine, antibiotike, fitotoksine, steroide i različite derivate ovih metabolita koji prouzrokuju fiziološke reakcije u biljkama, bakterijama i algama, a takođe u telu životinja i ljudi. Dokazano je da od 61 identifikovane vrste roda *Fusarium*, njih 35 stvara ukupno 137 mikotoksina, od kojih 79 pripada grupi trihotecena (**De Nijs et al., 1997**). Sa stanovišta etiologije mikotoksikoza ljudi i životinja, od značaja su tri grupe mikotoksina zearalenoni, trihoteceni i fumonizini, koje sintetišu najtoksigenije vrste *F. sporotrichioides* Sherb., *F. graminearum* i *F. verticillioides* (syn. *F. moniliforme*) (**Marasas, 2000**). Brojne bolesti ljudi i životinja nastaju kao posledica konzumiranja plesnive hrane, posebno žita. Toksičnost kukuruza kontaminiranog sa *F. verticillioides* poznata je još od sredine XIX veka i značajna je u etiologiji bolesti konja, poznate kao konjska leukoencefalomalacija (**Gelderblom et al., 1988**).

Rod *Fusarium* zauzima značajno mesto u literaturi posvećenoj gljivama, ali i pored toga postoji relativno malo saznanja o primarnim štetama koje vrste ovog roda nanose pojedinim gajenim biljkama. U literaturi se više navodi učestalost pojave parazita, a manje intenzitet bolesti, više se ukazuje na morfološka svojstva i brojnost vrsta, a manje na njihovu patogenost i obim prouzrokovanih šteta. U brojnim publikacijama najčešće se navodi da je više vrsta roda *Fusarium* združeno u etiologiji bolesti, posebno tipa truleži, kao i da je intenzivnija pojava bolesti biljaka koje su pod stresom (**Lević, 2008**).

2.5.1. Značajne vrste roda *Fusarium* opisane na gajenom sirku u svetu

Više vrsta roda *Fusarium* patogene su za gajeni sirak u svetu i imaju sposobnost da potpuno unište potencijalno visokoprinosne useve najčešće nekoliko nedelja pre žetve, prouzrokujući ekonomske gubitke usled smanjenja tehnološkog kvaliteta semena i prinosa (**Chelkowski, 1998; Brennan et al., 2005**). Zaraze stabla ili korena mogu da

smanje prinos i kvalitet zrna, dok poleganje može značajno da oteža ili čak onemogućiti žetvu. Uslovi spoljašnje sredine često dovode do stresa biljke, pri čemu se povećava osetljivost sirka prema bolestima, kao što su trulež korena i stabla (**Burgess et al.**, 1981; **Ryley et al.**, 2002). U Australiji *F. verticillioides* se javlja kao glavni prouzrokovatelj truleži korena i osnove stabla, a povremeno i paleži klasa (**Trimboli and Burgess**, 1983; **Trimboli and Burgess**, 1985; **Ryley et al.**, 2002; loc. cit. **Petrović et al.**, 2009). Međutim nedavna istraživanja polne kompatibilnosti i molekularna karakterizacija pokazuju da ova vrsta nije najrasprostranjeniji prouzrokovatelj, već se javlja najmanje šest vrsta, od kojih je nekoliko morfološki veoma slično (**Leslie and Marasas**, 2002). Istraživanja uglavnom ukazuju na još jednu vrstu *F. thapsinum*, mada su verovatno pored nje prisutne i *F. andiyazi* Marasas et al., *F. nygamai*, *F. proliferatum* i *F. verticillioides* (**Leslie and Marasas**, 2002). Nedavno je *F. andiyazi* opisan kao prouzrokovatelj bolesti gajenog sirka u Africi i Severnoj Americi (**Marasas et al.**, 2001). Međutim, podaci o učestalosti i rasprostranjenosti ove vrste u svetu su malobrojni.

Poznato je da klimatski uslovi utiču na geografsku rasprostranjenost, raznovrsnost i učestalost izolata *Fusarium* vrsta na biljkama i u zemljištu (**Burgess et al.**, 1988; **Burgess and Summerell**, 1992; **Backhouse et al.**, 2001; **Backhouse and Burgess**, 2002). Takođe, klima utiče i na ulogu *Fusarium* vrsta u etiologiji pojedinih bolesti (**Backhouse and Burgess**, 2002; **Pettitt et al.**, 2003; **Waalwijk et al.**, 2003; **Backhouse et al.**, 2004) i na biosintezu mikotoksina u zaraženim biljkama (**Logrieco et al.**, 2002).

2.5.2. Značajne vrste roda *Fusarium* opisane na gajenom sirku u Srbiji

Prva pojava vrsta roda *Fusarium* na teritoriji Srbije zapažena je u vidu teleomorfa (*Gibberella pulicaris* Fries Sacc., *Nectria episphaeria* Tode, *Gibberella saubinetii* Mont. Sacc.) krajem XIX veka, a početkom XX veka uočen je i njihov stadijum anamorfa (*F. roseum* Link) na ostacima kukuruzovine (**Ranojević**, 1914; loc.cit. **Lević i sar.**, 2008). Njihova sve veća rasprostranjenost i štetnost ispoljena tokom druge polovine XX veka uslovljena je gajenjem visokorodnih hibrida kukuruza i sorti pšenice koji su zahtevali intezivniju primenu agrotehničkih mera i drugih savremenih mera gajenja. U Srbiji vrste roda *Fusarium* identifikovane su kao patogeni

ratarskih, povrtarskih, šumskih, ukrasnih i korovskih biljaka, ali i kao paraziti gljiva, parazitnih cvetnica i insekata (Lević, 2008).

Agroekološki uslovi u Srbiji pogoduju pojavi patogenih i toksigenih vrsta roda *Fusarium* u širim razmerama, koje u pojedinim godinama mogu prouzrokovati značajno smanjenje prinosa i povećanu kontaminaciju zrna kukuruza i pšenice mikotoksinima (Lević i sar., 2004; Stanković i sar., 2006). Ukupno je do sada identifikovano 63 vrste, 35 varijeteta i 19 specijalizovanih formi osnovnih vrsta, posebno vrste *F. oxysporum* (4 var. i 12 f. sp.) i *F. solani* (7 var. i 3 f. sp.). *F. langsethiae* Torp & Nirenberg i *F. thapsinum* su novoidentifikovane vrste izolovane sa zrna pšenice, odnosno sirka. Fuzarioze industrijskih biljaka malo su proučavane u Srbiji. Prisustvo vrsta roda *Fusarium* na semenu industrijskih biljaka, koje je poslednjih godina sve češće utvrđeno, ukazuje da ove patogene gljive u Srbiji mogu biti značajne sa stanovišta smanjenja prinosa i kvaliteta zrna, posebno u pogledu kontaminiranosti mikotoksinima (Lević, 2008).

U Srbiji su vrste roda *Fusarium* izolovane sa preko 100 biljnih vrsta, a sa ekonomskog aspekta, bile su i ostale najznačajnije kao prouzrokovani truleži zrna kukuruza i pšenice (Lević, 2008). Od ovih vrsta *F. graminearum* je najznačajnija patogena vrsta, koja prouzrokuje trulež korena, stabla i klipa kukuruza. Vrste iz sekcije *Liseola*, kao što su *F. verticillioides*, *F. subglutinans* i *F. proliferatum* značajni su patogeni kukuruza i sirka, mada je poslednjih godina utvrđena sve češća pojava ovih vrsta na zrnu pšenice i ječma (Lević i sar., 2009; Tančić, 2009; loc. cit. Tančić i sar., 2009). U Srbiji je period jun–oktobar najkritičniji za očuvanje kvaliteta uskladištenog kukuruza, jer su brojnost i učestalost toksigenih vrsta roda *Fusarium* u tom periodu najveće (43,5–62,5%) (Lević i sar., 2009). Tokom skladištenja kukuruza *F. graminearum* je u najvećem procentu (5,0–11,0%) prisutna u periodu jun–septembar, *F. verticillioides* u periodu februar–oktobar (22,0–39,5%), a *F. subglutinans* od aprila do oktobra (8,0–12,5%) (Krnjaja i sar., 2007).

Pojava fuzarioza sirka u Srbiji prvi put je zabeležena 1959. godine u okolini Beograda, a potom 1967. i 1968. godine u Vrbasu i Obrenovcu. Tri varijeteta vrste *F. roseum* Link identifikovana su kao prouzrokovani bolesti gajenog sirka: *F. roseum* var. *culmorum*, *F. roseum* var. *avenaceum* i *F. roseum* var. *scirpi-acuminatum* (Martinović, 1969). Ovi patogeni varijeteti prouzrokovali su pojavu pega na korenu, stablu, lisnom

rukavcu, listu, metlici i zrnju gajenog sirka (**Martinović**, 1969). Sva tri varijeteta *F. roseum* ispoljila su patogena svojstva prema drugim biljkama domaćinima, pšenici i kukuruzu.

Proučavajući osetljivost sirka metlaša prema vrstama roda *Fusarium*, **Balaž i sar.** (1996) ustanovili su da trulež stabla sirka najčešće prouzrokuje *F. verticillioides*, a potom i vrste *F. subglutinans* i *F. graminearum*.

Paraziti semena sirka u našoj zemlji su malo proučavani, ali se može pretpostaviti na osnovu literaturnih podataka (**McGee**, 1988) da su slični kao i na semenu kukuruza (**Lević i sar.**, 2003). Zajedničko za seme kukuruza i sirka jeste da su za obe gajene vrste najznačajniji patogeni gljive iz roda *Fusarium*, i to često iste vrste. Razlike mogu da postoje u specijalizaciji sojeva koji mogu biti virulentni prema sirku ali ne i prema kukuruzu, kao što je primer vrsta *F. moniliforme*, za koju je utvrđeno da neki sojevi poreklom iz kukuruza pripadaju vrsti *F. verticillioides* (*F. moniliforme*), a drugi iz sirka vrsti *F. thapsinum*. *F. moniliforme* prouzrokuje trulež embriona i suhu trulež semena sirka, bolest klijanaca pre i posle nicanja, drške i rahisa. Infekcija sirka ostvaruje se nekoliko dana posle metličanja, a razvoju pogoduju visoke temperature i vlažniji uslovi u periodu metličanja i voštane zrelosti, što rezultira 65% zaraženosti semena (**Lević i sar.**, 2003). Iz semena sirka u Srbiji izolovane su i druge vrste roda *Fusarium*, i to *F. equiseti* (1,3%), *F. proliferatum* (1,3–8,8%), *F. semitectum* (1,3%), *F. solani* (2,5%), *F. sporotrichioides* (1,3%), *F. subglutinans* (1,3–2,5%), *F. thapsinum* (1,3–11,3%) i *F. verticillioides* (1,3–7,5%), (**Lević et al.**, 2006; **Lević i sar.**, 2008).

2.6. Klasifikacija i taksonomija roda *Fusarium*

Rod *Fusarium* ispoljava visok stepen biodiverziteta, odnosno varijabilnosti u pogledu morfoloških, fizioloških i ekoloških svojstava, što predstavlja poteškoću pri stvaranju stabilne i široko prihvatljive taksonomije ovih vrsta (**Burgess et al.**, 1997; **Summerell et al.**, 2003). Klasifikacija vrsta u određene podgrupe još uvek je nepotpuno rešena i zato je neophodno stvoriti pouzdan i jedinstven sistem koji će određivanje vrste kombinovati na morfološkom, biološkom i filogenetskom nivou (**Leslie et al.**, 2001).

Taksonomija roda *Fusarium* prošla je kroz niz promena tokom poslednjih 100 godina. Iako je još od XIX veka za vrste roda *Fusarium* poznat dvostruki modalitet razmnožavanja, istorija taksonomije anamorfa mnogo je bogatija nego istorija

taksonomije teleomorfa za koji se može reći da nije proučavan sve do pred kraj XX veka. Rod *Fusarium* je heterogen, obuhvata veoma različite vrste u pogledu njihovih morfoloških svojstava i taj broj varira od 9 do 78 (Nelson, 1991). Klasični taksonomski sistemi bazirani su na morfološkim svojstvima kao što su oblik i veličina makrokonidija, prisustvo ili odsustvo mikrokonidija i hlamidospora, kao i struktura konidiofora (Windels, 1992).

Mnogi pokušaji učinjeni su da se stvori jedinstveni postupak za identifikaciju vrsta roda *Fusarium*. Svi dosadašnji pristupi identifikaciji vrsta zasnovani na morfološkim svojstvima, imaju svojih prednosti, ali i nedostatke. Kao rezultat različitih sistema taksonomije i nomenklature, postoji velika konfuzija što se tiče identifikacije vrsta ovog roda. Pouzdano utvrđivanje brojnosti i taksonomije vrsta roda *Fusarium* biće moguće tek nakon detaljnih filogenetskih proučavanja na molekularnom nivou. Novija proučavanja osnovne organizacije genoma vrsta roda *Fusarium* i njihovih morfoloških i metaboličkih svojstava, koja su izložena na Šestom evropskom seminaru o vrstama roda *Fusarium* (Berlin, septembar 2000), ukazuju da će se filogenetsko stablo roda *Fusarium* razlikovati od filogenetskog stabla koje je za ovaj rod prikazao Booth (1971). Prema tome, tek se očekuju novi rezultati i definisanje odgovarajućih morfoloških i drugih kriterijuma potrebnih za pravilnu identifikaciju i klasifikaciju vrsta ovog značajnog roda (loc. cit. Lević, 2008).

Počev od septembra 2003. godine Gen Bank baza podataka sadrži TEF sekvence poreklom od 463 izolata *Fusarium* spp. Od pomenutih i drugih sekvenci oformljena je prva generacija FUSARIUM-ID v. 1.0 baze podataka koja je 2004. godine sadržala 175 sekvenci koje predstavljaju filogenetski različite TEF sekvence ovog roda (Geiser et al., 2004). Sekvencama se može pristupiti preko BLAST servera (<http://fusarium.cbio.psu.edu>).

Postojeće grupe dobro su zastupljene u FUSARIUM-ID v. 1.0 bazi podataka, a posebno kompleks vrsta *F. oxysporum*, *F. solani*, *G. fujikuroi* i vrste koje biosintetišu trihotecen B-tip, kao što su *G. zae* (Schw.) Petch kompleks, *F. graminearum* i njegovih 8 srodnih vrsta zajedno sa *F. culmorum* (W.G. Smith) Sacc., *F. cerealis* (Cooke) Sacc., *F. lunulosporum* Gerlach i *F. pseudograminearum* O'Donnell & T. Aoki (O'Donnell et al., 1998a, 1998c; O'Donnell, 2000; O'Donnell et al., 2000a, 2000b; Geiser et al., 2001; Ward et al., 2002). Njima se pridružuju grupe uzorkovane manje

puta koje su sposobne da biosintetišu trihotecen A-tip, uključujući *F. lateritium* Nees i srodnici. Ovde su prisutne i manje detaljno opisane vrste kao što su *F. equiseti* i *F. longipes* Wollenweber & Reinking. Vrste nalik pomenutim, koje nisu detaljno opisane predstavljene su u bazi podataka kao „*Fusarium* sp. cf.“, zato što njihova identifikacija nije pouzdana i zahteva dodatna morfološka i filogenetska istraživanja. Takođe, desetine vrsta koje se filogenetski svrstavaju kao *F. solani* i *F. oxysporum* očekuju taksonomsko određivanje (Geiser et al., 2004).

Taksonomija anamorfa roda *Fusarium*. Vrste roda *Fusarium* dobile su naziv po fuzoidnom (vretenastom) obliku makrokonidija koji je opisao Link 1809 (loc. cit. Samuels et al., 2001). Prema najprihvaćenijoj klasifikaciji carstva Fungi, rod *Fusarium* je svrstan u razdeo Ascomycota, klasu Sordariomycetes, red Hypocreales i familiju Nectriaceae (Seifert and Lévesque, 2004).

Makrokonidije sa bazalnom ćelijom u obliku stopala smatraju se stabilnom osobinom i čine osnovni kriterijum za klasifikaciju vrsta roda *Fusarium*. Taksonomija ovih vrsta je sve do 1900. godine bila zasnovana na proučavanju sporonosnih struktura, sporodohija koje su se obrazovale na biljnom materijalu i taksonomski kriterijum za vrstu je često bio opis vezan za pojedine domaćine (Nelson et al., 1983; loc. cit. Edel et al., 2001). Wollenweber and Reinking (1935) započeli su rad sa približno 1000 naziva ovih gljiva koje su svrstali u 65 vrsta, 55 varijeteta i 22 specijalizovane forme, a sve to u 16 podgenetičkih sistema ili sekcija (loc. cit. Leslie et al., 2007). U razdvajanju sekcija Wollenweber and Reinking (1935) koristili su važne morfološke kriterijume uključujući oblik makrokonidija i mikrokonidija, oblik (stopala) bazalne ćelije makrokonidija, prisustvo ili odsustvo hlamidospora, kao i mesto obrazovanja hlamidospora (interkalarno ili terminalno na hifi). Vrste, varijetete i specijalizovane forme podelili su u sekcije na osnovu boje stroma, prisustva ili odsustva sklerocija, broja poprečnih pregrada (septi), dužine i širine makrokonidija.

Do sedamdesetih godina XX veka u Srbiji se najviše primenjivao sistem Bilaieve (1955), posebno kod utvrđivanja varijeteta i specijalizovanih formi. Prema ovom taksonomskom sistemu, rod *Fusarium* obuhvata 26 vrsta i 29 varijeteta raspoređenih u devet sekcija, pri čemu je sekcija *Liseola* kombinovana sa sekcijom *Elegans*, a sekcija *Gibbosum* sa *Discolor*. Danas se pri identifikaciji vrsta roda

Fusarium najšire koriste primarni taksonomski kriterijumi koje su opisali **Booth** (1971). Upotreba konidiogeneze ili prirode konidiogenih ćelija iz kojih se obrazuju mikrokonidije, omogućila je bolje razdvajanje vrsta u okviru sekcija *Liseola* i *Sporotrichiella*. Prema sistemu na osnovu kojeg je **Booth** (1971) opisao vrste i izvršio njihovu klasifikaciju, rod *Fusarium* obuhvata 45 vrsta, šest varijeteta i 100 specijalizovanih formi, uglavnom za vrste *F. oxysporum* (77) i *F. solani* (19), klasifikovanih u 12 sekcija.

Za svrstavanje vrsta roda *Fusarium* u određene taksone danas se sve češće koristi sistem koji su opisali **Nirenberg and O'Donnell** (1998). Prema ovom sistemu izolati gljiva gaje se na sintetičkoj nisko hranljivoj podlozi (SNA), a zatim se izolati liofilizuju i konzerviraju u tečnom azotu i deponuju u nekoj od poznatih međunarodnih kolekcija. Deponovanje kultura doprinosi zajedničkom saznanju o ovom kompleksnom rodu gljiva i doprinosi pouzdanijem razvoju strategije suzbijanja *Fusarium* spp. kao prouzrokovaca brojnih bolesti biljaka (**Summerell et al.**, 2003).

Taksonomija teleomorfa roda *Fusarium*. Prema nomenklaturi koju su opisali **Rossman et al.** (1999), rod *Fusarium* se na osnovu teleomorfa klasifikuje u razdeo Ascomycota, klasu Sordariomycetes, red Hypocreales i familiju Nectriaceae. Vrste roda *Fusarium* polno se razmnožavaju obrazujući teleomorfe svrstane u rodove *Albonectria*, *Cosmospora*, *Gibberella* i *Haematonectria*. Najveći broj vrsta pripada rodu *Gibberella*, obuhvatajući ekonomski značajne patogene i to *G. zae* (anamorf *F. graminearum*), *G. moniliformis* Wineland (anamorf *F. verticillioides*) i kompleks vrste *G. fujikuroi* koji obuhvata 11 vrsta od kojih je za devet definisana polna populacija, koje su označene slovima od MP–A do MP–I (**Samuels et al.**, 2001). Rezultati polnog ukrštanja u skladu sa morfološkim ispitivanjima i molekularnim podacima dobijenim sekvencioniranjem DNK, pokazali su usku povezanost (**O'Donnell et al.**, 1998a). Međutim, **O'Donnell et al.** (1998a) sproveli su filogenetske analize koristeći nekoliko gena, među kojima su β -tubulin i calmodulin i otkrili su 46 vrsta u kompleksu *G. fujikuroi*, od kojih su 23 nove za nauku (**Moretti**, 2009), a 11 vrsta je identifikovano primenom biološkog i molekularnog koncepta i filogenetski predstavljaju sinonimne vrste, što ukazuje da filogenetski pristup može da obezbedi iste informacije kao biološka načela i da druge polne populacije treba dalje identifikovati.

Peritecije vrsta roda *Gibberella* su pojedinačne ili na manjim stromama izbijaju kroz epidermis, površinske, okruglaste, plavičasto purpurne do tamno purpurne boje. Blago su neravnih zidova i bez izraštaja. Askusi su uski, oblika palice, često s prstenom na vrhu i sadrže 4 ili 8 askospora. Askospore su neseptirane ili sa 1–3 poprečne pregrade, elipsaste i prozirne. Oblik i broj poprečnih pregrada osnovni su metod za identifikaciju vrsta roda *Gibberella*. Prave askospore sa jednom poprečnom pregradom svojstvene su za populacije kompleksa vrste *G. fujikuroi* (sekcija *Liseola* i *Dlaminia*), zatim preovlađuju prave askospore sa 1 ili 3 poprečne pregrade za sekcije *Lateritium*, *Roseum* i *Sporotrichiella*, dok blago savijene askospore sa najčešće 3 poprečne pregrade karakterišu sekcije *Discolor* i *Gibbosum* (Samuels et al., 2001).

2.7. Najznačajnije *Fusarium* vrste kao patogeni gajenog sirka

***Fusarium graminearum* Schwabe** [teleomorfni stadijum *Gibberella zae* (Schwein.) Petch] jedan je od najdominantnijih, široko rasprostranjenih i destruktivnih patogena koji prouzrokuje fuzarioznu plesnivost klasa (*Fusarium head blight*, FHB) strnih žita širom sveta. Fuzarioza klasa (FHB) prvi put je opisana pre više od jednog veka i smatrana je glavnom pretnjom pšenici i ječmu tokom ranih godina XX veka (Dickson and Mains, 1929). Tokom poslednjih decenija došlo je do pojave FHB u SAD i Kanadi, gde su zabeleženi gubici od 3 milijarde dolara (McMullen et al., 1997; Windels, 2000). Fuzariozna plesnivost klasova može značajno smanjiti prinos i tehnološki kvalitet zrna, a takođe može dovesti do indirektnih gubitaka, smanjujući klijavost semena i prouzrokujući plesnivost semena (Gilbert and Tekauz, 1995; Chongo et al., 2001). Pored toga inficirana zrna mogu sadržati značajne količine mikotoksina kao sto su deoksinivalenol (DON) i zearalenon (ZEA) koji predstavljaju opasnost po zdravlje životinja i ljudi, kao i bezbednosti hrane (McMullen et al., 1997).

Dve prirodne i morfološki različite populacije u okviru *F.graminearum* prvobitno su opisane od strane Purss (1969; 1971) i Francis and Burgess (1977) kao grupa 1 i grupa 2, na osnovu simptoma bolesti koje prouzrokuju i sposobnosti kultura da formiraju peritecije (Francis and Burgess, 1977).

Uporedna analiza zasnovana na morfološkim ispitivanjima i DNK sekvencioniranju dovela je do preimenovanja Grupe 1 *F. graminearum* u *F.*

pseudograminearum (telemorfni stadijum: *Gibberella coronicolla* Aoki and O'Donnell) (Aoki and O'Donnell, 1999a, 1999b). Populacija bivše Grupe 2, danas klasifikovana kao *F. graminearum* (*G. zaeae*), ima polni i bespolni stadijum, i makrokonidije i askospore mogu inficirati klasove žita (Sutton, 1982).

Heterogenost vste *F. graminearum* dokazuju i istraživanja o stvaranju mikotoksina različitih izolata. Prinos i sadržaj mikotoksina su kvantitativne odlike koje su pod znatnim uticajem i genetičkih i ekoloških faktora (Wiśniewska et al., 2004). U pogledu biosinteze trihotecena, prethodno su opisana dva hemotipa *F. graminearum*: hemotip I koji biosintetiše DON i njegove derivate (3-AcDON, 15-AcDON) i hemotip II koji biosintetiše nivalenol (NIV) i fuzarenon-X (Fus-X).

Kolonija *F. graminearum* na PDA podlozi obrazuje gustu, pamučastu miceliju žute do ružičaste boje sa belom do karmin crvenom ivicom. Pigment u podlozi je karmin crven sa smeđom nijansom. Sporodohije su žute, narandžaste ili crvenosmeđe u starijim kulturama. Makrokonidije su prave do umereno srpaste, skoro prave ventralne i savijene dorzalne strane, sa četiri do šest poprečnih pregrada. Vršne ćelije su kupaste ili sužene u vidu kuke, dok su bazalne karakterističnog oblika stopala (Leslie and Summerell, 2006). Bezbojne do bledosmeđe loptaste hlamidospore obrazuju se pojedinačno ili u nizovima, dok mikrokonidije nisu utvrđene (Pitt and Hocking, 2009). Peritecije su ovalne, tamnoplave ili crne, u kojima se formiraju izduženi i zaobljeni askusi koji sadrže 4–6 askospora poređanih u dva ili jednom redu. Askusi su bezbojne ili svetlosmeđe boje, savijene i zaobljenih krajeva sa jednom do tri poprečne pregrade (Leslie and Summerell, 2006).

Geografska rasprostranjenost *F. graminearum* u vezi je sa temperaturnim zahtevima. U toplijim delovima sveta, uključujući delove SAD, Kanade, Australije i Centralne Evrope, *F. graminearum* je najznačajnija vrsta koja prozroukuje fuzarioznu plesnivost klasova (FHB) strnih žita širom sveta. U hladnijim regionima Severozapadne Evrope, *F. culmorum* je najdominantnija vrsta, ali i *F. poae* (Peck) Wollenw. i *Microdochium nivale* (Fr.) Samuel et Hallet imaju veliki značaj. Na površinama gde je pšenica sa visokom incidencom fuzarioza klasa bila predusev, utvrđeno je da stablo gajenog sirka parazitira *F. graminearum*, što može imati značajnu ulogu u održavanju vitalnosti ove gljive u Australiji (Burgess et al., 1996).

Prethodni usev i žetveni ostaci osnovni su izvori inokuluma, pa setva žita u infestirano zemljište može dovesti do zaraze biljaka, razvoja paleži klijanaca ili truleži korena i prizemnog dela stabla (**Dill–Macky and Jones, 2000**). Kasnije u toku vegetacije, inokulum iz vazduha, obično u obliku konidija ili askospora, može inficirati klas biljke, prouzrokujući fuzarioznu plesnivost klasova. U uslovima visoke vlažnosti vazduha (RH) ili kiše, na inficiranim klasovima može da se formira ružičasta micelija i sporodohije, što dovodi do stvaranja makrokonidija, koje mogu inficirati sekundarne izdanke. Zaražena zrna iz klasova, ako se koriste kao semenski materijal, mogu postati izvor inokuluma za razvoj paleži klijanaca koji završava ciklus bolesti (**Parry et al., 1994**). Drugi izvori inokuluma uključuju biljne domaćine kao što su soja (**Martinelli et al., 2001**), trave i širokolisne korove (**Inch and Gilbert, 2003; Parry et al., 1995**), ostatke uljane repice i stočnog graška (**Gilbert et al., 2003**). Međutim, značaj korova kao izvora *Fusarium* inokuluma još nije potvrđen (**Jenkinson and Parry, 1994**).

Česte padavine, visoka vlažnost vazduha i jaka rosa u periodu cvetanja i ranog nalivanja klasa u usevu, pogoduju infekciji i razvoju bolesti (**Lacey et al., 1999**). Donekle olakšavajuća okolnost je da je zbog kratkog perioda osetljivosti, gljiva ograničena na jedan infektivni ciklus u toku vegetacije (**Bai and Shaner, 1994**).

Peritecije sazrevaju za devet do 10 dana u jako povoljnim uslovima (optimalna temperatura 29°C), a askospore se šire vetrom, uglavnom noću, pri relativnoj vlažnosti od 95 do 100% i temperaturama od 13 do 22°C. Za obrazovanje makrokonidija potrebne su više temperature nego za obrazovanje peritecija i askospora (28–32°C), ali one zahtevaju vlažne uslove, te se uglavnom šire spiranjem tokom padavina ili vetrom (**Caron, 2000**).

Vetar je dugo bio smatran glavnim načinom prenošenja askospora i proučavanja pokazuju da može imati važnu ulogu u raznošenju inokuluma vrsta roda *Fusarium* (**Parry et al., 1995; Gilbert and Tekauz, 2000**). Kiša je još jedan faktor koji igra važnu ulogu u prenošenju inokuluma, naročito makrokonidija (**Parry et al., 1995; Fernando et al., 2000; Horberg, 2002**), dok je svetlost takođe neophodan abiotski faktor za stvaranje peritecija i oslobađanje askospora *G. zae* (**Anderson, 1948; Tschanz et al., 1976; Caron, 1993**). Izgleda da proces oslobađanja askospora ne zahteva direktnu svetlost, zato što se askospore oslobađaju noću (između 16 h i ponoći) sa povećanjem RH vazduha, odnosno snižavanjem temperature (**Paulitz, 1996; Inch et al., 2000;**

Schmale et al., 2002). Međutim, **Trail et al.** (2002) objavili su da je u laboratorijskim uslovima oslobađanje askospora bilo za 8–30% veće na svetlosti nego u potpunom mraku.

Proučavanja na molekularnom nivou ukazuju na to da je *F. graminearum* genetski veoma heterogena vrsta, za koju se dugo smatralo da je u pitanju jedna vrsta koja se javlja na šest kontinenata (**Taylor et al.**, 2000; **O'Donnell et al.**, 2000b; **Ward et al.**, 2002). Rezultati filogenetske analize dobijeni korišćenjem DNK sekvenci šest nuklearnih gena (7.1 kb) 99 izolata *F. graminearum* sakupljenih iz različitog biljnog materijala širom sveta, doveli su do otkrića sedam biogeografski različitih vrsta unutar klastera *F. graminearum* (*Fg* klaster) (**O'Donnell et al.**, 2000b). **Ward et al.** (2002) predložili su novu osmu vrstu, označenu kao vrsta 8 unutar *Fg* klastera.

Nastavljajući istraživanja koja su uključila 11 nuklearnih gena (13.6 kb) i **O'Donnell et al.** (2004) identifikovali su osam ranije poznatih i novu filogenetski različitu vrstu i dodelili im nova imena: [1] *Fusarium austroamericanum*, [2] *Fusarium meridionale*, [3] *Fusarium boothi*, [4] *Fusarium mesoamericanum*, [5] *Fusarium acacie-mearnsii*, [6] *Fusarium asiaticum*, [7] *Fusarium graminearum*, [8] *Fusarium cortaderie* i [9] *Fusarium brasiliicum* (**O'Donnell et al.**, 2004).

Dalja istraživanja **Starkey et al.** (2007), **O'Donnell et al.** (2008) i **Yli-Mattila et al.** (2009) pokazala su da je 'Grupa 2' identifikovana kao *F. graminearum sensu stricto* i da sadrži najmanje 13 odvojenih vrsta, koje imaju različitu geografsku rasprostranjenost, različitu sposobnost stvaranja trihotecena, i različitu postojanost na pojedinim usevima (**O'Donnell et al.**, 2000b; **Cumagun et al.**, 2004; **O'Donnell et al.**, 2004).

Fusarium equiseti (Corda) Saccardo [teleomorfni stadijum *Gibberella intricans* Wollenweber.] kosmopolit je, široko rasprostranjen od Aljaske do tropskog pojasa, gde ga karakteriše saprobni porast i održavanje u zemljištu i često se javlja kao patogen slabosti koji prouzrokuje trulež stabla i korena različitih vrsta biljaka (**Domsch et al.**, 1980; loc. cit. **Pitt and Hocking**, 2009). Izolovan je iz velikog broja biljaka, posebno iz semena žita (**Leslie and Summerell**, 2006), kukuruza (**Desjardins**, 2006), ječma, raži, pirinča, kikirikija, oraha, soje, sirka, raznih korova (**Pitt and Hocking**, 1997), paprike

(Shukla and Sharma, 2000), banane (Jiménez et al., 1993), tikava (Burgess et al., 1994), krompira (El-Hassan et al., 2004) i bundeve (Elmer, 1996).

Za *F. equiseti* utvrđeno je da biosintetiše brojne sekundarne metabolite i mikotoksine. Iako su produkti trihotecena koje biosintetiše *F. equiseti* varijabilni, zastupljena su oba tipa trihotecena: trihotecen tip A (diacetoksiscirpenol, T-2 toksin, HT-2 toksin i neosolaniol) i trihotecen tip B (DON, 15-AcDON, fuzarenon-X i nivalenol). Takođe biosintetiše i ZEA, moniliformin, bovericin, fuzarohromanon, dok biosintezu butenolida treba tek potvrditi (Desjardins, 2006).

Kolonija *F. equiseti* na PDA podlozi obrazuje gustu, pamučastu miceliju bele do dim ružičaste, koja postaje bež do žutosmeđe boje u starijim kulturama. U središnjem delu kolonije obrazuju se narandžaste do smeđe sporodohije, koje su slabo vidljive jer su prekrivene micelijom, a sa naličja podloge uočava se smeđa centralna površina, odnosno tamnosmeđe mrlje. Makrokonidije su izraženo savijene, srpaste sa pet do sedam poprečnih pregrada. Vršne ćelije su više ili manje izdužene, sužene i šiljaste prema kraju, dok su bazalne karakterističnog oblika stopala. Brojne loptaste hlamidospore obrazuju se veoma brzo, dok mikrokonidije nisu utvrđene (Pitt and Hocking, 2009). *F. equiseti* ispoljava veoma brz porast na 30°C (Burgess et al., 1994), dok su zapažanja u laboratorijskim uslovima pokazala da većina izolata raste slabo ili čak uopšte ne raste na 37°C (Tripathi et al., 1999). Što se tiče ostalih ekoloških svojstava, Pitt and Hocking (2009) zabeležili su porast kolonija između pH 2 i 11.

***Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg** [teleomorfni stadijum *Gibberella intermedia* (Kuhlman) Samuels] ima heterotalusan način polnog razmnožavanja i pripada populaciji D u okviru kompleksa vrste *G. fujikuroi*. Mada do obrazovanja peritecija retko dolazi u prirodi (Bowden and Leslie, 1999), upravo je test ukrštanja polnih tipova podržao razdvajanje kompleksa vrste *G. fujikuroi* na 9 populacija ili biološki različitih vrsta (Samuels et al., 2001; Gordon et al., 2001; Zeller et al., 2003). *F. proliferatum* prvi put je opisana od strane Matsushima (1971) kao vrsta roda *Cephalosporium*, a kasnije je Nirenberg (1976) svrstava među vrste roda *Fusarium* (Leslie and Summerell, 2006). Pronađena je na biljkama kukuruza širom sveta, a sve više je značajan patogen u Evropi kao prouzrokovatelj truleži klipa kukuruza (Desjardins, 2006; Leslie and Summerell, 2006). Javlja se na gajenom sirku u Nigeriji (Onyike and

Nelson, 1992) i lešniku u Španiji (Marin et al., 2007). U Jugoistočnoj Aziji velike štete prouzrokuje na kukuruzu, pasulju, pirinču i ponekad na gajenom sirku (Pitt et al., 1998). *F. proliferatum* takođe je prouzrokovatelj crne pegavosti pšenice (Conner et al., 1996; Desjardins et al., 2007). Značajan je patogen banana (Jiménez et al., 1993), crnog luka (Toit et al., 2003; Stanković et al., 2007), belog luka (Dugan et al., 2003, 2007; Stanković et al., 2007) i asparagusa (Elmer et al., 1997). Širok krug domaćina proizilazi iz njegove sposobnosti da biosintetiše fumonizin koji je izolovan iz naizgled neočekivanih uzoraka, kao što su beli luk i asparagus (Logrieco et al., 1998; Seefelder et al., 2002; Stanković et al., 2007).

Izolati *F. proliferatum* sintetišu visok nivo fumonizina u kulturama (Leslie et al., 2005), a dodatno biosintetišu i niz drugih sekundarnih metabolita, kao što su moniliformin, bovericin, enijatin i fuzarin (Desjardins, 2006).

Kolonija *F. proliferatum* na PDA podlozi obrazuje pamučastu miceliju bele do ružičaste i mrkožute boje. Pigment u podlozi je ljubičast ili skoro crn, a zbog velikog broja obrazovanih sklerocija, kolonija ima tamnoplavu boju. Sporodohije su bledonarandžaste do mrke boje, prisutne kao odvojena celina ili su skoro sastavljene iznad dela kolonije. Makrokonidije su blago srpaste, skoro prave što je tipično za vrste kompleksa *G. fujikuroi*, sa tri do pet poprečnih pregrada. Takođe obrazuje mikrokonidije iz monofijalida i polifijalida u vidu lažnih glavica i kraćih ili dugih nizova. *F. proliferatum* ne obrazuje hlamidospore (Leslie and Summerell, 2006).

Fusarium thapsinum Klittich, Leslie, Nelson & Marasas [teleomorfni stadijum *Gibberella thapsina* Klittich, Leslie, Nelson & Marasas] ima heterotalusan način razmnožavanja i pripada populaciji F u okviru kompleksa vrste *G. fujikuroi*. Prvi put je opisana od strane Klittich et al. (1997), a pre toga je poznata kao *F. verticillioides* (Leslie and Summerell, 2006). Razdvajanje vrste *F. thapsinum* učinjeno je na osnovu detekcije i svojstava teleomorfa *G. thapsina*, kao i na osnovu polne izolovanosti i brojnih fizioloških svojstava, uključujući krug domaćina i biosintezu toksina (Klittich et al., 1992). Malo je podataka o tome da li su *F. thapsinum* i *F. verticillioides* izolovane iz gajenog sirka (Leslie et al., 1990; Petrović et al., 2009).

F. thapsinum prouzrokovatelj je truleži stabla i plesnivosti zrna sirka i ispoljava izraženu patogenost za klijance sirka u *in vitro* uslovima (Leslie et al., 2005).

Uglavnom kolonizira metlicu biljke što indukuje sintezu 3'-deoksiantocijanina, jedinjenja odgovornog za stres biljke (**Little and Magill., 2004**). U slučaju nižeg intenziteta plesnivosti, seme sirka može imati značajno smanjenu klijavost (**Prom et al., 2003**). Osim sa gajenog sirka *F. thapsinum* izolovana je iz banane, kukuruza i kikirikija (**Klittich et al., 1997; Leslie, 1991**) i sa stepskih trava Severne Amerike (**Leslie et al., 2004**). Ova vrsta geografski je široko rasprostranjena, pronađena je u Africi, Aziji i Severnoj Americi.

F. thapsinum može da sintetiše visok nivo moniliformina, nešto manje u tragovima fumonizin, a takođe i fuzarinsku kiselinu (**Porter et al., 2000; Porter et al., 2002**).

Kolonija *F. thapsinum* na PDA podlozi obrazuje miceliju bele do bledonarandžaste boje. Pigmentacija u podlozi je veoma varijabilna, većina izolata proizvodi karakterističan žut pigment, dok ostali izolati luče pigment ljubičaste boje ili pigmenti čak nisu prisutni. Sporodohije mogu da budu bledonarandžaste boje, ali najčešće nisu prisutne. *F. thapsinum* obrazuje mikrokonidije iz monofijalida u vidu lažnih glavica ili nizova, ovalnog do jajastog oblika, i prave ili blago savijene makrokonidije, najčešće sa tri do pet poprečnih pregrada. Hlamidospore kod *F. thapsinum* nisu utvrđene (**Leslie and Summerell, 2006**).

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije obuhvatila su utvrđivanje prisustva i rasprostranjenosti gljiva iz roda *Fusarium* patogena gajenog sirka [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] u Srbiji. Mada su vrste roda *Fusarium* na različitim kulturama ranije proučavane, o kompleksu vrsta patogenih za gajeni sirak u Srbiji ima malo podataka, naročito o njihovoj varijabilnosti i patogenosti.

Osnovni cilj istraživanja u okviru ove doktorske disertacije bio je rasvetljavanje etiologije prouzrokača truleži korena i prizemnog dela stabla i propadanja klijanaca sirka, kao i pouzdana identifikacija i karakterizacija izolovanih gljiva do nivoa vrste, ispitivanjem morfoloških i patogenih svojstava, kao i primenom molekularnih metoda. Razvijanje i primena protokola za molekularnu identifikaciju prouzrokača pruža osnovu za brzu i preciznu identifikaciju, kao i određivanje tačne taksonomske pozicije prouzrokača kroz rekonstrukciju filogenetskog stabla na osnovu više gena uključenih u ispitivanja. Od velikog značaja je i to što će dobijeni rezultati predstavljati uvod u bližu genetičku karakterizaciju, kao i brzo i lako razlikovanje morfološki sličnih vrsta roda *Fusarium*. Sekvencioniranje više odgovarajućih delova genoma dobijenih izolata, njihovo međusobno poređenje i određivanje filogenetskog međudnosa sa drugim izolatima u svetu, doprinose poznavanju strukture populacije vrsta roda *Fusarium* a kroz to doprinose razvijanju uspešne strategije suzbijanja ovih veoma štetnih patogena.

Rezultati ovih ispitivanja ukazuju i na postojanje različitih vidova osetljivosti komercijalnih sorti i oplemenjivačkog materijala prema prevalentnim vrstama *Fusarium* spp., koji će se dalje koristiti u programima oplemenjivanja sirka na osetljivost. Od naročitog značaja je i uporedno ispitivanje osetljivosti genotipova u eksperimentalnim uslovima, u stakleniku, kao i u uslovima veštačke inokulacije i prirodne zaraze, čime će se dobiti realni podaci o potencijalu ovih genotipova u agroekološkim uslovima Srbije.

4. MATERIJAL I METOD RADA

4.1. Sakupljanje uzoraka obolelih biljaka

Sakupljanje početnog materijala za ispitivanja obavljeno je tokom trogodišnjeg perioda 2009–2011. na četiri lokaliteta gajenja sirka u Vojvodini, Bački Petrovac (rejon Južna Bačka), Senta (rejon Severni Banat), Novi Žednik i Čantavir (rejon Severna Bačka). Na oglednoj parceli gajenog sirka u Bačkom Petrovcu i proizvodnom usevu u Čantaviru obavljeno je prikupljanje uzoraka biljaka sirka dve različite gajene forme, sirak za zrno (F1 hibridi 'Alba' i 'Gold') i sirak metlaš (sorte 'Prima' i 'Reform') tokom tri godine istraživanja. Kao izvorni materijal za izolaciju patogena korišćene su biljke sa simptomima fuzariozne truleži prizemnog dela stabla i korena, kao i zaraženo seme prikupljeno sa pleglih biljaka. Kako *Fusarium* spp. mogu da se održe i prenesu zaraženim semenom, početni materijal predstavljao je i seme sirka, komercijalno prisutno na tržištu ili dobijeno u razmeni sa naučno istraživačkom organizacijom, Institutom za ratarstvo i povrtarstvo Novi Sad, Odeljenje Bački Petrovac. Ukupno je analizirano 16 uzoraka semena četiri različite sorte sakupljeno tokom tri godine, a sve u cilju izdvajanja patogenih izolata *Fusarium* za dalja istraživanja.

U cilju pronalaženja plodonosnih tela (peritecija) vrsta roda *Fusarium* na prezimelim zaraženim ostacima i preliminarne identifikacije patogena, tokom proleća 2011. godine vršen je detaljan pregled prezimelih zaraženih biljnih ostataka sirka od prethodne godine kada je zabeležen visok nivo prirodnih zaraza i veliki broj pleglih biljaka sirka u proizvodnom usevu u Čantaviru.

Nakon sakupljanja, zaražen biljni materijal je pakovan u papirne kese, obeležen i transportovan do Laboratorije Katedre za fitopatologiju, Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu, gde je dalje ispitivan. Svaki prikupljen uzorak detaljno je pregledan vizuelno i pod stereo mikroskopom, radi utvrđivanja prisustva sporodohija, peritecija ili prisustva hifa u obolelom tkivu.

4.2. Izolacija patogena

Sa prizemnog dela stabla prikupljenih uzoraka obavljena je izolacija na krompir–dekstroznu podlogu (potato dextrose agar, PDA) (Kiraly et al., 1970) prema standardnim fitopatološkim metodama. Podloga je pripremana od 200 g krompira,

17–20 g dekstroze (Dectrose, Torlak, Institut za imunobiologiju i virusologiju, Beograd), 17–20 g agara (Agar–agar, Torlak, Institut za imunobiologiju i virusologiju, Beograd) i 1 l destilovane vode. Pre sterilizacije, pH vrednost podloge je podešena na 5.5–6.0 (Muntanola–Cvetković, 1987), a sterilizacija je obavljena autoklaviranjem na 121°C i pri pritisku od 121,6 Pa. Sterilnim skalpelom isečeni su fragmenti tkiva sa uzdužnog preseka stabla, sa prelaza između zdravog i obolelog, a potom su površinski sterilisani u 2% rastvoru natrijum–hipohlorita (NaOCl, komercijalna varikina) u trajanju od tri minuta i ispirani u sterilnoj vodi. Površinski sterilisani i usitnjeni fragmenti stabla postavljeni su na hranljivu podlogu PDA i inkubirani 7–10 dana u termostatu pri temperaturi 25°C, u uslovima mraka. Izdvajanje čistih kultura gljiva koje su se razvijale oko fragmenata biljnog materijala izvršeno je u aseptičkim uslovima presejavanjem fragmenata podloge sa micelijom na svežu podlogu, sedam dana posle inkubacije.

Iz 12 uzoraka zaraženog semena gajenog sirka, dva hibrida ('Alba' i 'Gold') i dve sorte ('Prima' i 'Reform') prikupljenih odmah nakon berbe sa obolelih biljaka i četiri uzorka komercijalnog semena obavljena je izolacija metodom naklijavanja semena na hranljivu PDA podlogu. Svaki od odabranih uzoraka analiziran je u četiri ponavljanja, od po 100 semena u ponavljanju. Prikupljeni uzorci semena najpre su ispirani 2 h pod mlazom česmenske vode, a potom površinski sterilisani u 2% rastvoru natrijum–hipohlorita (NaOCl, komercijalna varikina) u trajanju od dva minuta (Singh et al., 1991) i ispirani dva puta u sterilnoj vodi. Sterilisana zrna su osušena na sterilnom filter papiru, a zatim su raspoređena na površinu PDA podloge i inkubirana sedam dana pri 25°C i fotoperiodu u trajanju od 12 h. U svaku Petri kutiju postavljano je po pet semena koja su bila pravilno raspoređena da bi se izbegla kontaminacija. Iz ruba kolonije obrazovane oko semena izvršeno je presejavanje fragmenata podloge sa micelijom na svežu podlogu. Kolonije koje su se razvile oko semena nakon inkubacije preliminarno su identifikovane do nivoa roda na osnovu makroskopskih i mikroskopskih svojstava, što je poslužilo za određivanje nivoa zaraze i učestalosti njihovog prisustva.

4.3. Dobijanje čistih kultura monosporijalnih izolata i njihovo čuvanje

U cilju dobijanja uniformnih i čistih kultura, sedam dana nakon razvoja inicijalnih kolonija izvršena je monosporijalna izolacija gljive na selektivnu podlogu sa

sterilnim fragmentima lista karanfila (carnation leaf piece agar, CLA) (Fisher et al., 1982). Ova podloga stimulatивно deluje na sporulaciju i pripremana je od 15–20 g agara (Agar–agar, Torlak, Institut za imunobiologiju i virusologiju, Beograd), 1 l destilovane vode i nekoliko sterilnih listova karanfila (5 komadića na 10 ml podloge). U razvijene čiste kulture dodato je po 10 ml sterilne vode i blagim struganjem pomoću staklenog štapića obavljeno je oslobodanje micelije i konidija od podloge. Po 1 ml tako dobijene suspenzije spora koncentracije (1×10^{-3}) razliveno je na površinu podloge od vodenog agara (water agar, WA) (Dhingra and Sinclair, 1986). Ova podloga pripremana je od 17 g agara (Torlak, Institut za imunobiologiju i virusologiju, Beograd) i 1 l destilovane vode. Nakon inkubacije u termostatu pri temperaturi 25°C u trajanju od 18–20 h, pri direktnim mikroskopiranjem, obeležavane su i izdvajane pojedinačne proklizale konidije svakog izolata, a zatim su sterilnom iglom prenete na novu CLA podlogu (Burgess et al., 1994). Razvojem ovako presejanih pojedinačnih klijalih konidija dobijeno je više monosporijalnih kultura svakog pojedinačnog izolata. Dobijeni monosporijalni izolati gljive presejani su u epruvete sa zakošenom CLA podlogom, a nakon razvoja kultura čuvani u frižideru na 4°C. Na ovaj način formirana je kolekcija izolata koja je presejevana svakih šest meseci i koršćena za dalji rad.

4.4. Provera patogenosti i izbor izolata za dalja ispitivanja

U cilju provere patogenosti svih dobijenih monosporijalnih izolata gljive iz zaraženog stabla i semena sirka urađene su veštačke inokulacije biljke domaćina. Test provere patogenosti odabranih izolata obavljen je na dva načina, direktnom inokulacijom klijanaca sirka u uslovima staklenika (Chambers et al., 1988), kao i inokulacijom klijanaca *in vitro* (Mesiaen et al., 1959). U ispitivanja je uključeno svih 13 izolata odabranih za dalja istraživanja poreklom iz Bačkog Petrovca i Čantavira, 8 izdvojenih iz prizemnog dela stabla sirka i 5 sa semena.

Prvi način provere patogenosti svih dobijenih monosporijalnih izolata obavljen je u uslovima staklenika na klijanacima hibrida sirka za zrno ('Alba', 'Gold') i sorti sirka metlaša ('Prima', 'Reform') u fenofazi bokorenja. Inokulacija biljaka obavljena je injektiranjem sterilnim špicem suspenzije konidija gljive u stablo klijanaca sirka 1 cm iznad nivoa zemljišta. Suspenzija konidija pripremljena je od kultura odabranih izolata starih sedam dana, koje su odgajane na PDA podlozi pri temperaturi od 25°C i

fotoperiodu u trajanju od 12 sati. U razvijene kolonije naliveno je 5 ml sterilne vode i micelija je odvajana od podloge staklenim štapićem u cilju oslobađanja formiranih konidija. Koncentracija dobijene suspenzije podešena je pomoću hemocitometra na 1×10^3 konidija/ml. Tako pripremljenom supenzijom konidija svakog izolata inokulisano je po 10 biljaka, a kao negativna kontrola korišćeni su klijanci sirka inokulisani sterilnom vodom. U cilju obezbeđenja uslova povišene vlažnosti, biljke su po inokulaciji pokrивane PVC folijom koja je nakon dva dana uklonjena. Pojava simptoma posmatrana je svakodnevno do dve nedelje posle inokulacije. Sa prizemnog dela stabla svih biljaka na kojima su se razvili simptomi, izvršena je reizolacija korišćenjem istih metoda kao pri izolaciji. Ceo ogled ponovljen je dva puta.

Test provere patogenosti postavljen je i u laboratorijskim uslovima, na klijancima razvijenim u epruvetama sa Knopovom podlogom (Knop agar) koja je pripremana od 0,8 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$; 0,2 g KNO_3 ; 0,2 g KH_2PO_4 ; 0,2 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; u tragovima FeSO_4 ; 20 g agara i 500 ml destilovane vode (**Tuite**, 1969). Na dnu epruvete zakošene Knopove podloge postavljen je fragment kolonije gljive, a površinski sterilisano i prosušeno seme sirka, pažljivo je utisnuto u podlogu 2 cm iznad mesta postavljenog inokuluma (**Mesiaen et al.**, 1959). Kao negativna kontrola poslužilo je seme sirka postavljeno na podlogu bez inokuluma. Zasejano je pet epruveta, odnosno ponavljanja po svakom izolatu uključenom u ispitivanja. Potom su epruvete postavljene vertikalno i dve nedelje održavane u laboratoriji pri sobnoj temperaturi (21–25°C) i prirodnim uslovima smene dana i noći. Ocena uspeha inokulacije vršena je vizuelno na osnovu pojave simptoma u vidu nekroze na korenu i stablu klijanaca. Sa klijanaca na kojima su se razvili simptomi, izvršena je reizolacija korišćenjem istih metoda kao pri izolaciji. Ceo ogled ponovljen je dva puta.

Nakon dobijanja većeg broja izolata *Fusarium* spp. iz biljaka sa simptomima u polju ili semena, i potvrđivanja njihove patogenosti na klijancima sirka, pristupilo se izboru izolata čija će svojstva biti detaljnije proučavana i na osnovu čega će biti obavljena njihova identifikacija. Izolati dokazane patogenosti grupisani su prema osnovnim morfološkim kriterijumima (izgledu i boji kolonije, brzini porasta na PDA podlozi i obliku makrokonidija) i odabrani su reprezentativni predstavnici. Za ispitivanja patogenih, morfoloških i molekularnih svojstava ukupno je odabrano 13 izolata *Fusarium* spp. različitog porekla (tabela 2). U komparativna proučavanja

uključena su i četiri referentna izolata: *F. andiyazi* (RBG5287), *F. equiseti* (RBG851), *F. proliferatum* (RBG5349) i *F. thapsinum* (RBG5255) iz kolekcije Botanic Gardens Trust, Plant Pathology, Sydney, Australia.

Tabela 2. Poreklo izolata *Fusarium* spp. odabranih za dalja proučavanja

Grupa	Oznaka izolata	Lokalitet	Biljka domaćin	Sorta/hibrid
I	286-09	Institut za ratarstvo i povrtarstvo Novi Sad, Odeljenje Bački Petrovac	sirak (prizemni deo stabla)	'Reform'
	297a-09	Čantavir	sirak (prizemni deo stabla)	'Alba'
II	13-10	Institut za ratarstvo i povrtarstvo Novi Sad, Odeljenje Bački Petrovac	sirak (seme)	'Reform'
	521-10	Institut za ratarstvo i povrtarstvo Novi Sad, Odeljenje Bački Petrovac	sirak (prizemni deo stabla)	'Gold'
	522-10	Institut za ratarstvo i povrtarstvo Novi Sad, Odeljenje Bački Petrovac	sirak (prizemni deo stabla)	'Reform'
	530-10	Čantavir	sirak (prizemni deo stabla)	'Prima'
	532-10	Čantavir	sirak (prizemni deo stabla)	'Reform'
III	535-10	Čantavir	sirak (prizemni deo stabla)	'Gold'
	536-10	Čantavir	sirak (prizemni deo stabla)	'Alba'
IV	808-11	Institut za ratarstvo i povrtarstvo Novi Sad, Odeljenje Bački Petrovac	sirak (seme)	'Gold'
V	291-09	Institut za ratarstvo i povrtarstvo Novi Sad, Odeljenje Bački Petrovac	sirak (seme sa zaražene metlice)	'Gold'
	315-09	Institut za ratarstvo i povrtarstvo Novi Sad, Odeljenje Bački Petrovac	sirak (seme)	'Alba'
	539-10	Čantavir	sirak (seme sa zaražene metlice)	'Gold'

4.5. Morfološka svojstva anamorfa

Kako vrste roda *Fusarium* imaju sposobnost da variraju u morfološkim svojstvima (oblik i veličina makrokonidija, način obrazovanja mikrokonidija, obrazovanje hlamidospora ili boja kolonija), pouzdana morfološka identifikacija vrsta zahteva razvoj kultura na najmanje dve ili tri hranljive podloge. Preliminarna identifikacija obavljena je na osnovu proučavanja morfoloških makroskopskih i mikroskopskih svojstava odabranih monosporijalnih izolata istovremeno na tri hranljive

podloge PDA, CLA i sintetičkoj nisko hranljivoj podlozi SNA (Spezieler Nährstoffarmer agar) prema kriterijumima **Summerell et al.** (2003). SNA pripremana je od 1 g KNO₃; 1 g KH₂PO₄; 0,5 g MgSO₄ x 7H₂O; 0,5 g KCl; 0,6 ml 1M NaOH; 0,2 g glukoze; 0,2 g saharoze; 15 g agara i 1 l destilovane vode. Na površinu podloge, koja još nije u potpunosti želatinizirana, prema periferiji kutije stavljen je komadić (2x3 cm) sterilnog filter papira, koji stimuliše sporulaciju gljiva (**Nirenberg**, 1976). Filter papir se sterilniše tako što se 50 listića filter papira (2x3 cm) stavi u Erlenmajerovu bocu od 100 ml i jedan papirni tampon natopljen u destilovanoj vodi, a potom se boca zatvara zapašaćem i sterilniše u autoklavu. Kao standardna podloga za utvrđivanje makroskopskih svojstava gljiva, (intenziteta rasta kolonije, obrazovanje boje kolonije i pigmenta u podlozi) korišćena je PDA podloga (**Nelson et al.**, 1983; **Burgess et al.**, 1994). Za utvrđivanje mikroskopskih svojstava, monosporijalne kulture odabranih izolata gajene su na prirodnoj nisko hranljivoj podlozi CLA koja stimuliše sporulaciju i obrazovanje uniformnih makrokonidija (**Burgess et al.**, 1994) i na sintetičkoj SNA podlozi na kojoj se obrazuju obilne mikrokonidije različitih oblika, kao i hlamidospore (**Nirenberg and O'Donnell**, 1998).

Prema **Burgess et al.** (1994) makroskopska svojstva (izgled i boja kolonija, pigmentacija podloge) proučavane su u monosporijalnim kulturama gajenih sedam dana na PDA u mraku, pri 25°C. Ispitivanje mikroskopskih morfoloških svojstava reproduktivnih organa obuhvatilo je utvrđivanje tipa konidiofora ili fijalida (konidiogene ćelije s jednim – monofijalida ili više otvora – polifijalida), oblika i dimenzija makrokonidija, kao i prisustva ili odsustva mikrokonidija i hlamidospora (**Burgess et al.**, 1994; **Nirenberg and O'Donnell**, 1998). Kulture izolata starosti 10–14 dana, odgajene na CLA i SNA podlozi, pri cikličnom smenjivanju svetlosti i tame u intervalima od po 12 h direktno su pregledane pomoću mikroskopa (*in situ*) pri uvećanju od 100x. Od kultura svih izolata pripremani su i nativni preparati za određivanje izgleda konidiofora i konidija. Nativni preparat pripreman je u kapi sterilne vode u koju je sterilnom iglom nanet fragment kolonije, a potom prekriven pokrovnim staklom i posmatran uz pomoć optičkog mikroskopa Olympus CX41, pod direktnim uvećanjima od 40x do 100x. Prosekom obračunatim za najmanje 100 ponovljenih merenja, određivana je veličina konidija. Sve dimenzije su merene na slučajno odabranim, potpuno formiranim i zrelim konidijama u vidnom polju nativnog preparata.

Pošto se hlamidospore često obrazuju u starijim kulturama, mesec dana stare kulture su ponovo pregledane, kako bi se definitivno utvrdilo njihovo prisustvo.

4.6. Morfološka svojstva teleomorfa (peritecija)

Pored proučavanja anamorfa prouzrokovaca fuzarioze sirka, u toku vegetacije, kao i u toku zimskog mirovanja u usevima sirka u lokalitetu Čantavir vršen je pregled, odnosno ispitivano je prisustvo teleomorfnih struktura ovih gljiva. Zaraženi ostaci sirka prezimeli na površini zemljišta u prirodnim uslovima sakupljeni su u proleće, tokom marta 2011. godine kada je ispitivano prisustvo peritecija na donjim nodusima i osnove zaraženog stabla. Morfološka svojstva teleomorfa ispitivana su iz prikupljenih peritecija gljive koje su bile formirane na prirodno zaraženim stablima sirka. Posmatranjem pod binokularom (Leica WILD M3Z), uočene peritecije na osnovi inficiranog stabla, uz pomoć sterilne kopljaste igle izdvojene su i prenete u kap tečnosti na mikroskopskoj pločici. Nakon nekoliko minuta su smrvljene iglom radi ispitivanja prisustva reproduktivnih tvorevina koje su direktno posmatrane pod optičkim mikroskopom Olympus CX41, pod direktnim uvećanjima od 40x do 100x koristeći svetla i tamna polja i fazni kontrast. Direktnim mikroskopiranjem ustanovljeni su izgled i svojstva askospora: oblik, boja, broj poprečnih pregrada i merena je veličina. Za određivanje veličine mereno je po 20 peritecija kao i 100 slučajno odabranih askospora, u dva ponavljanja.

4.7. Molekularna detekcija i identifikacija

Molekularna detekcija i identifikacija ispitivanih izolata *Fusarium* spp., obavljena je selektivnim umnožavanjem pet genskih segmenata DNK iz ITS (Internal transcribed spacer) regiona jedarne DNA (deo 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2 i deo 28S rRNA), tri različita regiona proteinskih nuklearnih gena, elongacioni faktor TEF-1 α ; β -tubulin i calmodulin, kao i mtSSU rDNK mitohondrijalnog gena (mitohondrijalna mala podjedinica ribozomske DNK), primenom metode lančane reakcije polimeraze (polymerase chain reaction, PCR). Analizom introna proteinskih gena (TEF-1 α , β -tubulin i calmodulin) moguće je dobiti potrebne informacije za razlikovanje izolata do nivoa vrste. Ovi geni su manje univerzalni nego ribozomski, a prajmeri su ograničeni na region introna (**Zeller and Geiser, 2003**). Nakon

sekvencioniranja amplifikovanih fragmenata, utvrđena je njihova nukleotidna sličnost sa sekvencama dostupnim u GenBank bazi podataka (National Centre for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, USA).

U molekularna ispitivanja uključeno je 13 odabranih izolata (286–09, 297a–09, 13–10, 521–10, 522–10, 530–10, 532–10, 535–10, 536–10, 808–11, 291–09, 315–09 i 539–10), koji su dobijeni izolacijom iz biljaka sa simptomima truleži prizemnog dela stabla sirka i iz zaraženog semena kojima je potvrđena patogenost, a koji su prethodno okarakterisani na morfološkom nivou. U ispitivanja su uključeni i izolati tri referentne vrste *F. equiseti* (RBG851), *F. proliferatum* (RBG5349) i *F. thapsinum* (RBG5255), kao i jedan uzorak (14–11) iz prezimele zaražene stabljike sirka sa formiranim peritecijama.

4.7.1. Ekstrakcija DNK

U cilju iznalaženja najbolje i najosetljivije procedure za molekularnu detekciju gljiva iz roda *Fusarium* patogena gajenog sirka, molekularna detekcija odabranih izolata *Fusarium* spp. urađena je primenom dve različite procedure ekstrakcije ukupne količine dezoksiribonukleinskih kiselina (DNK) i to pomoću: DNeasy Plant Mini Kit–a (Qiagen, Hilden, Germany) i standardne CTAB (Cetyltrimethylamonium bromide) metode (O'Donnell et al., 1998a). Primenom obe metode, ekstrakcija je vršena iz različito pripremljenog početnog materijala ispitivanih izolata.

Ekstrakcija DNK pomoću DNeasy Plant Mini Kit–a (Qiagen, Hilden, Germany).

Korišćenjem komercijalnog kita DNeasy Plant Mini Kit, primenom postupka po uputstvima proizvođača, ukupne DNK ekstrahovane su iz početnog materijala pripremljenog na tri načina: iz micelije čistih kultura patogena odgajenih na tečnoj PDB podlozi (zamrznute na -80°C), iz vazdušne micelije sakupljene direktno iz kolonija odgajenih na PDA podlozi, i iz peritecija formiranih na prezimelim zaraženim stabljikama sirka.

Odabrani izolati su gajeni u tečnoj krompir dekstroznoj čorbi (PDB, potato dextrose broth, **Konstantinova et al.**, 2002), pripremljenoj od 200 g krompira i 20 g dekstroze. U Erlenmajer kolbe razliveno je 150 ml PDB, sterilisane i zasejane sa pet fragmenata kolonije (1 cm^2) iz kultura starih sedam dana, odgajenih na PDA pri 24°C , u

mraku. Zasejane Erlenmajer kolbe inkubirane su 15 dana u mraku, pri 24°C, uz povremeno mešanje horizontalnom rotacijom. Tečne kulture odabranih izolata filtrirane su preko sloja filter papira, a micelija sakupljena i osušena pod vakumom. Osušena micelija podeljena je u porcije od 100 mg i zamrznuta na -80°C i tako čuvana do korišćenja.

Drugi način pripreme uzoraka za ekstrakciju ukupnih DNK obuhvatio je direktno sakupljanje vazdušne micelije sterilnim skalpelom sa kolonija ispitivanih izolata starih sedam dana odgajenih na PDA, pri 24°C, u mraku. Micelija je sakupljena pažljivo da se izbegne unošenje fragmenata podloge u početni materijal za ekstrakciju.

Zaraženi biljni materijal označen kao uzorak 14-11 sastojao se od gomilica peritecija na stablu sirka. Ekstrakcija je obavljena tako što su peritecije sterilnim skalpelom direktno sakupljane sa biljnog materijala i nanošene u mikrotubicu neposredno pre ekstrakcije i kao takve poslužile kao početni materijal za ekstrakciju ukupnih DNK.

Odmerena količina prethodno zamrznute micelije (100 mg), sveža vazdušna micelija direktno sakupljena iz kultura izolata, ili peritecije, prebačeni su u mikrotubicu zapremine 1,5 ml, gde je uz dodavanje tečnog azota vršena homogenizacija tučkom za jednokratnu upotrebu. Homogenizacija je nastavljena dodavanjem u svaku mikrotubicu po 400 µl AP1 pufera i 4 µl enzima RNase A da bi se eliminisale ukupne ribonukleinske kiseline (RNK) koje bi mogle da ometaju dalje analize. Nakon toga, sadržaj tubice kratko je promešan na Vortexu. Dobijena suspenzija inkubirana je u vodenom kupatilu na 65°C u trajanju od 20 min. Uz povremeno snažno mešanje tokom inkubacije na povišenoj temperaturi došlo je do razgradnje ćelijskog zida i oslobađanja ćelijskog sadržaja, kao i razlaganja RNK pomoću enzima RNase A. Potom je u svaku mikrotubicu dodavano po 130 µl AP2 pufera koji je omogućio taloženje proteina i polisaharida. Tubice su potom inkubirane 5 min na ledu, a zatim 5 min centrifugirane na 14 000 rpm. Po završenom procesu, lizat bez taloga pipetiran je iz mikrotubica u QIAshredder Mini spin kolone sa filterom, koje se nalaze u kolektorskim tubicama zapremine 2 ml. Kolektorske tubice su centrifugirane 2 min na 14 000 rpm. Nakon centrifugiranja rastvor koji je propušten kroz filter prebačen je u tubice zapremine 2 ml i uz neprestano mešanje u svaku tubicu dodato je po 675 µl pufera AP3/E. Potom je prvi deo od 650 µl ove suspenzije prebačen u DNeasy Mini spin kolone sa filterom. Filter u

Mini spin kolonama u procesu ekstrakcije ima ulogu da veže molekule DNK i na taj način omogućava njihovo izdvajanje. Nakon centrifugiranja u trajanju od 1 min na 10 000 rpm odstranjena je tečna faza koja je prošla kroz filter, dodata je preostala količina suspenzije iz tubice i ponovljen je isti proces centrifugiranja i odbacivanja tečne faze. Nakon ovog procesa u DNeasy Mini spin kolone u dva navrata dodato je po 500 µl AW pufera u cilju ispiranja i uklanjanja nečistoća koje su se, pored DNK, vezale za filter, a potom su Dneasy Mini spin kolone centrifugirane, 1 min na 10 000 rpm a zatim 2 min na 14 000 rpm da se otklone ostaci tečnosti. Nakon centrifugiranja, Dneasy Mini spin kolona sa filterom prebačena je u mikrotubicu sa poklopcem i na filter je sipano 100 µl AE pufera. Uzorci su zatim inkubirani na sobnoj temperaturi 5 min da bi se omogućilo oslobađanje i rastvaranje DNK sa filtera, a potom su tubice centrifugirane 1 min na 10 000 rpm. Tečna faza koja je prošla kroz filter predstavljala je ukupnu ekstrahovanu DNK i tako dobijeni uzorci čuvani su na -80°C do dalje upotrebe.

Ekstrakcija DNK pomoću CTAB metode. Ekstrakcija DNK iz micelije ispitivanih izolata urađena je po metodi **Day and Shattock** (1997). Po preporučenom postupku, 100 mg micelije zamrznute na -80°C , pripremljene na napred opisan način, homogenizovano je uz dodatak 800 µl ekstrakcionog pufera (Ekstrakcioni CTAB pufer, priprema se od 100 mM Tris HCl, pH 8,0; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA i 2% CTAB, cetiltrimetilamonijum bromid, pH 8,0). Dobijena suspenzija prebačena je u mikrotubu zapremine 2 ml i inkubirana u vodenom kupatilu na 65°C u trajanju od 1 h. Svakih 15 min sadržaj je snažno promešan. Tokom ovog dela ekstrakcije dolazi do razgradnje ćelijskih zidova i oslobađanja sadržaja ćelije. Nakon 1 h, u svaku mikrotubu dodavano je 600 µl hloroforma i promešano na Vortexu 10 s, a zatim centrifugirano 10 min na 13 000 rpm u centrifugi Eppendorf 5804 R. Posle centrifugiranja jasno su se razdvojile dve faze. Gornji sloj, približne zapremine oko 500 µl, pipetiran je u novu mikrotubu u koju je zatim dodato 300 µl izopropanola. Ovako pripremljene mikrotube potom su inkubirane 10 min na sobnoj temperaturi, posle čega su ponovo centrifugirane 10 min na 13 000 rpm. Supernatant je pažljivo odličen, u mikrotube je dodato 600 µl 70% etanola i ponovo centrifugirano 10 min na 13 000 rpm. Etanol je pažljivo odbačen, a mikrotube ostavljene otvorene na sobnoj temperaturi da bi višak etanola ispario. Dobijeni talog je resuspendovan u 50 µl TE pufera (TE pufer se priprema od 10 mM

Tris pH 8.0 i 1 mM EDTA). Dobijeni ekstrakt predstavljao je ukupnu DNK, koja je do upotrebe čuvan na -80°C .

4.7.2. Lančana reakcija polimeraze (PCR)

Metoda lančane reakcije polimeraze (PCR) primenjena je u cilju molekularne detekcije gljiva patogena gajenog sirka i potvrde prethodne identifikacije obavljene konvencionalnim fitopatološkim metodama na osnovu njihovih morfoloških svojstava, i to molekularna PCR metoda korišćena je za identifikaciju prouzrokovaca bolesti, umnožavanjem ukupno pet različitih genomnih regiona ispitivanih izolata. Odabrani izolati patogena okarakterisani su umnožavanjem odgovarajućeg segmenta DNK iz ITS regiona, regiona proteinskih nuklearnih gena (elongacioni faktor TEF-1 α ; β -tubulin i calmodulin) i mtSSU rDNK mitohondrijalnog gena (mitohondrijalna mala podjedinica ribozomske DNK) uz primenu odgovarajućih prajmera koji omogućavaju amplifikaciju navedenih gena (O'Donnell et al., 2000a).

Umnožavanje različitih delova genoma svih 13 ispitivanih izolata *Fusarium* spp. obavljeno je korišćenjem različitih parova prajmera prikazanih u tabeli 3. PCR reakcije obavljene su u radnoj zapremini od 25 μl , korišćenjem 12,5 μl 2X PCR Master miksa (K071, Fermentas, Lithuania), 9 μl RNase-free vode, po 1,25 μl svakog prajmera (100 pmol/ μl , Metabion International, Deutschland) i 1 μl ekstrahovane ukupne DNK. U svim reakcijama negativnu kontrolu je predstavljao uzorak sa svim reagensima potrebnim za umnožavanje DNK u koju je umesto DNK uzorka dodavana molekularna RNase-free voda (Molecular Biology Grade Water, Eppendorf). PCR reakcija izvedena je u termosajkleru (Thermocycler T-1, Biometra, UK) pri različitim uslovima zavisno od korišćenih prajmera.

(1) PCR sa parom univerzalnih prajmera ITS1/ITS4. Ovaj par univerzalnih prajmera omogućava umnožavanje i kasnije sekvencioniranje ITS regiona ribozomalne DNK Eukariota. ITS region je visoko varijabilan između morfološki različitih vrsta gljiva i sa druge strane konzervativan na nivou vrste i kod mnogih rodova fitopatogenih gljiva koristi se za filogenetske analize. Kako je ITS1/ITS4 par prajmera koji može da amplifikuje ITS region svih Eukariota, koristi se i za proveru uspešnosti ekstrakcije DNK. Pored toga ovi prajmeri su uključeni u istraživanja u cilju ispitivanja njihove pogodnosti za korišćenje u okviru protokola za identifikaciju sekvencioniranjem

dobijenih produkata vrsta roda *Fusarium*. PCR umnožavanje obavljeno je u termosajkleru pri sledećim uslovima reakcije: inicijalna denaturacija nukleinskih kiselina 60 s pri 94°C; 35 ciklusa koji se sastoje od denaturacije 35 s pri 94°C, hibridizacije (annealing) 35 s pri 57°C, elongacije prajmera 1 min pri 72°C i finalna elongacija 10 min pri 72°C (Takamatsu and Kano, 2001; Cunnington et al., 2003). Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava traka produkta očekivane veličine od 500–600 bp.

(2) PCR sa parom prajmera ef1/ef2 koji omogućavaju amplifikaciju gena za TEF-1 α , koji je uključen u složeni mehanizam translacije proteina u ćelijama gljiva prilikom rasta i izduživanja ćelija. Ovaj gen pokazuje visok polimorfizam sekvenci između blisko srodnih vrsta, odnosno sekvenca ovog dela genoma smatra se visoko informativnom na nivou vrste za ceo rod *Fusarium* (Summerell et al., 2003; Geiser et al., 2004; Kristensen et al., 2005). PCR umnožavanje izvedeno je pri sledećim uslovima: inicijalna denaturacija nukleinskih kiselina 2 min pri 94°C; 35 ciklusa koji se sastoje od denaturacije 1 min pri 94°C, hibridizacije 1 min pri 53°C, elongacije 2 min pri 72°C i finalna elongacija pri 72°C u trajanju od 10 min (O'Donnell et al., 1998c). Prajmeri ef1/ef2 umnožavaju segment DNK finalne dužine ~700 bp.

(3) PCR sa parom prajmera T1/T22 koji omogućavaju amplifikaciju gena za β -tubulin do čije ekspresije dolazi tokom vegetativnog porasta kao i tokom klijanja konidija, izveden je pri sledećim uslovima: inicijalna denaturacija nukleinskih kiselina 3 min pri 95°C; 35 ciklusa koji se sastoje od denaturacije 30 s pri 94°C, hibridizacije 30 s pri 58°C, elongacije 1 min pri 72°C i finalna elongacija pri 72°C u trajanju od 5 min (Walsh et al., 2010). Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava traka produkta očekivane veličine od ~1 300 bp.

(4) PCR sa parom prajmera CL1/CL2A koji omogućavaju amplifikaciju gena za calmodulin koji pokazuje visoku pouzdanost filogenetskih analiza unutar kompleksa *G. fujikuroi* i vrsta roda *Fusarium* (O'Donnell et al., 2000a), a takođe je i pretendent za analize genetičkih populacija (Geiser et al., 2000), izveden je pri sledećim uslovima: inicijalna denaturacija nukleinskih kiselina 5 min pri 94°C; 30 ciklusa koji se sastoje od denaturacije 30 s pri 94°C, hibridizacije 1 min pri 55°C, elongacije 2 min pri 72°C i finalna elongacija pri 72°C u trajanju od 10 min (Mulé et al., 2004). Prajmeri CL1/CL2A umnožavaju segment DNK finalne dužine 700–800 bp.

(5) **PCR sa parom prajmera MS1/MS2** koji omogućavaju amplifikaciju mitohondrijalne male podjedinice ribozomske DNK. Umnožavanje DNK obavljeno je u 20 µl PCR smeše koja je sadržavala: 2 µl 10 x PCR pufera (Fermentas, Lithuania), 2,4 µl MgCl₂ (25 mM, Fermentas, Lithuania), 0,4 µl dNTPs (10 mM, Fermentas, Lithuania), 5,95 µl RNase-free vode, po 2 µl oba prajmera (100 pmol/µl, Metabion International, Deutschland), 0,25 U *Taq* polimeraze (Fermentas, Lithuania) i 5 µl ekstrahovane DNA. PCR umnožavanje obavljeno je pri sledećim uslovima: inicijalna denaturacija nukleinskih kiselina 2 min pri 95°C; 35 ciklusa koji se sastoje od denaturacije 30 s pri 95°C, hibridizacije 30 s pri 50°C, elongacije 90 s pri 72°C i finalna elongacija pri 72°C u trajanju od 10 min (White et al., 1990). Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava traka produkta očekivane veličine od 716 bp.

Tabela 3. Pregled prajmera primenjenih za detekciju *Fusarium* spp.

Ciljna sekvenca	Naziv prajmera	Sekvenca 5'-3'	Veličina fragmenta	Literaturni izvor
ITS Eukariota	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	500–600 bp	Takamatsu and Kano (2001)
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		
TEF-1α	ef1	ATGGGTAAGGAGGACAAGAC	~700 bp	Geiser et al. (2004)
	ef2	GGAAGTACCAGTGATCATGTT		
β-tubulin	T1	AACATGCGTGAGATTGTAAGT	~1300 bp	O'Donnell and Cigelnik (1997)
	T22	TCTGGATGTTGTTGGGAATCC		
calmodulin	CL1	GA(GA)T(AT)CAAGGAGGCCTTCTC	700–800 bp	O'Donnell et al. (2000a)
	CL2A	TTTTTGCATCATGAGTTGGAC		
mtSSU	MS1	CAGCAGTCAAGAATATTAGTCAATG	716 bp	White et al. (1990)
	MS2	GCGGATTATCGAATTAAATAAC		

4.7.3. Vizuelizacija i analiza produkata PCR reakcija

Vizuelizacija umnoženih produkata PCR reakcija obavljena je elektroforetskim razdvajanjem nukleinskih kiselina u 1% agaroznom gelu u 1 x TBE puferu, bojenjem etidijum bromidom i posmatranjem pod UV-transiluminatorom. Agarozni gel pripremljen je rastvaranjem 1,20 g agaroze u 120 ml 1 x TBE pufera i zagrevanjem do temperature ključanja u mikrotalasnoj pećnici. Nakon hlađenja do temperature od približno 60°C, gel je razliven u kalup za horizontalnu elektroforezu u koji su prethodno

postavljeni separatori i češljevi, nakon čega je ostavljen na sobnoj temperaturi 30 min da se ohladi i polimerizuje. Posle polimerizacije gela i uklanjanja češljeva, kalup je uranjan u kadnicu za horizontalnu elektroforezu sa 1 x TBE puferom. Uzorci su pripremljeni tako što je na parafilmu pomešano 5 µl produkta PCR reakcije i 1 µl boje 6x Loading dye (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania) i odmah su unošeni u bunarčice po odgovarajućem rasporedu. Pri svakoj elektroforezi korišćen je marker MassRuler™ DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania) radi određivanja veličine produkta poređenjem sa poznatom veličinom DNK fragmenata markera. Elektroforeza je izvedena pri konstantnoj struji od 120 V u trajanju od oko 40 min u aparatu za horizontalnu elektroforezu (BlueMarine 100, Serva electrophoresis GmbH, UK). Posle završene elektroforeze gel je bojen u rastvoru etidijum bromida (destilovana voda i etidijum bromid u finalnoj koncentraciji od 0,5 µg/ml) u trajanju od 20 min. Amplifikovani fragmenti posmatrani su u mračnoj komori pomoću UV svetla na transiluminatoru (Biometra, UK). Prisustvo DNK fragmenata očekivane dužine označeno je kao pozitivna reakcija.

U metodi je korišćen 1 x TBE pufer koji sadrži: 90 mM Tris; 90 mM borna kiselina i 1 mM Na₂EDTA.

Dobijeni rezultati dokumentovani su fotografisanjem agaroznog gela i korišćenjem žutog filtera.

4.7.4. Prečišćavanje PCR produkta i sekvencioniranje

Nakon uspešne amplifikacije, PCR produkti uzoraka određenih za sekvencioniranje prečišćeni su pomoću QIAquick PCR Purification Kit-a (Qiagen, Hilden, Germany), prateći upustvo proizvođača. Jedna zapremina reakcione smeše i PCR produkta nakon reakcije pomešana je sa pet zapremina PBI pufera, a zatim prebačena u QIAquick kolonu smeštenu u kolekcionu tubicu i centrifugirana 1 min na maksimalnom broju obrtaja (13 000 rpm) u cilju vezivanja DNK za filter. Tečna faza je odbačena, a u QIAquick kolonu je pipetirano 750 µl PE pufera u cilju ispiranja nečistoća, posle čega je tubica sa uzorkom centrifugirana 1 min na 13 000 rpm. Nakon centrifugiranja, tečna faza je odbačena, a QIAquick kolona vraćena u istu kolekcionu tubicu i centrifugirana 1 min na 13 000 rpm da bi se uklonili ostaci pufera. U cilju rastvaranja DNK u QIAquick kolonu smeštenu u novu tubicu od 1,5 ml pipetirano je 50

μl EB pufera i centrifugirano 1 min na 13 000 rpm. Tako dobijena DNK čuvana je na 4°C do kvantifikacije i pripreme za slanje na uslužno sekvencioniranje.

Nakon prečišćavanja uzorci su elektroforetski razdvojeni na 1% agaroznom gelu da bi se proverila čistoća amplikona, procenila molekularna težina i odredila količina sintetisane DNK. Količina umnoženih fragmenata u svakom uzorku određena je poređenjem dobijenih produkata sa fragmentima komercijalnog markera 100 bp DNA Ladder (Serva GmbH, UK) sa poznatim količinama svih frakcija u markeru.

Umnoženi fragmenti ispitivanih izolata, nakon prečišćavanja pomoću QIAquick PCR Purification Kit-a (Qiagen, Hilden, Germany) poslani su na uslužno sekvencioniranje u oba smera na ABI 3730XL Automatic Sequencer u MacroGen, Inc (<http://dna.macrogen.com>, Korea). Dobijene sekvence obrađene su u programu FinchTV Version 1.4.0., posle čega su im određene konsenzus nukleotidne sekvence i podnete u GenBank bazu podataka u okviru National Center for Biotechnology Information (NCBI), gde im je dodeljen pristupni broj (GenBank Accession Number).

4.7.5. Molekularna identifikacija i karakterizacija

Molekularna identifikacija odabranih izolata *Fusarium* spp., poreklom iz Srbije obavljena je, nakon sekvencioniranja četiri nuklearna i jednog mitohondrijalnog dela genoma, višestrukim uparivanjem sa sekvencama drugih gljiva dostupnih u GenBank bazi podataka i proračunom genetičke sličnosti. Nakon dobijanja sekvenci gena za TEF-1α 11 ispitivanih izolata (286-09, 297a-09, 13-10, 521-10, 522-10, 530-10, 532-10, 535-10, 536-10, 14-11, 808-11), sekvenci ITS genomnog regiona šest ispitivanih izolata (286-09, 297a-09, 535-10, 808-11, 291-09, 315-09) i četiri sekvence izolata (286-09, 297a-09, 535-10, 808-11) gena za β-tubulin, calmodulin i mtSSU rDNK kao i njihove obrade, međusobno su upoređivane sa odgovarajućim sekvencama koje su dostupne u internacionalnoj GenBank bazi podataka.

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) analizom i višestrukim poređenjem dobijenih sekvenci sa dostupnim sekvencama odgovarajućih regiona genoma gljiva u GenBank bazi podataka (<http://blast.GenBank.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) pomoću CLUSTAL *W* programa (Thompson et al., 1994), obavljena je potvrda identifikacije dobijenih sekvenci. Za proračun genetičke udaljenosti i najviši stepen

nukleotidne sličnosti, nakon trimovanja sekvenci na dužinu najkraće sekvence upotrebljen je softverski paket MEGA verzija 5.0. (Tamura et al., 2011).

Dalja molekularna karakterizacija ispitivanih izolata obavljena rekonstrukcijom filogenetskih stabala pružila je uvid u tačno taksonomsko mesto svakog od prouzrokovaca u okviru kompleksa fuzariozne truleži sirka i ukazala na evolutivnu srodnost sa drugim značajnim vrstama u okviru roda *Fusarium*. Kod proučavanja genetičke identičnosti i filogenetskih analiza, sekvence su svedene na odgovarajuću dužinu u skladu sa dužinom najkraće sekvence. Filogenetska analiza unutar kompleksa *G. fujikuroi* zasnovana je na kombinaciji DNK sekvenci informativnih za četiri različita gena regiona TEF-1 α , β -tubulin, calmodulin i mitohondrijalne male podjedinice (mtSSU) rDNK, kao i na kombinaciji DNK sekvenci ITS regiona. Za filogenetske analize odabrane su sekvence izolata 297a-09, 13-10, 521-10, 522-10, 530-10, koji su identifikovani kao *F. proliferatum* i izolata 808-11 identifikovanim kao *F. thapsinum*. Upoređivanje je vršeno sa 50 filogenetski odvojenih vrsta kompleksa *G. fujikuroi* (prilog 1). Filogenetska stabla rekonstruisana su korišćenjem Maximum Parsimony metode, integrisane unutar programa MEGA verzija 5.0. i bootstrap analize sa 1000 ponavljanja. Filogenetska stabla svih različitih delova genoma rutovana su sa dve autgrupe, vrstama *F. oxysporum* i *F. inflexum* kompleksa *F. oxysporum* za koji se smatra da je sestrinska grupa kompleksa *G. fujikuroi* (O'Donnell et al., 1998a).

Filogenetska analiza unutar *F. graminearum* klastera (*Fg* klaster) obavljena je na osnovu proučavanja DNK sekvenci gena za TEF-1 α i β -tubulin, kao i na kombinaciji DNK sekvenci ITS regiona. Za ova istraživanja odabrane su sekvence izolata 532-10, 535-10, 536-10 i 14-11 koje su identifikovane kao *F. graminearum*. Za filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu DNK sekvenci ITS regiona uključeno je 54 izolata grupisanih u 11 filogeografskih linija unutar *F. graminearum* kompleksa poreklom iz Severne i Južne Hemisfere (prilog 2). Sekvence vrste *F. pseudograminearum* i *Fusarium* sp. NRRL 29380 i NRRL 29298 korišćene su kao autgrupe za rutovanje stabla, a korišćenjem Maximum Parsimony metode, integrisane unutar programa MEGA verzija 5.0. i bootstrap analize sa 1000 ponavljanja rekonstruisano je stablo.

Za filogenetsku analizu DNK sekvenci gena za TEF-1 α i β -tubulin uključeno je 33 izolata različitih filogenetskih vrsta unutar *F. graminearum* kompleksa poreklom iz različitih delova sveta (prilog 3). Filogenetsko stablo je rutovano sa *F.*

pseudograminearum kao autgrupom (Aoki and O'Donnell, 1999a), a rekonstruisano je korišćenjem Maximum Parsimony metode, integrisane unutar programa MEGA verzija 5.0. i bootstrap analize sa 1000 ponavljanja.

Upotrebom softverskog paketa MEGA verzija 5.0. (Tamura et al., 2011), obavljena je Maximum Parsimony filogenetska analiza delimičnih DNK sekvenci gena za TEF-1 α vrste *F. equiseti*. Za ova istraživanja odabrana je sekvenca izolata 286-09 identifikovana kao *F. equiseti*. Upoređivanje je vršeno sa 54 izolata vrste *F. equiseti* i četiri sekvence blisko srodne vrste *F. scirpi* (prilog 4). Filogenetsko stablo je rutovano sa autgrupom, vrstom *F. graminearum* (NRRL 29169).

4.8. Ocenjivanje nivoa osetljivosti različitih genotipova sirka prema *Fusarium* spp.

U cilju utvrđivanja nivoa osetljivosti gajenog sirka prema ekonomski najznačajnijim gljivama iz roda *Fusarium*, ispitivana je osetljivost sedam različitih genotipova komercijalnih sorti i oplemenjivačkog materijala Instituta za ratarstvo i povrtarstvo Novi Sad, Odeljenje Bački Petrovac, od toga dva genotipa sirka metlaša (sorte 'Prima' i 'Reform') i pet genotipova sirka za zrno (hibridi 'Alba' i 'Gold' i sorte označene šiframa A28, A73, parc. 262/2010). Takođe u istraživanja je uključeno i četiri genotipa sirka za zrno dobijena u razmeni iz SAD (linije PI656114 01 SD, PI534163 02 SD, PI595720 02 SD i PI576382 03 SD) koji su opisani kao otporni na vrste i forme roda *Fusarium*. Osetljivost ispitivanih genotipova gajenog sirka ocenjena je na osnovu: (a) veštačke inokulacije klijanaca u uslovima staklenika, (b) veštačke inokulacije biljaka u poljskim uslovima Bačkog Petrovca u 2010. i 2011. godini i (c) prirodne zaraze u lokalitetu Čantavir u 2010. i 2011. godini.

4.8.1. Ocenjivanje nivoa osetljivosti klijanaca sirka prema *Fusarium* spp. u uslovima staklenika

Ispitivanje osetljivosti različitih genotipova sirka obavljeno je 2011. u uslovima staklenika, veštačkim inokulacijama 11 navedenih genotipova sirka. U ova ispitivanja uključeno je 12 izolata gljiva grupisanih u četiri morfološke grupe. U ispitivanja su uključeni izolat 286-09 morfološke grupe I (*F. equiseti*), izolati 297a-09, 13-10, 521-10, 522-10 i 530-10 grupe II, (*F. proliferatum*), izolati 532-10, 535-10 i 536-10 grupe III (*F. graminearum*) i izolati 291-09, 315-09 i 539-10 grupe V (*E. nigrum*).

Predstavnik IV morfološke grupe, izolat 808–11 identifikovan kao *F. thapsinum* nije uključen jer je izolovan po završetku oglada osetljivosti i biće predmet posebnih ispitivanja. Inokulacija klijanaca sirka obavljena je u fenofazi bokorenja, injektiranjem sterilnim špricom 2–3 ml suspenzije konidija, 1 cm iznad nivoa zemlje. Suspenzija konidija pripremljena je od kultura ispitivanih izolata, koje su gajene sedam dana na PDA podlozi pri temperaturi od 25°C i fotoperiodu u trajanju od 12 sati. Test osetljivosti genotipova izveden je u plastičnim saksijama prečnika 10–15 cm sa pet biljaka po saksiji. Ogled je izveden u četiri ponavljanja, četiri saksije sa po pet biljaka u saksiji koje su bile sejane u isto vreme i uniformne fenofaze razvoja. Za svaki izolat inokulisano je ukupno 20 biljaka, a kao negativna kontrola klijanci sirka inokulisani su sterilnom vodom. U cilju obezbeđenja uslova povišene vlažnosti, biljke su po inokulaciji pokrивane PVC folijom koja je nakon 2 dana uklonjena. Pojava simptoma posmatrana je do dve nedelje od inokulacije. Ogled je ponovljen dva puta, a ocena intenziteta zaraženosti klijanaca sirka izvršena je prema skali od 0 do 5:

- 0 – nema simptoma
- 1 – sitne pege na osnovi stabla
- 2 – duge pege na osnovi stabla
- 3 – jaka nekroza osnove stabla
- 4 – nekroza celog stabla
- 5 – uvenuće i sušenje celih klijanaca

Svi dobijeni rezultati statistički su obrađeni dvofaktorskom analizom varijanse po potpuno slučajnom planu sa četiri ponavljanja od po pet biljaka, dok je statistička značajnost određena Duncan testom (**Duncan**, 1955). Prvi faktor činili su genotipovi sirka sa 11 tretmana odnosno sorti ili genotipova, a drugi faktor činili su ispitivani izolati sa 13 tretmana odnosno ispitivanih izolata svrstanih u četiri morfološke grupe.

4.8.2. Ocenjivanje nivoa osetljivosti stabla sirka prema *Fusarium* spp. u poljskim uslovima

Ispitivanje osetljivosti različitih genotipova sirka obavljeno je 2010. i 2011. godine u poljskim ogledima, i to na dva načina: veštačkom inokulacijom biljaka svakog genotipa na oglednoj parceli u Bačkom Petrovcu i izlaganjem biljaka sirka prirodnim izvorima inokuluma (infestirano zemljište, zaražene biljke ili biljni delovi) na

proizvodnom usevu u Čantaviru. Na osnovu intenziteta zaraze ocenjivana je otpornost, odnosno osetljivost ispitivanih genotipova sirka.

Veštačka inokulacija. U prvoj godini ispitivanja osetljivosti genotipova sirka, u toku 2010. godine, na parceli u Bačkom Petrovcu, u ogled je uključeno četiri različita genotipa komercijalnih sorti sirka, dva genotipa sirka za zrno (hibridi 'Alba' i 'Gold') i dva genotipa sirka metlaša (sorte 'Prima' i 'Reform') čija je reakcija ispitivana u uslovima veštačkih inokulacija. Potom, u drugoj godini ispitivanja, obavljenim 2011. godine pored navedena četiri genotipa, dodatno su uključena još četiri genotipa sirka za zrno dobijena u razmeni iz SAD (linije PI656114 01 SD, PI534163 02 SD, PI595720 02 SD i PI576382 03 SD), koji su opisani kao otporni na vrste i forme roda *Fusarium*. Za ova dvogodišnja ispitivanja korišćeni su izolati dve različite vrste iz roda *Fusarium*, koje su redovno bile izolovane iz zaraženog materijala sirka u Srbiji i to: *F. equiseti* (286–09) i *F. proliferatum* (297a–09).

Setva gajenog sirka obavljena je 25.04.2010. u prvoj godini ispitivanja i 28.04.2011. u drugoj godini, na međurednom rastojanju 70 cm, sa razmakom između biljaka u redu kod sirka za zrno 8 cm, a kod sirka metlaša 12 cm. Za postavljanje ogleda u polju svaka sorta sejana je po tri reda, dužine 20 m, u tri ponavljanja. Priprema zemljišta i nega useva u toku vegetacije obavljena je prema uobičajenim agrotehničkim merama i svodila se na redovnu međurednu obradu i hemijsko suzbijanje korova.

Veštačka inokulacija sirka zasnivala se na povređivanju stabla direktnim unošenjem patogena u tkivo domaćina ubodom inokulisanih čačkalica. Prema modifikovanoj metodi koju je opisao **Chambers** (1988) okrugle, drvene čačkalice najpre su prokuvane 20 min u vodi i prosušene, a potom su potopljene u buljon (20 g sveže očišćenog krompira; 20 g mrkve i 1 l destilovane vode) u trajanju od 12 h. Nakon toga, čačkalice su složene u čašu i sterilisane autoklaviranjem pri 121°C i pritisku od 121,6 Pa. Po hlađenju, sterilisane čačkalice inokulisane su fragmentima kolonija odgovarajućih vrsta i inkubirane 14 dana pri temperaturi od 25°C i fotoperiodu u trajanju od 12 sati. Tako pripremljenim inokulumom obavljene su veštačke inokulacije po 20 biljaka svakog ispitivanog genotipa u tri ponavljanja (ukupno 60 biljaka) sa svakim od dva ispitivana izolata. Za inokulacije su odabrane biljke sirka ujednačenog porasta i iste fenofaze razvoja. Kod kontrolnih biljaka primenjen je isti postupak, a

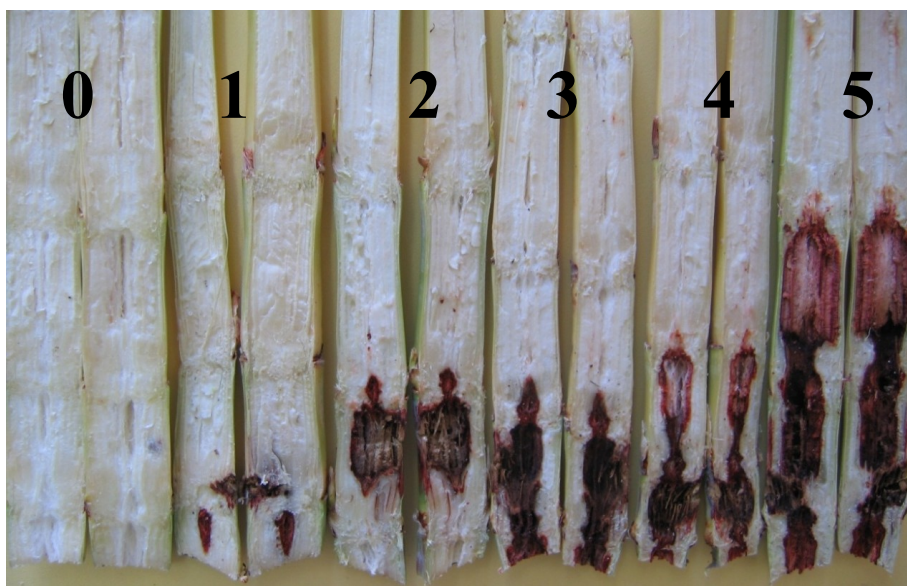
inokulacije su obavljene samo sterilisanim čačkalicama. Inokulacija stabla sirka obavljena je dva dana nakon metličanja (23.07.2010. odnosno 15.07.2011.) unošenjem inokuluma u sredinu druge internodije iznad površine zemljišta. Ocenjivanje stepena osetljivosti izvršeno je 60 dana od inokulacije (27.09.2010. odnosno 09.09.2011.), na osnovu prisustva i veličine površine tkiva zahvaćenog nekrozom. U fazi tehnološke zrelosti sirka inokulisani prizemni delovi stabla su sakupljeni, obeleženi i transportovani u laboratoriju Katedre za Fitopatologiju, Univerziteta u Beogradu–Poljoprivredni fakultet gde je ocenjen intenzitet zaraze genotipova. Inokulisane biljke sirka prvo su ocenjene prema stepenu zaraženosti površine stabla, a potom uzdužno presečene i ocenjene prema površini nekroze, odnosno prema skali od 0 do 5 (slika 1 i 2), (**Hooker**, 1957):

- 0 – bez širenja nekroze
- 1 – nekroza manja od 1 cm
- 2 – nekroza zahvata 1/3 internodije
- 3 – nekroza zahvata 1/2 internodije
- 4 – cela internodija je nekrotirana
- 5 – nekroza prelazi u okolne internodije

Svi dobijeni rezultati statistički su obrađeni dvofaktorskom analizom varijanse po potpuno slučajnom planu sa tri ponavljanja od po 20 biljaka po svakom genotipu, dok je statistička značajnost određena Duncan testom (**Duncan**, 1955). U prvoj godini postavljanja ogleda (2010.), prvi faktor činio je genotip sirka sa četiri tretmana, odnosno genotipa, a drugi faktor činio je ispitivani izolat gljive sa tri tretmana, odnosno dve vrste *F. equiseti* (286–09) i *F. proliferatum* (297a–09) i kontrola. U drugoj godini, prvi faktor činio je genotip sirka sa osam tretmana odnosno genotipova, a drugi faktor ispitivani izolat gljive sa tri tretmana, odnosno izolati vrste *F. equiseti* (286–09) i *F. proliferatum* (297a–09) i kontrola.



Slika 1. Spoljašnji izgled inokulisane internodije i skala od 0 do 5 za ocenjivanje osetljivosti stabla gajenog sirka prema *Fusarium* spp.



Slika 2. Uzdužni presek inokulisane internodije i skala od 0 do 5 za ocenjivanje osetljivosti stabla gajenog sirka prema *Fusarium* spp.

Prirodna zaraza. U polju na lokalitetu Čantavir, u toku dve proizvodne vegetacije (2010. i 2011. godine), u uslovima prirodne infekcije ocenjivana je osetljivost dva genotipa sirka za zrno (hibridi 'Alba' i 'Gold') i dva genotipa sirka metlaša (sorte 'Prima' i 'Reform'). Ovo polje je odabrano jer je u toku 2009. godine, zabeležena intenzivna pojava truleži korena i prizemnog dela stabla gajenog sirka sa učestalošću pojave i štetama koje su procenjene na oko 90%. Na odabranom delu parcele, cele zaražene biljke sirka su usitnjene i tako dobijeni biljni ostaci ostavljeni da prezime u prirodnim

uslovima. Na zemljištu pripremljenom na uobičajen način, setva sirka obavljena je 25.04.2010. u prvoj godini ispitivanja, odnosno 28.04.2011. u drugoj godini, na međurednom rastojanju 70 cm, sa razmakom između biljaka u redu kod sirka za zrno 8 cm, a kod sirka metlaša 12 cm. Svaka sorta sejana je po tri reda, dužine 20 m. Priprema zemljišta i nega useva u toku vegetacije obavljena je prema uobičajenim agrotehničkim merama i svodila se na redovnu međurednu obradu i hemijsko suzbijanje korova.

U fazi tehnološke zrelosti (27.09.2010. godine, odnosno 09.09.2011.godine), od svakog genotipa i sirka za zrno ('Alba' i 'Gold') i sirka metlaša ('Prima' i 'Reform'), sakupljeno je 60 slučajno odabranih stabala kretanjem po eksperimentalnom polju po "cik-cak" modelu. Od sakupljenih biljaka svakog genotipa, odvojen je prizemni deo stabla, obeležen i transportovan u laboratoriju Katedre za Fitopatologiju, Univerziteta u Beogradu–Poljoprivredni fakultet gde je ocenjivana reakcija genotipova na uslove prirodne zaraze. Biljke sirka prvo su vizuelno ocenjene prema stepenu zaraženosti površine stabla, a potom uzdužno presečene i ocenjene prema površini nekroze, odnosno prema skali od 0 do 5 (**Hooker**, 1957):

- 0 – bez širenja nekroze
- 1 – nekroza manja od 1 cm
- 2 – nekroza zahvata 1/3 internodije
- 3 – nekroza zahvata 1/2 internodije
- 4 – cela internodija je nekrotirana
- 5 – nekroza prelazi u druge internodije

Svi dobijeni rezultati statistički su obrađeni dvofaktorskom analizom varijanse po potpuno slučajnom planu sa ukupno 60 biljaka, odnosno ponavljanja po svakom genotipu, dok je statistička značajnost određena Duncan testom (**Duncan**, 1955). U obe godine postavljanja ogleđa (2010. i 2011.), prvi faktor činila je godina ispitivanja, a drugi faktor činio je genotip sirka sa četiri tretmana odnosno genotipa uključena u ispitivanja.

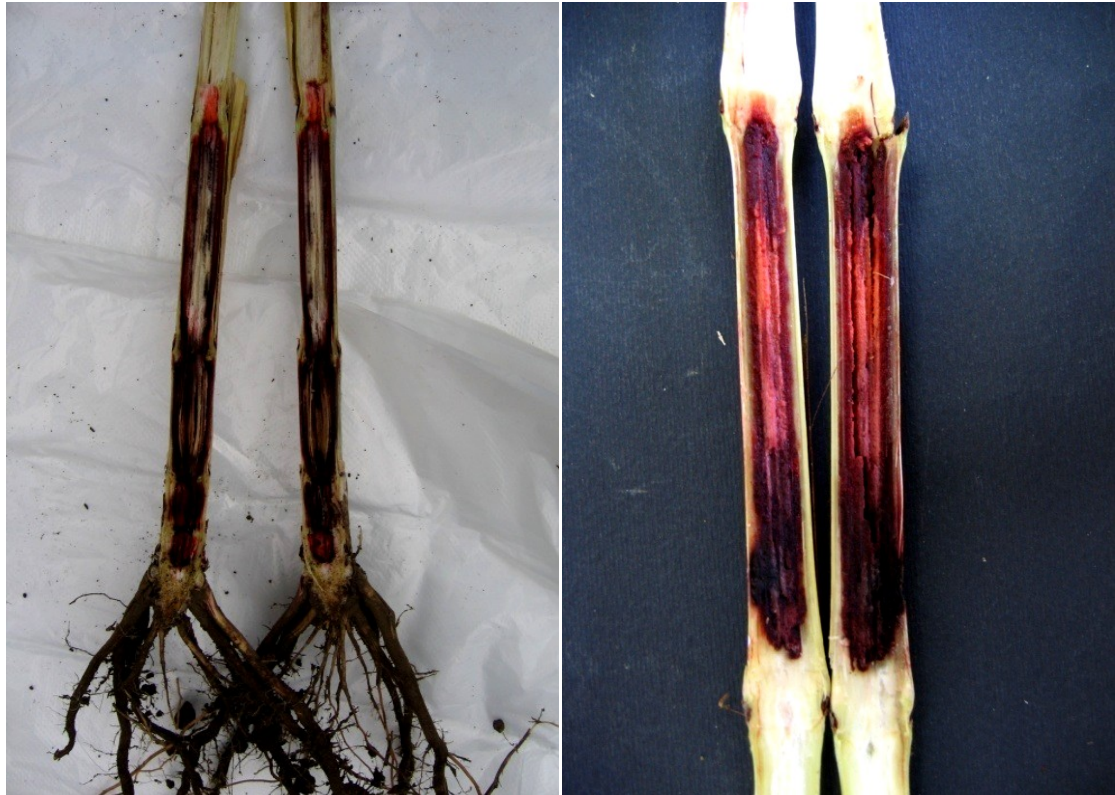
5. REZULTATI

5.1. Simptomi bolesti na biljkama u polju

Prikupljanje uzoraka biljaka gajenog sirka, obavljeno je tokom trogodišnjeg perioda od 2009. do 2011. godine. Tokom pregleda četiri lokaliteta gajenja sirka u Vojvodini, ogledne parcele sirka u Bačkom Petrovcu i proizvodnih useva u Senti, Novom Žedniku i Čantaviru u 2009. i 2010. godini zabeležena je intenzivna pojava simptoma fuzariozne truleži korena i stabla. Intenzitet zaraze pregledanih useva sirka, sorti 'Prima' i 'Reform' u Čantaviru bio je veoma visok, a sušenje i brzo propadanje zaraženih biljaka rezultiralo je procenjenim gubicima od preko 90%. Usled jake pojave bolesti došlo je do prevremenog sazrevanja, lomljenja i poleganja biljaka što je otežalo ili potpuno onemogućilo žetvu (slika 3). Zaražene biljke ispoljavale su simptome prvenstveno na prizemnom delu stabla u vidu mrkih pega, koje su se dalje širile na okolne internodije, a u okviru pega ponegde su se javljali koncentrični krugovi. Na glavnom korenu i bočnim korenčićima simptomi su se ispoljavali pojavom ružičaste boje, dok je kod jačih zaraza korenov sistem u većoj meri bio razoren. Takve biljke su se lako čupale iz zemlje. Na uzdužnom preseku obolelog tkiva uočena je dezorganizovana srž tamnomrke ili ružičaste boje (slika 4). Pri jačem napadu nekroza je zahvatila veći broj nodusa, pa čak i celo stablo koje je izgubilo čvrstinu i pleglo. Brojne crvene pege uočene su na lisnom rukavcu, listu, metlici i zrnu gajenog sirka. Na zaraženim metlicama i zrnu hibrida 'Alba' i 'Gold', kao i sorti 'Prima' i 'Reform' uočena je nekroza tkiva prekrivena micelijском prevlakom tamnožute do narandžaste ili crvenkaste boje. Zaražena zrna su smežurana, prožeta micelijom i slabije klijavosti (slika 5).



Slika 3. Izgled zaraženih i pleglih biljaka sirka



Slika 4. *Fusarium* spp.: Koren i prizemni deo stabla zaraženih biljaka sirka za zrno



Slika 5. *Fusarium* spp.: Metlice i zrno zaraženih biljaka sirka za zrno hibrida 'Alba' (levo) i 'Gold' (desno)

5.2. Izolacija patogena i dobijanje monosporijalnih izolata

Izolacijom fitopatogenih gljiva iz zaraženih biljaka i iz semena izdvojen je veći broj izolata koji su grupisani po poreklu i poslužili su za dobijanje monosporijalnih izolata sa kojima je nastavljen dalji rad.

Posle inkubacije u trajanju od 7–10 dana, oko fragmenata su se razvijale kolonije gljiva koje su presejavane na CLA i poslužile za dobijanje monosporijalnih izolata. Iz čistih kultura gljiva, pripremane su suspenzije konidija i obavljeno je zasejavanje na WA podlogu. U 16 pregledanih uzoraka semena, ustanovljene su mešane zaraze gljivama iz rodova *Fusarium*, *Alternaria* i *Epicoccum*, koji su bili prisutni u svim uzorcima, dok je prosečan nivo zaraze bio 8,82; 5,03 odnosno 2,0% (tabela 4). U po pet uzoraka detektovane su i vrste iz rodova *Aspergillus* u prosečnom nivou zaraze od 0,78% i *Penicillium* 1,62%. Zaraza semena sirka sa *Fusarium* spp. kretala se od 2,3–19,7%, ili u proseku 8,82%.

Ovim postupkom dobijeno je ukupno 48 monosporijalnih izolata *Fusarium* spp., i to iz prizemnog dela stabla sirka 27 i iz semena 21.

Tabela 4. Intenzitet zaraze semena različitih sorti sirka u periodu od 2009–2011. godine

Lokalitet	Sorta	Godina	<i>Alternaria</i> spp.	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Epicoccum</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.
B. Petrovac	'Alba'	2009	2,0*	0	2,0	3,6	0
B. Petrovac	'Gold'	2009	2,0	0	2,0	6,0	0
B. Petrovac	'Prima'	2009	4,0	0	2,4	17,9	0
B. Petrovac	'Reform'	2009	5,0	0	3,0	7,5	0
Čantavir	'Alba'	2009	12,6	1,5	2,6	8,8	6,9
Čantavir	'Gold'	2009	6,4	1,8	2,1	6,0	11,2
B. Petrovac	'Alba'	2010	1,3	0	1,2	2,3	0
B. Petrovac	'Gold'	2010	2,7	0	2,0	13,8	0
B. Petrovac	'Prima'	2010	6,2	0	2,0	3,0	0
B. Petrovac	'Reform'	2010	5,3	0	1,7	2,5	0
Čantavir	'Alba'	2010	2,0	2,4	2,1	3,6	0,9
Čantavir	'Gold'	2010	3,0	3,8	1,9	12,2	2,7
B. Petrovac	'Alba'	2011	8,8	0	2,0	19,7	0
B. Petrovac	'Gold'	2011	7,6	0	0,6	15,2	0
Čantavir	'Prima'	2011	2,4	3,0	2,0	11,3	4,2
Čantavir	'Reform'	2011	9,2	0	2,4	7,8	0
Prosek:			5,0	0,8	2,0	8,8	1,6

*Prosečan % zaraze semena sirka određen iz četiri ponavljanja po 100 semena po uzorku

5.3. Izolati odabrani za dalja proučavanja

Izolacijom fitopatogenih gljiva iz zaraženih biljaka sirka u polju i iz zaraženog semena, izdvojeno je ukupno 48 izolata *Fusarium* spp. kojima je potvrđena patogenost veštačkim inokulacijama klijanaca sirka. Tokom izolacije i gajenja za proveru patogenosti uočena su izvesna morfološka svojstva (tip konidiofora ili fialida, oblik konidija i broj pregrada) koja su bila zajednička za pojedine izolate, na osnovu čega su oni grupisani (tabela 5). Kako dalja proučavanja nije bilo moguće nastaviti sa svim izolatima zbog njihovog velikog broja, pristupilo se odabiru pojedinih koji su razvrstani po poreklu i sličnosti sa standardnim izolatima iz kolekcije poreklom iz Australije (Botanic Gardens Trust, Plant Pathology, Sydney) u pet osnovnih morfoloških grupa. Od 48 izolata, odabrano je 10 izolata karakterističnih za *Fusarium* spp. i tri izolata slična *Fusarium* vrstama. Izolati su podeljeni u pet morfoloških grupa: *Fusarium* spp. grupa I sa jednim izolatom (286-09); *Fusarium* spp. grupa II sa pet izolata (297a-09, 13-10, 521-10, 522-10 i 530-10); *Fusarium* spp. grupa III sa tri izolata (532-10, 535-10 i 536-10); *Fusarium* spp. grupa IV sa jednim izolatom (808-11) i tri izolata slična *Fusarium* spp. grupa V (291-09, 315-09 i 539-10). Odabrani izolati međusobno su upoređivani u cilju pravilne identifikacije i određivanja njihovog taksonomskog međuodnosa.

Tabela 5. Grupisanje ispitivanih izolata *Fusarium* spp. na osnovu morfoloških svojstava

Grupa				Tip fijalida		Tip konidija		Hlamidospore
				monofijalide	polifijalide	Mikrokonidije	Makrokonidije	
	Oznaka izolata	Deo biljke sirka iz koje je gljiva izolovana	Boja kolonije			Oblik i broj pregrada	Oblik i broj pregrada	
I	286-09 RBG851*	prizemni deo stabla /	bela do žutosmeđa	+	-	-	srpaste, 3-7	+
			bela do žutosmeđa	+	-	-	srpaste, 3-7	+
II	297a-09 13-10 521-10 522-10 530-10 RBG5349*	prizemni deo stabla seme prizemni deo stabla prizemni deo stabla prizemni deo stabla /	bela do ružičasta	+	+	ovalne, 0-1	duge, blago srpaste, 3-5	-
			bela do ružičasta	+	+	ovalne, 0-1	duge, blago srpaste, 3-5	-
			bela do ružičasta	+	+	ovalne, 0-1	duge, blago srpaste, 3-5	-
			bela do ružičasta	+	+	ovalne, 0-1	duge, blago srpaste, 3-5	-
			bela do ružičasta bela do ružičasta	+	+	ovalne, 0-1 ovalne, 0-1	duge, blago srpaste, 3-5 duge, blago srpaste, 3-5	- -
III	532-10 535-10 536-10	prizemni deo stabla prizemni deo stabla prizemni deo stabla	ružičasta	+	-	-	prave do umereno srpaste, 4-5	+
			ružičasta	+	-	-	prave do umereno srpaste, 4-5	+
			ružičasta	+	-	-	prave do umereno srpaste, 4-5	+
IV	808-11 RBG5255*	seme /	bledonarandžasta	+	-	ovalne do jajaste, 0-2	prave do blago savijene, 3-5	-
			bledonarandžasta	+	-	ovalne do jajaste, 0-2	prave do blago savijene, 3-5	-
V	291-09 315-09 539-10	seme seme seme	žutosmeđa do narandžasta	-	-	-	sferične, brojne septe	-
			žutosmeđa do narandžasta	-	-	-	sferične, brojne septe	-
			žutosmeđa do narandžasta	-	-	-	sferične, brojne septe	-

*Referentni izolati *Fusarium* spp.

5.4. Provera patogenosti

Infektivnost 13 odabranih monosporijalnih izolata *Fusarium* spp. ispitana je na osnovu veštačke inokulacije klijanaca obe gajene forme, sirka za zrno (hibridi 'Alba' i 'Gold') i sirka metlaša (sorte 'Prima' i 'Reform') u uslovima staklenika, kao i inokulacije klijanaca u epruvetama u laboratorijskim uslovima. Ispitivani izolati ispoljili su sposobnost da ostvare zaraze sirka čime je potvrđena njihova patogenost u obe metode veštačkih inokulacija.

Provera patogenosti odabranih izolata obavljena je tako što su u uslovima postavljenog eksperimenta reprodukovani simptomi prirodne infekcije. Svih 13 ispitivanih izolata podeljenih u pet grupa: grupa I (286–09); grupa II (297a–09, 13–10, 521–10, 522–10 i 530–10); grupa III (532–10, 535–10 i 536–10); grupa IV (808–11) i grupa V (291–09, 315–09 i 539–10) prouzrokovalo je reakciju na klijanacima sirka metlaša sorte 'Prima' i 'Reform', ali ne i na klijanacima hibrida za zrno 'Alba' i 'Gold', kod kojih nije došlo do pojave simptoma (tabela 6). Prve promene tkiva na stablu sirka, koje je veštački inokulisano suspenzijom konidija, uočene su oko mesta inokulacije već nakon 3–5 dana. U početku razvoja simptoma uočena je pojava crvenkastosmeđih sitnih pega u osnovi stabla (slika 6). Jasno vidljive promene boje vaskularnog tkiva, primarnog korena i čvora bokorenja uočene su sedam dana nakon inokulacije (slika 7a). Nakon dve nedelje izolati I, II, III i IV grupe prouzrokovali su potpuno sušenje i propadanje inokulisanih klijanaca sorte 'Prima' i 'Reform', dok su izolati V grupe takođe prouzrokovali potpuno sušenje klijanaca sorte 'Reform', a slabiju nekrozu u vidu sitnih do dugih pega oko mesta inokulacije na klijanacima sorte 'Prima'. Na biljkama koje su kao negativna kontrola tretirane sterilnom vodom, nije došlo do pojave simptoma, niti bilo kakvih promena (slika 7b). Reizolacija patogena sa svih veštački inokulisanih biljaka na kojima su reprodukovani simptomi, obavljena je istim metodama kao i pri izolaciji, čime su zadovoljeni osnovni Kohovi postulati. Dobijeni reizolati po izgledu micelije i morfologiji reproduktivnih organa u potpunosti su odgovarali izvornim izolatima.

Tabela 6. Grupisanje ispitivanih izolata *Fusarium* spp. na osnovu ocene patogenosti u uslovima staklenika

Grupa	Genotip	'Alba'	'Gold'	'Prima'	'Reform'
	Izolot				
I	286-09	-	-	+	+
	297a-09	-	-	+	+
II	13-10	-	-	+	+
	521-10	-	-	+	+
	522-10	-	-	+	+
	530-10	-	-	+	+
III	532-10	-	-	+	+
	535-10	-	-	+	+
	536-10	-	-	+	+
IV	808-11	-	-	+	+
V	291-09	-	-	±	+
	315-09	-	-	±	+
	539-10	-	-	±	+
	kontrola	-	-	-	-

(+) pozitivna reakcija, pojava crvenkastosmeđih pega u osnovi stabla ili sušenje klijanaca; (-) negativna reakcija, na inokulisanom stablu nisu se pojavile pege; (±) pojava pojedinačnih pega na inokulisanom stablu



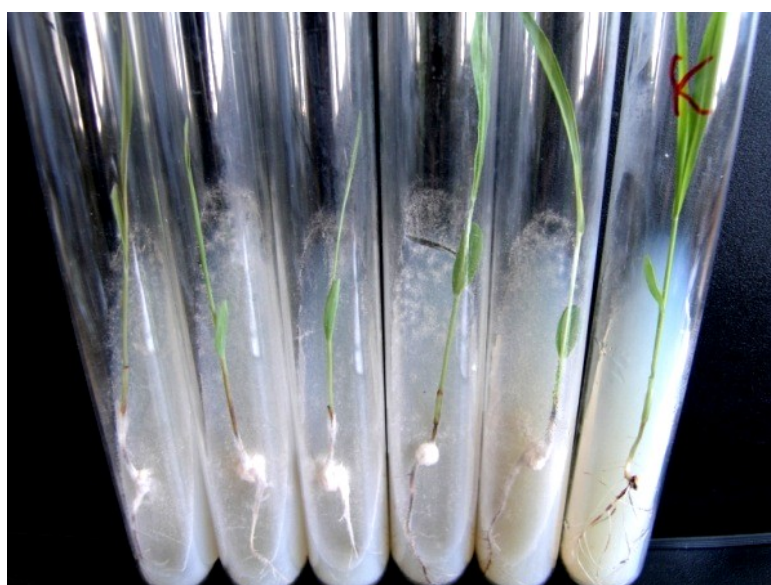
Slika 6. Izolat 297a-09: Crvenkastosmeđe pege u osnovi stabla sirka sorte 'Prima' nakon veštačke inokulacije u stakleniku



Slika 7. Izgled nekroze primarnog korena (a) i negativna kontrola (b)

Test provere patogenosti na klijancima sirka u uslovima *in vitro*, u epruveti sa Knopovom podlogom takođe je obavljen uspešno. Svih 13 ispitivanih izolata podeljenih u pet grupa: grupa I (286-09); grupa II (297a-09, 13-10, 521-10, 522-10 i 530-10); grupa III (532-10, 535-10 i 536-10); grupa IV (808-11) i grupa V (291-09, 315-09 i 539-10) prouzrokovalo je reakciju na klijancima sirka metlaša sorte 'Prima' i 'Reform',

kao i na klijancima hibrida za zrno 'Alba' i 'Gold'. Nakon pet dana od inokulacije izolati I, II, III, IV i V grupe prouzrokovali su promenu boje tkiva i pojavu nekrotičnih pega na korenu i prizemnom delu stabla sorte 'Prima' i 'Reform', koje su se širile prema listovima i gornjem delu stabla (slika 8). Koren, stablo i list bili su potpuno zahvaćeni micelijom gljive, nakon 10 dana. Ispitivani izolati prouzrokovali su slabiju nekrozu u vidu crvenkastosmeđih sitnih pega na korenu i u osnovi stabla klijanaca hibrida 'Alba' i 'Gold'. Na klijancima koji su poslužili kao negativna kontrola koji su postavljeni na čvrstu podlogu bez gljive, nije došlo do pojave simptoma.



Slika 8. Izolat 297a-09: Izgled nekrotičnih klijanaca sirka u *in vitro* uslovima

5.5. Morfološka svojstva anamorfa

Morfološka svojstva fitopatogenih gljiva predstavljaju važan taksonomski karakter i koriste se u njihovoj identifikaciji. U okviru proučavanja morfoloških svojstava kolonija svih 13 odabranih izolata, proučavana su njihova makroskopska (izgled i boja kolonija, pigmentacija podloge) i mikroskopska svojstva (utvrđivanje tipa konidiofora ili fialida, oblik i dimenzija makrokonidija, prisustvo ili odsustvo mikrokonidija i hlamidospora).

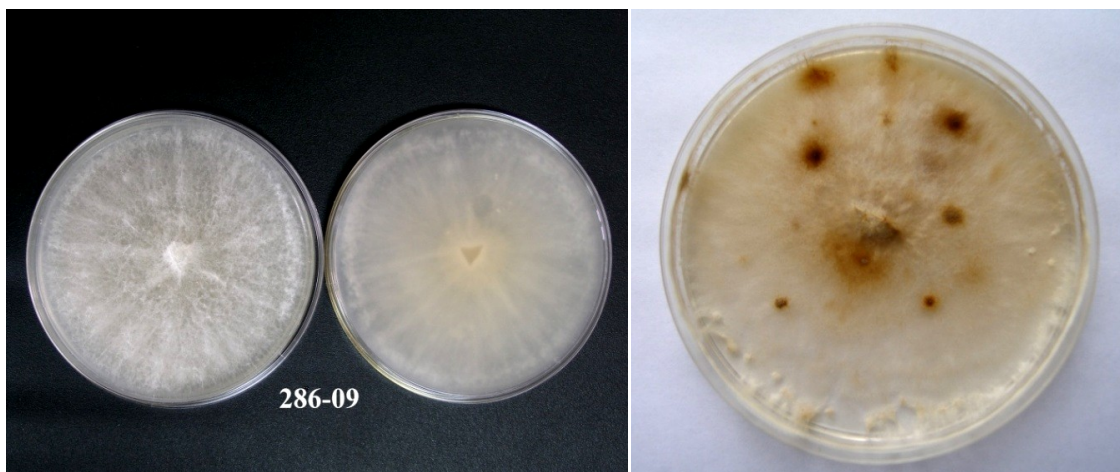
Makroskopska svojstva. Tokom ispitivanja morfoloških makroskopskih svojstava 13 izolata *Fusarium* spp. poreklom iz sirka, pokazalo se da se izolati po važnijim svojstvima mogu grupisati u pet grupa. Posle sedam dana porasta na podlozi PDA pri temperaturi 25°C, izgled kolonija ispitivanih izolata značajno se razlikovao (tabela 7).

Tabela 7. Grupisanje ispitivanih izolata *Fusarium* spp. na osnovu važnijih morfoloških makroskopskih svojstava

Grupa	Oznaka izolata	Tip porasta	Izgled površine kolonije	Pigmentacija podloge	Prečnik kolonija (cm) nakon 7 dana
I	286-09 RBG851*	Porast brz i ravnomeran	Obilna, pamučasta, bela do žutosmeđa	Luči pigment bež boje	7 cm
II	297a-09 13-10 521-10 522-10 530-10 RBG5349*	Porast brz i ravnomeran	Pamučasta, bela do ružičasta, a tamno ljubičasta u starijim kulturama	Luči pigment narandžaste, tamnoljubičaste ili crne boje	7 cm
III	532-10 535-10 536-10	Porast brz i ravnomeran	Gusta, pamučasta, ružičaste do ljubičastožućkaste boje s belom do crvenom ivicom	Luči pigment karmin crvene boje	8 cm
IV	808-11 RBG5255*	Porast srednje brz i ravnomeran	Pamučasta, bela do bledonarandžasta	Luči pigment narandžaste boje	6 cm
V	291-09 315-09 539-10	Porast brz i ravnomeran	Gusta, pamučasta, žutosmeđe do narandžaste boje	Luči pigment narandžaste boje	6 cm

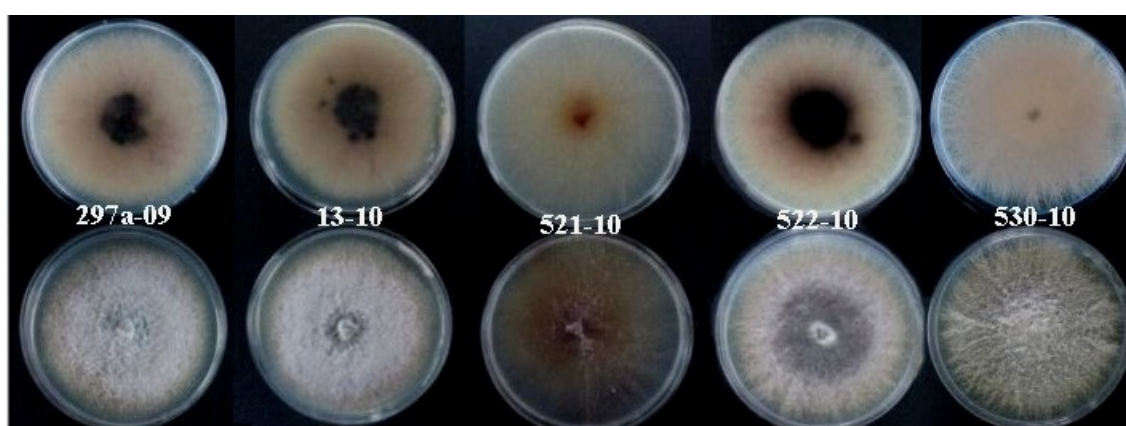
*Referentni izolati *Fusarium* spp.

Na osnovu važnijih morfoloških makroskopskih svojstava prvu grupu čini izolat 286-09 koji morfološki odgovara referentnom izolatu *F. equiseti* (RBG851). Kolonije ovog izolata ispoljile su brz i ravnomeran porast, prečnika 7 cm nakon sedam dana inkubacije u tami pri 25°C. Vazдушna micelija je obilna, ujednačeno pamučasta, bela do žutosmeđe boje (slika 9). Ovaj izolat lučio je u podlogu pigment bež boje i obično je formirao tamnosmeđe mrlje u kulturama starijim od 15 dana.



Slika 9. *Fusarium* spp. grupa I: Izgled kolonije

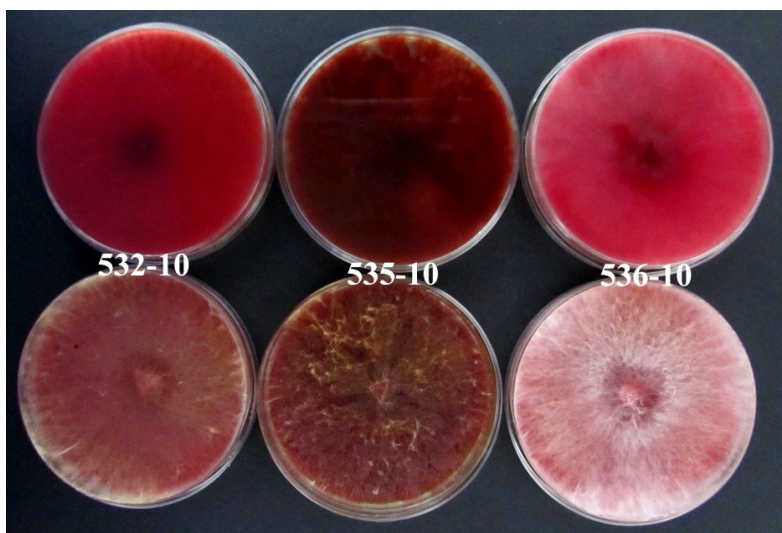
Izolati druge grupe (297a-09, 13-10, 521-10, 522-10 i 530-10) po svojim makroskopskim svojstvima ispoljili su najveću sličnost sa izolatom (RBG5349), koji je prethodno identifikovan od strane **Summerell** (lična komunikacija) kao *F. proliferatum* i poslužio je kao standard u ovim ispitivanjima. Micelija izolata ove grupe rasla je veoma brzo i obrazovala je na PDA podlozi kolonije prečnika 7 cm nakon sedam dana inkubacije u tami pri 25°C. Vazдушna micelija je pamučasta, bela do ružičasta, a tamno ljubičasta u starijim kulturama (slika 10). Ovi izolati lučili su pigment i bojili podlogu nakon 10 dana. Pigment u podlozi je narandžast, tamnoljubičast ili skoro crn.



Slika 10. *Fusarium* spp. grupa II: Izgled kolonija

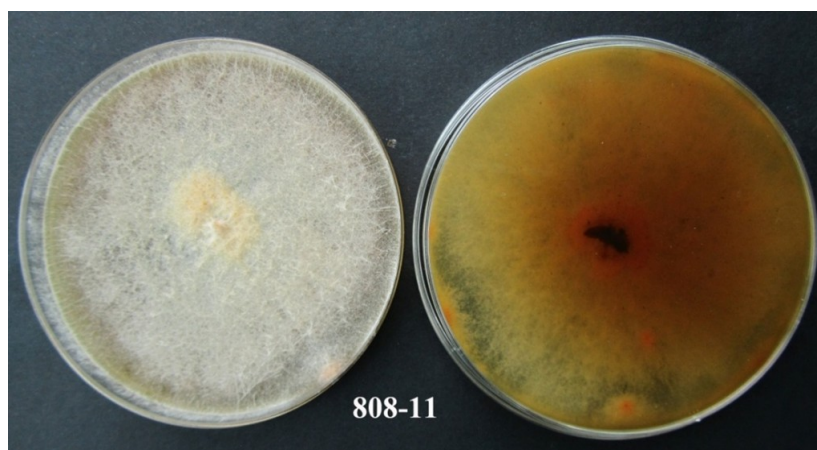
Po svojim morfološkim svojstvima izdvojila se i treća grupa izolata, i to 532-10, 535-10, 536-10 koja je morfološki slična literaturnim navodima za vrstu *F. graminearum*. Kolonije reprezentativnih izolata ispoljile su brz i ravnomeran porast na PDA podlozi, prečnika 8 cm nakon sedam dana inkubacije u tami pri 25°C. Vazдушna

micelija je gusta, pamučasta, ružičasta do ljubičastožučkasta s belom do crvenom ivicom (slika 11). Ovi izolati obično su lučili pigment karmin crvene boje u podlogu, nakon 10 dana.



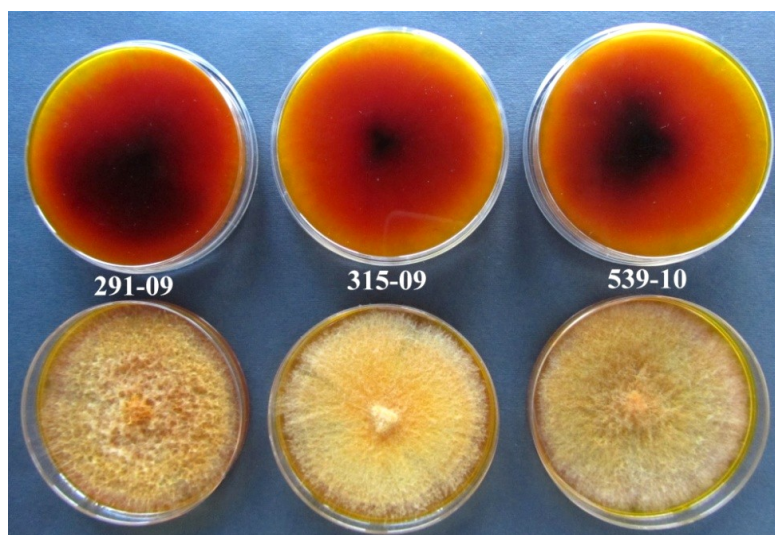
Slika 11. *Fusarium* spp. grupa III: Izgled kolonija

U četvrtu grupu svrstan je izolat 808-11 koji je morfološki nasličniji standardu *F. thapsinum* (RBG5255) i od svih ostalih grupa izolata razlikuje se po specifičnom tipu porasta na PDA i žutim pigmentom podloge (slika 12). Micelija ovog izolata raste srednje brzo i obrazuje kolonije prečnika 6 cm nakon sedam dana inkubacije u tami pri 25°C. Bela do bledonarandžasta vazдушna micelija prekriva polovinu središnjeg dela kolonije. Ovaj izolat luči karakterističan žuti i narandžast pigment nakon sedam dana i obrazuje kratke i mrke pruge, koje se radijalno šire od središta kolonije.



Slika 12. *Fusarium* spp. grupa IV: Izgled kolonije

Petu grupu čine izolati sa oznakama 291-09, 315-09 i 539-10 (izolati slični *Fusarium* spp.) koji su se izdvojili od ostalih proučavanih izolata formirajući grupu koja je morfološki po izgledu i boji kolonija dovedena u vezi sa izgledom kolonija vrsta *Fusarium* spp. Kolonija sva tri izolata je gusta, vunasta, intenzivno žute boje sa lica i narandžaste do tamno crvene boje sa naličja, okružena belom kompaktnom micelijom nepravilnih margina (slika 13). Porast kolonije na PDA podlozi bio je brz i ravnomeran i nakon sedam dana inkubacije u tami pri 25°C, veličina kolonije je iznosila 6 cm. Posle inkubacije u trajanju od 3-5 dana, kod svih izolata uočeno je da luče žuti pigment i eksudat, tako da podloga poprima žutu boju.



Slika 13. Izolati slični *Fusarium* spp. grupa V: Izgled kolonija

Mikroskopska svojstva. Proučavanje morfoloških mikroskopskih svojstava pojedinih struktura gljiva, odnosno utvrđivanje tipa konidiofora ili fjalida (monofjalida i polifjalida), oblika i dimenzija makrokonidija, kao i prisustva ili odsustva mikrokonidija i hlamidospora koje formiraju ispitivani izolati, ukazalo je na grupisanje svih 13 odabranih izolata *Fusarium* spp. u pet morfoloških grupa (tabela 8). Usporedne prosečne dimenzije merenih parametara na konidijama svih izolata uključenih u ispitivanja prikazane su u tabeli 9.

Tabela 8. Grupisanje ispitivanih *Fusarium* spp. na osnovu morfoloških mikroskopskih struktura

Grupa	Oznaka izolata	Raspored konidija					Tip fialida		Tip konidija		Hlamidospore
		Nizovi konidija**							Mikrokonidije	Makrokonidije	
		kratki (<15)	dugi (>30)	linearni	glavice	lažne glavice	monofijalide	polifijalide	oblik i broj pregrada	oblik i broj pregrada	
I	286-09	-	-	-	-	-	+	-	-	srpaste, 3-7	+
	RBG851*	-	-	-	-	-	+	-	-	srpaste, 3-7	+
II	297a-09	-	+	-	-	+	+	+	ovalne, 0-1	blago srpaste, 3-5	-
	13-10	-	+	-	-	+	+	+	ovalne, 0-1	blago srpaste, 3-5	-
	521-10	-	+	-	-	+	+	+	ovalne, 0-1	blago srpaste, 3-5	-
	522-10	-	+	-	-	+	+	+	ovalne, 0-1	blago srpaste, 3-5	-
	530-10	-	+	-	-	+	+	+	ovalne, 0-1	blago srpaste, 3-5	-
	RBG5349*	-	+	-	-	+	+	+	ovalne, 0-1	blago srpaste, 3-5	-
III	532-10	-	-	-	-	-	+	-	-	prave do umereno srpaste 4-5	+
	535-10	-	-	-	-	-	+	-	-	prave do umereno srpaste 4-5	+
	536-10	-	-	-	-	-	+	-	-	prave do umereno srpaste 4-5	+
IV	808-11	-	+	-	-	+	+	-	ovalne do jajaste, 0-2	prave do blago savijene, 3-5	-
	RBG5255*	-	+	-	-	+	+	-	ovalne do jajaste, 0-2	prave do blago savijene, 3-5	-
V	291-09	-	-	-	-	-	-	-	-	sferične, brojne septe	-
	315-09	-	-	-	-	-	-	-	-	sferične, brojne septe	-
	539-10	-	-	-	-	-	-	-	-	sferične, brojne septe	-

*Referentni izolati *Fusarium* spp.

**Nizovi mikrokonidija: (-) odsutni; (+) obilni

Tabela 9. Grupisanje ispitivanih izolata *Fusarium* spp. na osnovu uporednih morfoloških mikroskopskih svojstava

Grupa	Oznaka izolata	Makrokonidije						Mikrokonidije					
		Dužina (µm)			Širina (µm)			Dužina (µm)			Širina (µm)		
		min	prosek	max	min	prosek	max	min	prosek	max	min	prosek	max
I	286-09	12,50	22,54	40,00	2,50	4,10	5,00	-	-	-	-	-	-
II	297a-09	20,00	34,00	50,00	3,75	3,90	5,00	5,00	7,90	12,50	2,50	3,86	5,00
	13-10	20,00	35,55	47,50	2,50	4,15	7,50	5,00	8,00	10,00	2,50	2,50	2,50
	521-10	20,00	34,10	50,00	3,75	4,11	5,00	5,00	7,80	12,50	2,50	4,30	2,50
	522-10	22,50	29,05	40,00	3,75	3,95	5,00	5,00	8,05	12,50	2,50	4,21	5,00
	530-10	20,00	32,50	42,50	3,75	4,10	5,00	5,00	8,85	12,50	2,50	3,16	5,00
III	532-10	22,50	35,63	52,50	2,50	4,56	-	-	-	-	-	-	-
	535-10	25,00	33,85	50,00	2,50	5,18	-	-	-	-	-	-	-
	536-10	30,00	39,10	50,00	2,50	4,80	-	-	-	-	-	-	-
IV	808-11	35,00	20,90	87,50	2,50	2,03	7,50	7,50	12,25	18,75	2,50	4,45	7,50
V	291-09	12,50	17,35	27,50	12,50	17,97	30,00	-	-	-	-	-	-
	315-09	12,50	14,92	25,07	12,81	16,98	29,01	-	-	-	-	-	-
	539-10	12,50	15,49	25,64	14,16	17,72	29,75	-	-	-	-	-	-

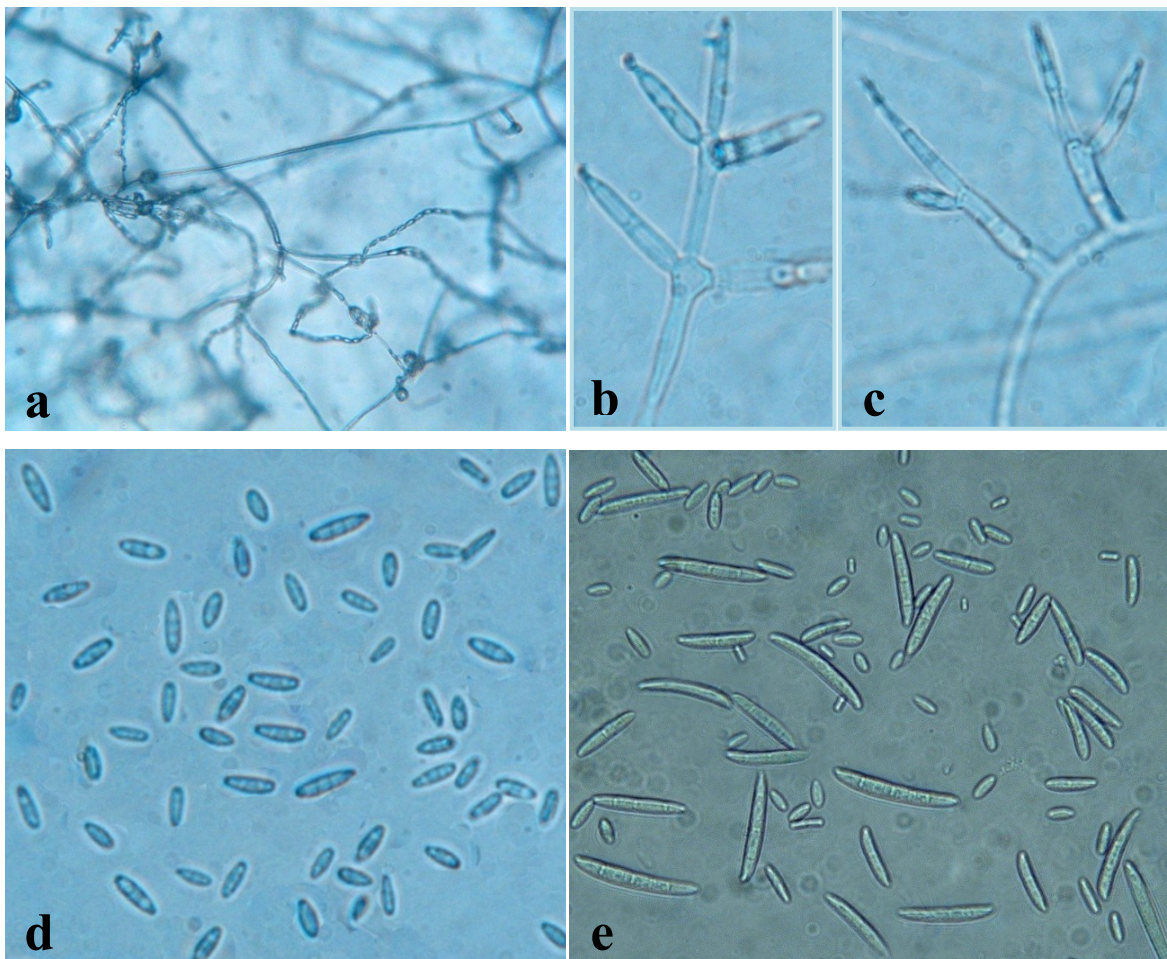
Izolat 286–09, predstavnik prve morfološke grupe u okviru proučavanih izolata, nasličniji je po mikroskopskim svojstvima standardnom izolatu RBG851, koji je determinisan kao *F. equiseti*. Kulture izolata starosti pet dana, formirale su makrokonidije. Ispitivani izolat obrazovao je konidiogene ćelije na konidioforama tipa monofijalida, kratke i u osnovi proširene. Mikrokonidije se nisu formirale, dok su obrazovane višecelijske makrokonidije srpastog oblika, karakteristične savijenosti, debelih zidova, najčešće sa 3–7 poprečnih pregrada, dimenzija 12,50–40,00 x 2,50–5,00 µm. Vršne ćelije su sužene ili šiljaste prema kraju, dok su bazalne karakterističnog oblika stopala (slika 14a). Ovaj izolat je nakon 10 dana inkubacije na CLA formirao i brojne loptaste, svetlosmeđe hlamidospore u nizovima i grupama u makrokonidijama ili u hifama vazdušne i supstratne micelije (slika 14b).



Slika 14. *Fusarium* spp. grupa I: Makrokonidije (a) i hlamidospore u makrokonidijama (b)

U drugu morfološku grupu svrstani su izolati 297a–09, 13–10, 521–10, 522–10 i 530–10, koji su bili različiti u odnosu na ostale izolate i morfološki su bili slični referentnom izolatu RBG5349, koji je prethodno identifikovan kao *F. proliferatum*. Ovi izolati su nakon pet dana razvoja na SNA podlozi formirali mikrokonidije, a na CLA podlozi makrokonidije. Konidiofore na vazdušnoj miceliji su uspravne i simpodijalno razgranate tipa monofijalida i polifijalida (slika 15a, b, c). Kod ovih izolata mikrokonidije su obrazovane iz monofilijalida i polifijalida u vidu lažnih glavica ili dugih nizova.

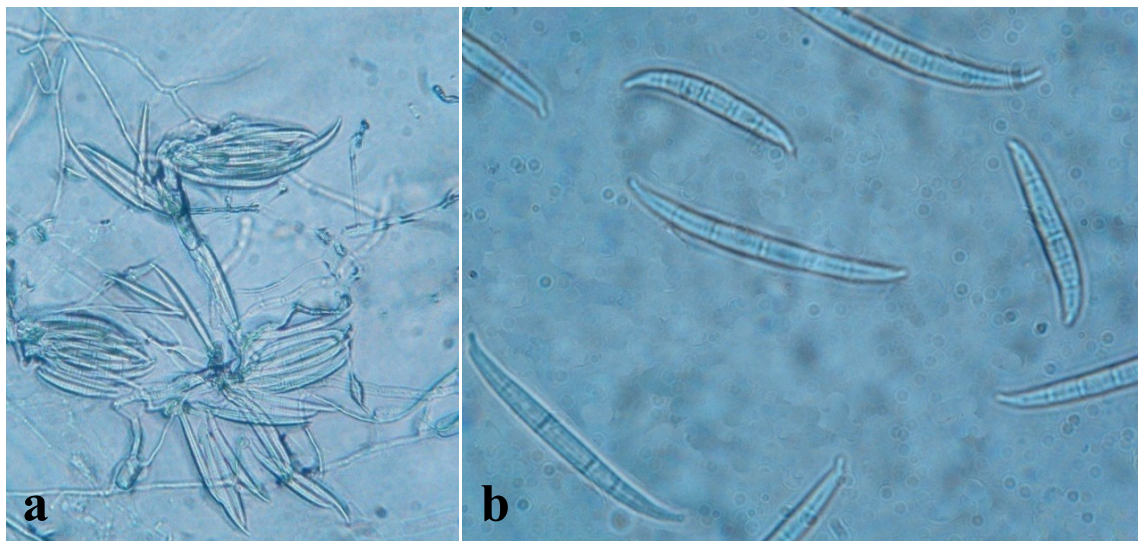
Mikrokonidije su oblika palice, u osnovi sužene, a pri vrhu proširene, jednoćelijske ili sa jednom septom (slika 15d) i njihove dimenzije su se kretale od 5,00–12,50 x 2,50–5,00 μm . Makrokonidije su blago srpaste, duge i uske sa 3–5 poprečnih pregrada, dimenzija 20,00–50,00 x 2,50–5,00 μm . Vršne ćelije su savijene, dok su bazalne slabo razvijenog oblika stopala (slika 15e). Ovi izolati nisu formirali hlamidospore.



Slika 15. *Fusarium* spp. grupa II: Mikrokonidije u nizu (a), polifijalida (b), monofijalida (c), mikrokonidije (d) i mikro- i makrokonidije (e)

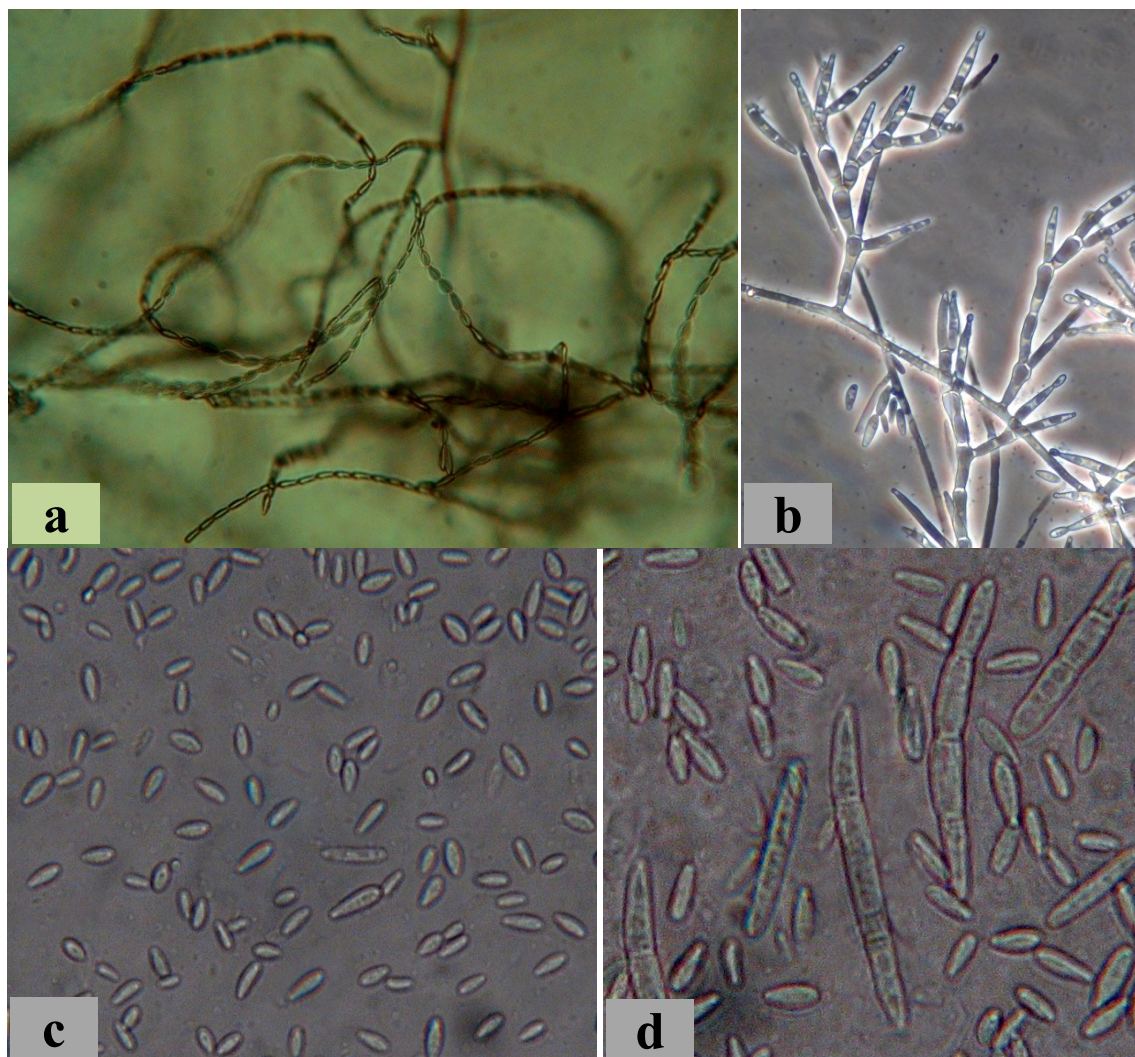
Izolati 532–10, 535–10 i 536–10 sačinjavaju treću morfološku grupu u okviru proučavanih izolata koja je slična literaturnim navodima za vrstu *F. graminearum*. Kulture izolata starosti pet dana formirale su makrokonidije. Konidiofore na vazdušnoj miceliji su tipa monofijalida razgranate u sporodohijama (slika 16a). Ovi izolati formirali su prozirne

makrokonidije, prave do umereno srpaste, debelih zidova sa četiri poprečne pregrade (slika 20), dimenzija 22,50–52,50 x 2,50–7,50 μm . Vršne ćelije su kukaste, dok su bazalne karakterističnog oblika stopala (slika 16b). Prisustvo mikrokonidija nije ustanovljeno, dok su se okrugle i bledosmeđe hlamidospore formirale u nizovima, nakon 10 dana inkubacije na CLA podlozi.



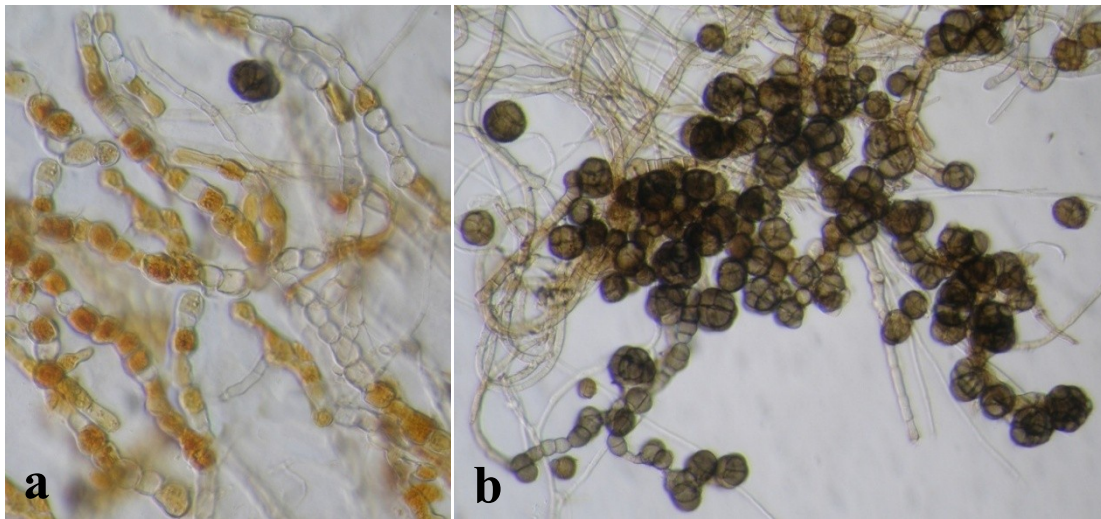
Slika 16. *Fusarium* spp. grupa III: Makrokonidije u sporodohijama (a) i makrokonidije (b)

Četvrta morfološka grupa izolata 808–11 jasno se razlikovala od ostalih proučavanih izolata iz roda *Fusarium*, a odgovara opisu *F. thapsinum* (RBG5255). Ispitivani izolat je nakon pet dana razvoja na SNA podlozi formirao mikrokonidije, a na CLA podlozi makrokonidije. Konidiofore su tipa monofijalida, razgranati u sporodohijama i nerazgranati na hifi. Mikrokonidije su obrazovane iz monofijalida u vidu lažnih glavica ili niza (slika 17a, b), različitog oblika, ovalne do jajaste, bezbojne, neseptirane ili sa 1–2 poprečne pregrade (slika 17c), dimenzija 7,50–18,75 x 2,50–7,50 μm . Makrokonidije su prave do blago savijene, sa 3–5 poprečnih pregrada, dimenzija 35,00–87,50 x 2,50–7,50 μm . Vršne ćelije su blago savijene, dok su bazalne karakterističnog oblika stopala (slika 17d). U kulturama, starim mesec dana nije utvrđeno prisustvo hlamidospora.



Slika 17. *Fusarium* spp. grupa IV: Mikrokonidije u nizu (a), monofijalide (b), mikrokonidije (c) i mikro- i makrokonidije (d)

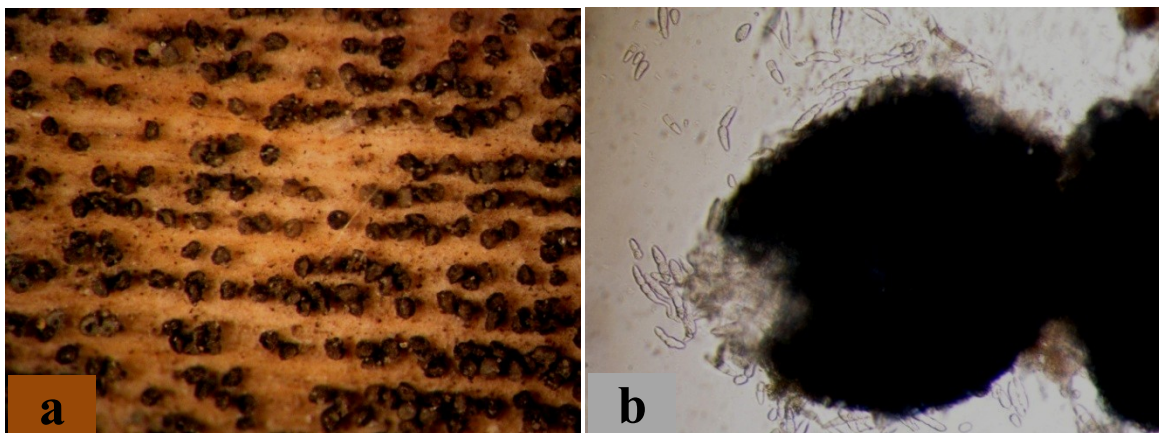
Peta grupa izolata sa oznakama 291-09, 315-09 i 539-10 značajno se razlikovala od ostalih proučavanih izolata iz roda *Fusarium*. Konidije su formirane na kratkim konidioforama koje se uzdižu sa diskretnih sporodohija (slika 18a). Konidje su gusto zbijene, sferičnog oblika i sužene pri osnovi. Potpuno razvijene konidije su smeđe boje, neravne episporije sa slabo izraženim brojnim septama (slika 18b), dimenzija 12,5–27,5 x 12,5–30 μm .



Slika 18. Grupa V: Izgled kolonije *in situ* (a) i konidije (b)

5.6. Morfološka svojstva teleomorfa (peritecija)

Tokom ispitivanja morfoloških svojstava *Fusarium* spp. *in situ*, direktno na zaraženim ostacima biljaka sirka u polju, ustanovljeno je prisustvo tvorevina polnog razmnožavanja, peritecija, formiranih u grupama na tankim stromama na površini osnove zaraženog stabla sirka (slika 19a). U dozrelim peritecijama formirali su se izduženi i zaobljeni askusi koji najčešće sadrže 4–6 askospora poređanih u nizu (slika 19b). Askospore su prozirne, savijene i zaobljenih krajeva, veličine 17,5–30 x 5–7,5 μm, sa 1–3 septe.



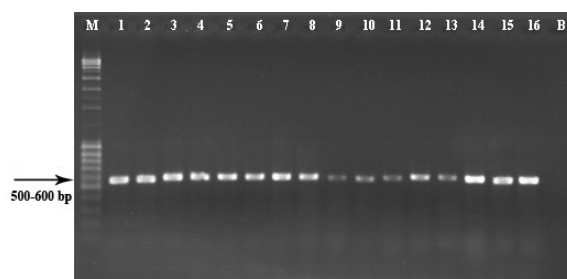
Slika 18. *G. zeae* (uzorak 14–11): Peritecije u grupama na stablu gajenog sirka (a) i oslobađanje askospora iz peritecije (b)

5.7. Molekularna detekcija gljiva

Molekularna metoda lančane reakcije polimeraze (PCR) i sekvencioniranje umnoženih fragmenata DNK, uspešno je primenjena za identifikaciju i karakterizaciju ispitivanih izolata *Fusarium* spp. prouzrokovala fuzariozne truleži korena i prizemnog dela stabla gajenog sirka. Nakon ekstrakcije ukupne količine DNK ispitivanih izolata prouzrokovala fuzariozne truleži sirka, obavljene su PCR reakcije sa parovima univerzalnih ili specifičnih prajmera u cilju ispitivanja pogodnosti za dobijanje specifičnog fragmenta DNK koji obuhvata ITS genomni region (deo 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2 i deo 28S rRNA), tri različita regiona proteinskih nuklearnih gena (elongacioni faktor TEF-1 α ; β -tubulin i calmodulin) i mitohondrijalni deo genoma (mtSSU rDNK).

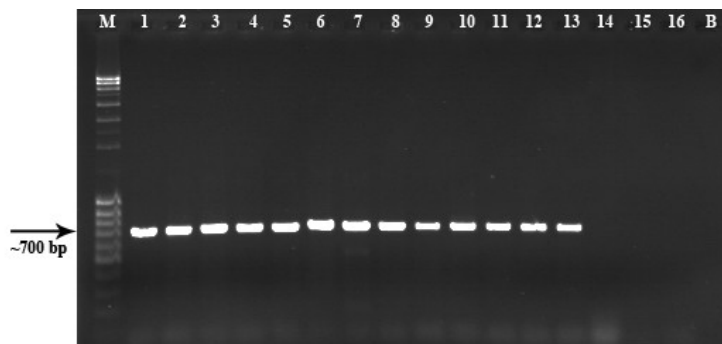
Primenom različitih prajmera prilikom izvođenja PCR metode, razlika u specifičnosti i pogodnosti detekcije sekvenci svih pet različitih delova genoma iz ispitivanih izolata bila je izražena.

Molekularna detekcija 13 odabranih izolata *Fusarium* spp. poreklom iz sirka, kao i tri referentna izolata *F. equiseti* (RBG851), *F. proliferatum* (RBG5349) i *F. thapsinum* (RBG5255) obavljena je korišćenjem univerzalnih prajmera ITS1/ITS4, koji omogućavaju umnožavanje ITS regiona ribozomalne DNK Eukariota. Poređenjem amplifikovanih fragmenata ispitivanih izolata sirka, prisustvo fragmenta očekivane veličine 500–600 bp utvrđeno je kod svih izolata (slika 19). Do amplifikacije nije došlo kod negativne kontrole.



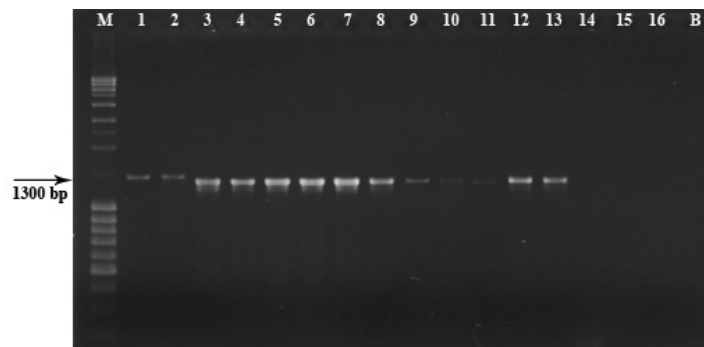
Slika 19. Elektroforetska analiza PCR proizvoda dobijenih korišćenjem para prajmera ITS1/ITS4. Kolone: M– MassRuler™ DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmgH, Lithuania); 1– izolat 286–09; 2– referentni izolat *F. equiseti* (RBG851); 3– izolat 297a–09; 4– izolat 13–10; 5– izolat 521–10; 6– izolat 522–10; 7– izolat 530–10; 8– referentni izolat *F. proliferatum* (RBG5349); 9– izolat 532–10; 10– izolat 535–10; 11– izolat 536–10; 12– izolat 808–11; 13– referentni izolat *F. thapsinum* (RBG5255); 14– izolat 291–09; 15– izolat 315–09; 16– izolat 539–10; 17– B–negativna kontrola (PCR smeša sa RNase-free vodom)

Primenom para univerzalnih prajmera ef1/ef2 koji omogućavaju amplifikaciju gena TEF-1 α i poređenjem amplifikovanih fragmenata testiranih izolata, sa korišćenim markerom (M), ustanovljeno je prisustvo fragmenta očekivane veličine oko 700 bp kod izolata I, II, III i IV morfološke grupe (slika 20). Do amplifikacije nije došlo kod izolata V morfološke grupe (291-09, 315-09, 539-10) i negativne kontrole.



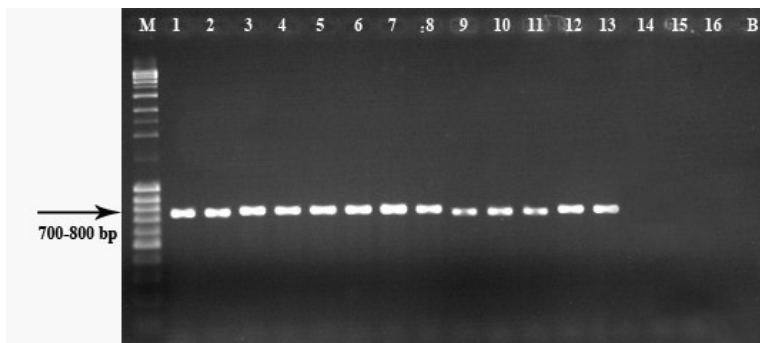
Slika 20. Elektroforetska analiza PCR proizvoda dobijenih korišćenjem para prajmera ef1/ef2. Kolone: M– MassRulerTMDNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmgH, Lithuania); 1– izolat 286-09; 2– referentni izolat *F. equiseti* (RBG851); 3– izolat 297a-09; 4– izolat 13-10; 5– izolat 521-10; 6– izolat 522-10; 7– izolat 530-10; 8– referentni izolat *F. proliferatum* (RBG5349); 9– izolat 532-10; 10– izolat 535-10; 11– izolat 536-10; 12– izolat 808-11; 13– referentni izolat *F. thapsinum* (RBG5255); 14– izolat 291-09; 15– izolat 315-09; 16– izolat 539-10; 17– B–negativna kontrola (PCR smeša sa RNase-free vodom)

Molekularna detekcija odabranih izolata izvršena je primenom para prajmera T1/T22 koji omogućavaju amplifikaciju dela gena β -tubulin. Pomoću ovih prajmera uspešno je amplifikovan gen β -tubulin dužine oko 1300 bp kod 13 od 16 ispitivanih izolata (slika 21). Prinosi ovih reakcija bili su niži kod izolata I grupe (286-09, *F. equiseti* RBG851) i III grupe (532-10, 535-10, 536-10), što se ogledalo u vidu prisustva tanjih traka. Do amplifikacije nije došlo kod izolata V grupe (291-09, 315-09, 539-10) i negativne kontrole.



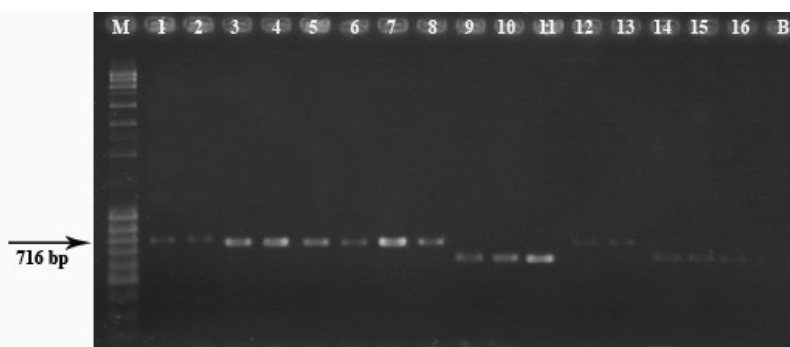
Slika 21. Elektroforetska analiza PCR proizvoda dobijenih korišćenjem para prajmera T1/T22. Kolone: M– MassRuler™DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmgH, Lithuania); 1– izolat 286–09; 2– referentni izolat *F. equiseti* (RBG851); 3– izolat 297a–09; 4– izolat 13–10; 5– izolat 521–10; 6– izolat 522–10; 7– izolat 530–10; 8– referentni izolat *F. proliferatum* (RBG5349); 9– izolat 532–10; 10– izolat 535–10; 11– izolat 536–10; 12– izolat 808–11; 13– referentni izolat *F. thapsinum* (RBG5255); 14– izolat 291–09; 15– izolat 315–09; 16– izolat 539–10; 17– B–negativna kontrola (PCR smeša sa RNase–free vodom)

U PCR reakciji korišćenjem para prajmera CL1/CL2A koji omogućavaju amplifikaciju gena za protein calmodulin, dobijeni su ampliconi očekivane veličine 700–800 bp kod 13 ispitivanih izolata *Fusarium* spp. (slika 22). Do amplifikacije nije došlo kod izolata V grupe (291–09, 315–09, 539–10) i negativne kontrole.



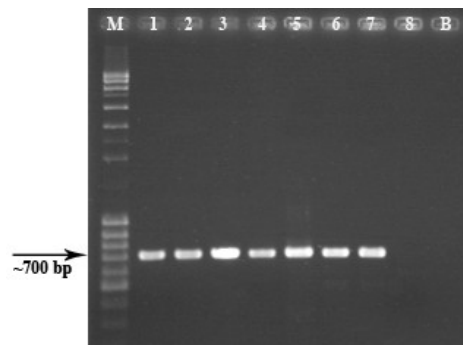
Slika 22. Elektroforetska analiza PCR proizvoda dobijenih korišćenjem para prajmera CL1/CL2A. Kolone: M– MassRuler™DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmgH, Lithuania); 1– izolat 286–09; 2– referentni izolat *F. equiseti* (RBG851); 3– izolat 297a–09; 4– izolat 13–10; 5– izolat 521–10; 6– izolat 522–10; 7– izolat 530–10; 8– referentni izolat *F. proliferatum* (RBG5349); 9– izolat 532–10; 10– izolat 535–10; 11– izolat 536–10; 12– izolat 808–11; 13– referentni izolat *F. thapsinum* (RBG5255); 14– izolat 291–09; 15– izolat 315–09; 16– izolat 539–10; 17– B–negativna kontrola (PCR smeša sa RNase–free vodom)

Detekcija *Fusarium* spp. uz korišćenje prajmera MS1/MS2 koji omogućavaju amplifikaciju mitohondrijalne male podjedinice (mtSSU) ribozomske DNK uspešno je primenjena. Kod svih ispitivanih izolata, rezultati dobijeni PCR reakcijom potvrđuju prisustvo trake procenjene veličine 716 bp (slika 23). Kod izolata I grupe (286–09, *F. equiseti* RBG851), IV grupe (808–11, *F. thapsinum* RBG5255) i V grupe (291–09, 315–09, 539–10) reakcija je bila slabog intenziteta, u vidu tanjih traka očekivane veličine. Do amplifikacije nije došlo kod negativne kontrole.



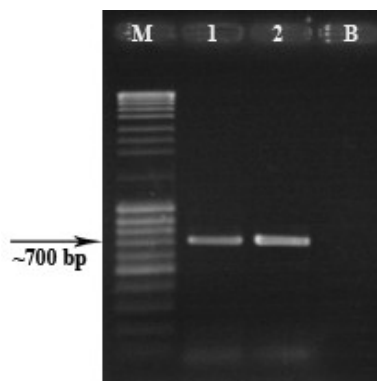
Slika 23. Elektroforetska analiza PCR proizvoda dobijenih korišćenjem para prajmera MS1/MS2. Kolone: M– MassRuler™ DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmGH, Lithuania); 1– izolat 286–09; 2– referentni izolat *F. equiseti* (RBG851); 3– izolat 297a–09; 4– izolat 13–10; 5– izolat 521–10; 6– izolat 522–10; 7– izolat 530–10; 8– referentni izolat *F. proliferatum* (RBG5349); 9– izolat 532–10; 10– izolat 535–10; 11– izolat 536–10; 12– izolat 808–11; 13– referentni izolat *F. thapsinum* (RBG5255); 14– izolat 291–09; 15– izolat 315–09; 16– izolat 539–10; 17– B–negativna kontrola (PCR smeša sa RNase–free vodom)

Kao pogodan način izolacije ukupne DNK pokazala se i standardna CTAB (hexadecyltrimethylammonium–bromide) metoda za ekstrakciju nukleinskih kiselina u kombinaciji sa PCR reakcijom, koja je takođe primenjena za molekularnu detekciju izolata *Fusarium* spp. Molekularna detekcija pet odabranih reprezentativnih izolata *Fusarium* spp. iz svake od pet grupa (286–09, 297a–09, 535–10, 808–11 i 291–09), poreklom iz sirka, kao i tri referentna izolata *F. equiseti* (RBG851), *F. proliferatum* (RBG5349) i *F. thapsinum* (RBG5255) poreklom iz Australije, obavljena je korišćenjem univerzalnih prajmera ef1/ef2. Poređenjem amplifikovanih fragmenata ispitivanih izolata sirka, prisustvo fragmenta očekivane veličine oko 700 bp utvrđeno je kod izolata I, II, III i IV grupe (slika 24). Do amplifikacije nije došlo kod izolata V grupe (291–09) i negativne kontrole.



Slika 24. Ciljana DNK izolovana korišćenjem CTAB protokola. Elektroforetska analiza PCR proizvoda dobijenih korišćenjem para prajmera ef1/ef2. Kolone: M– MassRuler™ DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmgH, Lithuania); 1– izolat 286–09; 2– referentni izolat *F. equiseti* (RBG851); 3– izolat 297a–09; 4– referentni izolat *F. proliferatum* (RBG5349); 5– izolat 535–10; 6– izolat 808–11; 7– referentni izolat *F. thapsinum* (RBG5255); 8– izolat 291–09; 9– B–negativna kontrola (PCR smeša sa RNase–free vodom)

PCR metoda primenjena je u cilju molekularne detekcije i identifikacije *F. graminearum* poreklom iz peritecija uzorka 14–11 formiranih na prezimelim zaraženim stabljikama sirka, sa lokaliteta Čantavir. PCR reakcija obavljena je korišćenjem univerzalnih prajmera ef1/ef2, koji omogućavaju amplifikaciju gena TEF–1 α . Poređenjem amplifikovanih fragmenata testiranog uzorka sirka i pozitivne kontrole (izolat 535–10 iz *S. bicolor*, hibrid 'Gold') sa korišćenim markerom (M), utvrđeno je prisustvo fragmenta očekivane veličine oko 700 bp (slika 25). Do amplifikacije nije došlo kod negativne kontrole.



Slika 25. Elektroforetska analiza PCR proizvoda dobijenih korišćenjem para prajmera ef1/ef2. Kolone: M– MassRuler™ DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmgH, Lithuania); 1– izolat 14–11 iz peritecija; 2– pozitivna kontrola (izolat 535–10 iz *S. bicolor*, sorta 'Gold'); 3– B–negativna kontrola (PCR smeša sa RNase–free vodom)

5.7.1. Molekularna identifikacija vrsta detektovanih na sirku

Tokom molekularne identifikacije ispitivanih izolata poreklom iz biljaka sirka sa simptomima truleži prizemnog dela stabla i iz zaraženog semena, uspešno je sekvencionirano više genomnih regiona ukupno 13 izolata, podeljenih u pet grupa i okarakterisanih na morfološkom nivou. Sekvencionirani su PCR produkti dobijeni korišćenjem prajmera koji omogućavaju amplifikaciju gena za TEF-1 α , a koji je visoko informativan na nivou vrste za rod *Fusarium*. Pored toga, za sekvencioniranje i proračun genetičke sličnosti sekvenci izolata korišćeni su PCR produkti dobijeni primenom prajmera koji omogućavaju amplifikaciju ITS regiona rDNK, proteinskih gena (β -tubulin i calmodulin) i mitohondrijalne male podjedinice (mtSSU) rDNK. Za ova ispitivanja odabran je po jedan reprezentativni predstavnik svake grupe, ukupno četiri izolata i to: (286-09, I grupa); (297a-09, II grupa); (535-10, III grupa) i (808-11, IV grupa). Predstavnici V grupe (291-09 i 315-09) sekvencionirani su primenom prajmera koji omogućavaju amplifikaciju ITS regiona rDNK.

Tabela 10. Pregled sekvenci ispitivanih izolata *Fusarium* spp. dobijenih u ovom radu

Grupa	Oznaka izolata	Vrsta	GenBank pristupni broj				
			ITS	TEF-1 α	β -tubulin	calmodulin	mtSSU
I	286-09	<i>F. equiseti</i>	JQ412109	JQ412101	JQ717201	JQ423934	JQ717202
II	297a-09	<i>F. proliferatum</i>	JQ412110	JQ412110	JQ412112	JQ412114	JQ717203
	13-10	<i>F. proliferatum</i>	/	JQ412102	/	/	/
	521-10	<i>F. proliferatum</i>	/	JQ412104	/	/	/
	522-10	<i>F. proliferatum</i>	/	JQ412105	/	/	/
	530-10	<i>F. proliferatum</i>	/	JQ412106	/	/	/
III	532-10	<i>F. graminearum</i>	/	JQ412107	/	/	/
	535-10	<i>F. graminearum</i>	JQ412111	JF747146	JQ412113	JQ412115	JQ717204
	536-10	<i>F. graminearum</i>	/	JQ412108	/	/	/
	14-11	<i>F. graminearum</i>	/	JQ862471	/	/	/
IV	808-11	<i>F. thapsinum</i>	JQ717206	JQ717205	JQ717207	JQ717208	JQ717209
V	291-09	<i>E. nigrum</i>	JQ619838	/	/	/	/
	315-09	<i>E. nigrum</i>	JQ619839	/	/	/	/

/- nije sekvencionirano

Identifikacija odabranih izolata izvršena je višestrukim uparivanjem i proračunom genetičke sličnosti dobijenih sekvenci međusobno, kao i sa sekvencama drugih izolata dostupnih u GenBank bazi podataka. Primenom morfoloških i molekularnih metoda utvrđeno je da odabrani izolati pripadaju vrstama roda *Fusarium*, i to: *F. equiseti* (grupa I), *F. proliferatum* (grupa II), *F. graminearum* (grupa III) i *F. thapsinum* (grupa IV), kao i vrsti iz roda *Epicoccum*: *E. nigrum* (grupa V). U tabeli 10 nalaze se podaci o sekvencama navedenih vrsta gljiva kojima je dodeljen pristupni broj (GenBank Accession number) u GenBank bazi podataka.

Molekularna identifikacija *Fusarium equiseti*. Molekularna identifikacija *F. equiseti* izvršena je višestrukim uparivanjem i proračunom genetičke sličnosti sekvenci odabranih izolata sa sekvencama drugih izolata dostupnih u GenBank bazi podataka. Za ova ispitivanja odabran je izolat 286–09 sa lokaliteta Bački Petrovac, predstavnik morfološke grupe I. Amplifikovani fragmenti odabranog izolata, nakon prečišćavanja podvrgnuti su sekvencioniranju u cilju utvrđivanja sekvence svih pet umnoženih genomnih regiona: ITS regiona rDNK, proteinskih gena TEF–1 α , β –tubulina i calmodulina, kao i mitohondrijalne male podjedinice (mtSSU) rDNK.

Nakon sekvencioniranja PCR produkta dobijenog amplifikacijom iz micelije uzorka 286–09, korišćenjem para prajmera ITS1/ITS4 koji omogućavaju amplifikaciju ITS regiona rDNK, konsenzus nukleotidna sekvenca deponovana je u GenBank bazu podataka i dodeljen joj je pristupni broj JQ412109 (tabela 10). BLAST analiza sekvence produkta dužine 545 bp, pokazala je 99% nukleotidne identičnosti sa ITS rDNK sekvencama 15 izolata vrste *F. equiseti* i 13 izolata *Fusarium* spp. Proračun genetičke sličnosti odabranih sekvenci obavljen je nakon trimovanja sekvenci na dužinu od 538 bp. Najviši stepen identičnosti od 100% ispitivan izolat pokazao je sa izolatom *F. equiseti* iz Kine (AB470890), a najniži stepen identičnosti od 99,4% sa razlikom u tri nukleotida, sa sekvencama 9 izolata različitog porekla, od čega su četiri izolata prijavljena kao *F. equiseti* iz Australije (GQ505694, GQ505743), Francuske (GQ505690) i Kine (EU326202), dok je ostalih pet izolata prijavljeno kao *Fusarium* spp. poreklom iz različitih delova sveta,

Australije (GQ505679), Kenije (GQ505684), Engleske (GQ505737), Sudana (GQ505741) i sa Havaja (GQ505745).

Nakon sekvencioniranja PCR produkta dobijenog amplifikacijom gena *TEF-1 α* , korišćenjem para prajmera *ef1/ef2*, konsenzus nukleotidna sekvenca deponovana je u GenBank bazu podataka i dodeljen joj je pristupni broj JQ412101 (tabela 10). BLAST analiza sekvence produkta u dužini od 678 bp, pokazala je 99 do 100% nukleotidne identičnosti sa sekvencama 27 izolata *F. equiseti* deponovanih u GenBank bazi podataka. Višestruko uparivanje i proračun nukleotidne sličnosti odabranih sekvenci obavljeno je nakon trimovanja sekvenci na dužinu od 595 bp. Proračunom genetičke sličnosti izolata 286-09 pokazao je najviši stepen nukleotidne identičnosti od 100% sa sekvencama sedam izolata različitog porekla, od čega su četiri izolata prijavljena kao *F. equiseti* iz Kanade (EF526111, DQ842088, DQ842097, DQ842099), dva izolata *F. equiseti* iz Španije (JF496570 i JF496571), kao i sa sekvencom jednog izolata iz SAD (FJ939676). Najniži stepen nukleotidne identičnosti od 99,5% sa razlikom u tri nukleotida ispitivani izolat ispoljio je sa sekvencama (DQ842056, FJ939674, FJ939686) iz Kanade, Francuske i Italije.

Nakon sekvencioniranja fragmenta umnoženog u PCR reakciji korišćenjem prajmera T1/T22, dobijena je delimična sekvenca gena β -tubulina i dodeljen joj je pristupni broj JQ717201. Molekularna identifikacija odabranog izolata obavljena je BLAST analizom sekvence produkta u dužini od 883 bp i pokazala je 99 do 100% identičnosti sa pet sekvenci izolata *F. equiseti* deponovanih u GenBank bazi podataka. Višestruko uparivanje i proračun nukleotidne sličnosti odabranih sekvenci obavljeno je nakon trimovanja sekvenci na dužinu od 866 bp. Najviši stepen identičnosti od 100%, sekvenca odabranog izolata pokazala je sa izolatom *F. equiseti* iz SAD (GQ915441). Najniži stepen nukleotidne identičnosti od 98,7% sa razlikom u 11 nukleotida ispitivani izolat pokazao je sa izolatima *F. equiseti* pod pristupnim brojevima AB587036 i GQ915444 iz Japana i SAD.

Za sekvencioniranje korišćen je amplifikovan PCR produkt dobijen pomoću para prajmera CL1/CL2A koji omogućavaju amplifikaciju gena calmodulina i deponovan je u GenBank bazu podataka pod pristupnim brojem JQ423934 (tabela 10). Dobijena sekvenca uparena je sa sekvencama drugih izolata dostupnih u GenBank bazi podataka. Molekularna identifikacija sekvence produkta u dužini od 703 bp, pomoću BLAST analize pokazala je

98 do 100% identičnosti sa 13 sekvenci izolata *F. equiseti* deponovanih u GenBank bazi podataka. Višestruko uparivanje i proračun nukleotidne sličnosti odabranih sekvenci obavljeno je nakon trimovanja sekvenci na dužinu od 630 bp. Izvršen je proračun genetičke sličnosti i najviši stepen identičnosti od 100% ispitivani izolat 286–09 pokazao je sa izolatom *F. equiseti* iz Nemačke (GQ505509), a najniži stepen identičnosti (97,6%) sa razlikom u 15 nukleotida pokazao je sa izolatom *F. equiseti* iz SAD (GQ857062).

Nakon sekvencioniranja PCR produkta izolata 286–09 dobijenog amplifikacijom mitohondrijalne male podjedinice (mtSSU) rDNK, konsenzus nukleotidna sekvenca deponovana je u GenBank bazu podataka pod pristupnim brojem JQ717202. Dobijena sekvenca ispitivanog izolata prethodno okarakterisana kao *F. equiseti*, upoređivana je sa sekvencama drugih izolata dostupnih u GenBank bazi podataka. S obzirom da u GenBank bazi podataka ne postoji prijavljena sekvenca izolata *F. equiseti* umnožena na osnovu mitohondrijalnog dela genoma (mtSSU) rDNK, ispitivani izolat pokazao je nizak stepen identičnosti od 98% sa 67 sekvenci izolata različitih *Fusarium* vrsta. Višestruko uparivanje i proračun nukleotidne sličnosti odabranih sekvenci obavljeno je nakon trimovanja sekvenci na dužinu od 611 bp, a proračunom genetičke sličnosti potvrđen je nizak stepen identičnosti od 97,1% sa razlikom u 18 nukleotida sa *F. oxysporum* i njenih 17 specijalizovanih formi (*F. oxysporum* f. sp. *asparagi*, *F. oxysporum* f. sp. *batatas*, *F. oxysporum* f. sp. *callistephi*, *F. oxysporum* f. sp. *cepaie*, *F. oxysporum* f. sp. *fabae*, *F. oxysporum* f. sp. *heliotropii*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *F. oxysporum* f. sp. *matthiolae*, *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, *F. oxysporum* f. sp. *rhois* i *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*).

Molekularna identifikacija *Fusarium proliferatum*. Višestrukim poređenjem sekvenci odgovarajućih delova nuklearne i mitohondrijalne DNK, kao i tri proteinska gena (TEF–1 α , β -tubulin i calmodulin) sa dostupnim sekvencama gljiva u GenBank bazi podataka i proračunom genetičke sličnosti, obavljena je potvrda identifikacije odabranih izolata sirka (297a–09, 13–10, 521–10, 522–10 i 530–10) poreklom iz Bačkog Petrovca i Čantavira.

Za identifikaciju na osnovu sekvence ITS regiona odabran je reprezentativni predstavnik II grupe, izolat 297a–09 poreklom sa lokaliteta Čantavir, koji je prethodno okarakterisan na morfološkom nivou kao *F. proliferatum*. Nakon sekvencioniranja PCR

produkta dobijenog amplifikacijom iz micelije uzorka 297a–09, korišćenjem para prajmera ITS1/ITS4, konsenzus nukleotidna sekvenca deponovana je u GenBank bazu podataka i dodeljen joj je pristupni broj JQ412110 (tabela 10). BLAST analiza sekvence produkta dužine 540 bp, pokazala je 99 do 100% nukleotidne identičnosti sa ITS rDNK sekvencama 34 izolata iz GenBank baze podataka, od čega su 22 izolata vrste *F. proliferatum*, sedam izolata *G. moniliformis*, jedan izolat *F. subglutinans* i četiri izolata *Fusarium* spp., što potvrđuje visoku homologiju ITS regiona između morfološki različitih vrsta gljiva. Proračun genetičke sličnosti odabranih sekvenci obavljen je nakon trimovanja sekvenci na dužinu od 528 bp. Najviši stepen identičnosti od 100% ispitivan izolat pokazao je sa sekvencama 19 izolata različitog porekla, od čega je devet izolata prijavljeno kao *F. proliferatum* i to poreklom iz Italije (EU151484, EU151486, EU151488, EU151489, EU151490), Kine (HQ113948, FJ040179), SAD (AF291061) i Indije (GU363955); četiri izolata prijavljena kao *G. moniliformis* iz Kine (HQ176444, HQ176445, EU364864, JF499678); četiri izolata prijavljena kao *Fusarium* spp. iz Kine (FJ360899, EU117221), SAD (F589878) i Ekvadora (JN662475), kao i po jednim izolatom *G. intermedia* (AB470869) iz Kine i *F. subglutinans* (JF499679) iz Indije. Najniži stepen nukleotidne identičnosti od 99,4% sa razlikom u tri nukleotida ispitivani izolat ispoljio je sa sekvencom izolata *F. proliferatum* (GU066627) iz Malezije.

Nakon sekvencioniranja PCR produkata dobijenih amplifikacijom iz micelije svih odabranih uzoraka, korišćenjem para prajmera efl1/ef2 koji omogućavaju amplifikaciju gena TEF–1 α , konsenzus nukleotidne sekvence deponovane su u GenBank bazu podataka pod pristupnim brojevima JQ412110 (izolat 297a–09), JQ412102 (izolat 13–10), JQ412104 (izolat 521–10), JQ412105 (izolat 522–10) i JQ412106 (izolat 530–10) (tabela 10). Proračunom genetičke sličnosti sekvenci dobijenih u ovom radu utvrđeno je da izolat 297a–09 ima 99,5% sličnosti sa druga dva izolata, odnosno 13–10 i 521–10 koja su identična, zatim 99,6% sličnosti sa izolatom 522–10, a 99,8% sa izolatom 530–10. BLAST analiza sekvenci produkata u dužini od 658 do 675 bp, pokazala je 99 do 100% nukleotidne identičnosti sa sekvencama 98 izolata *F. proliferatum* deponovanih u GenBank bazi podataka. Za proračun genetičke sličnosti sve sekvence su svedene na dužinu od 567 bp, koliko je iznosila dužina najkraće sekvence korišćene u analizi, a svi ispitivani izolati

pokazali su najviši stepen nukleotidne identičnosti od 100% sa sekvencama 10 izolata različitog porekla, od čega je pet izolata prijavljeno kao *Gibberella fujikuroi* var. *intermedia* poreklom iz Španije (AM404158, AM397466, AM397467, AM397469, AM397470), dva izolata iz Francuske (JF278584, JF278609) i jednim izolatom iz Kanade (AM404121). Ostale dve sekvence koje su pokazale visok nivo homologije, prijavljene su kao *F. proliferatum* pod pristupnim brojevima EU220405 (Holandija) i EU220406 (Argentina). Najniži stepen nukleotidne identičnosti od 98,6% sa razlikom u osam nukleotida ispitivani izolati ispoljili su sa sekvencom izolata *F. proliferatum* (HQ176427) iz Kine.

Nakon sekvencioniranja fragmenta umnoženog u PCR reakciji korišćenjem prajmera T1/T22, dobijena je delimična sekvenca gena za β -tubulin izolata 297a-09 i prijavljena je u GenBank bazu podataka (JQ412112). Molekularna identifikacija odabranog izolata obavljena je BLAST analizom sekvence produkta u dužini od 1294 bp i pokazala je 99 do 100% identičnosti sa tri sekvence izolata *F. proliferatum* deponovane u GenBank bazi podataka. Višestruko uparivanje i proračun nukleotidne sličnosti odabranih sekvenci obavljeno je nakon trimovanja sekvenci na dužinu od 1 279 bp. Najviši stepen nukleotidne identičnosti od 100% sekvenca odabranog izolata pokazala je sa izolatom *F. proliferatum* iz SAD (AF291055). Razlika u samo jednom nukleotidu (99,9%) pokazala se poređenjem sa sekvencom izolata *F. proliferatum* iz Španije (AF336910). Najniži stepen nukleotidne identičnosti od 99,3% sa razlikom u 9 nukleotida ispitivani izolat pokazao je sa izolatom *G. intermedia* pod pristupnim brojem AB587055 iz Japana.

Za sekvencioniranje korišćen je amplifikovan PCR produkt izolata 297a-09 dobijen pomoću para prajmera CL1/CL2A koji omogućavaju amplifikaciju gena calmodulina i dobijena sekvenca deponovana je u GenBank bazu podataka pod pristupnim brojem JQ412114 (tabela 10). Molekularna identifikacija sekvence produkta u dužini od 700 bp, pomoću BLAST analize pokazala je 99 do 100% identičnosti sa 10 sekvenci izolata *F. proliferatum* deponovanih u GenBank bazi podataka. Višestruko uparivanje i proračun nukleotidne sličnosti odabranih sekvenci obavljeno je nakon trimovanja sekvenci na dužinu od 655 bp i najviši stepen identičnosti od 100% ispitivani izolat 297a-09 pokazao je sa dva izolata *F. proliferatum* iz Italije (EU430620 i AJ560771), a najniži stepen identičnosti

(99,2%) sa razlikom u 5 nukleotida pokazao je sa izolatom *F. proliferatum* takođe iz Italije (AJ560772).

Nakon sekvencioniranja PCR produkta izolata 297a–09 dobijenog amplifikacijom mitohondrijalne male podjedinice (mtSSU) rDNK, konsenzus nukleotidna sekvenca deponovana je u GenBank bazu podataka pod pristupnim brojem JQ717203. Dobijena sekvenca izolata (dužine 686 bp) prethodno okarakterisana kao *F. proliferatum*, upoređivana je sa sekvencama drugih izolata *F. proliferatum* dostupnih u GenBank bazi podataka. BLAST analiza pokazala je 99 do 100% nukleotidne identičnosti ispitivanog izolata sa odgovarajućim sekvencama svih drugih izolata prijavljenih u GenBank bazi podataka kao *F. proliferatum*, *F. oxysporum*, *F. concentricum*, *F. annulatum*, *F. globosum*, *F. sacchari*, *F. udum* i *Fusarium* sp. Nakon trimovanja sekvenci na dužinu od 632 bp, izvršen je proračun genetičke sličnosti i najviši nivo homologije od 100% ispitivani izolat 297a–09 pokazao je sa sekvencama 10 izolata različitih *Fusarium* vrsta, od čega su pet izolata prijavljena kao *F. proliferatum* iz SAD (AF291056, DQ016189, DQ016190, Q831947) i iz Španije (AF336911), dva izolata *F. oxysporum* f. sp. *lilii* (EF437314) i *F. oxysporum* f. sp. *tulipae* iz Holandije, jedan izolat *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (DQ016187) iz SAD, kao i sa sekvencama izolata *F. concentricum* (AF333941 i AF333943) iz Japana. BLAST analizom najniži stepen homologije nukleotidnih sekvenci (98,7%) sa razlikom u osam nukleotida ispitivani izolat pokazao je sa izolatom *F. udum* pod pristupnim brojem U34517 iz SAD i sa izolatom *Fusarium* sp. (AF158293) iz Tanzanije.

Molekularna identifikacija *Fusarium graminearum*. Molekularna identifikacija odabranih izolata *F. graminearum* obavljena je, nakon sekvencioniranja i proračuna genetičke sličnosti sekvenci izolata, dobijenih primenom prajmera koji omogućavaju amplifikaciju ITS regiona rDNK, proteinskih gena (TEF–1 α , β -tubulin i calmodulin) i mitohondrijalne male podjedinice (mtSSU) rDNK. Za sekvencioniranje proteinskog gena TEF–1 α odabrani su amplifikovani fragmenti tri izolata iz morfološke grupe III (532–10, 535–10, 536–10) poreklom iz Čantavira, dok za ostale umnožene genomne regione odabran je izolat 535–10, izolovan iz prizemnog dela stabla sirka, hibrida 'Gold', takođe iz

Čantavira. Pored navedenih, u ispitivanja je uključen i uzorak 14–11 dobijen iz prezimele zaražene stabljike sirka sa formiranim peritecijama, poreklom iz Čantavira.

Molekularna identifikacija odabranog izolata obavljena je nakon sekvencioniranja ITS regiona rDNK reprezentativnog predstavnika III grupe (izolat 535–10), koji je prethodno okarakterisan na morfološkom nivou kao *F. graminearum*. Konsenzus nukleotidna sekvenca deponovana je u GenBank bazu podataka i dodeljen joj je pristupni broj JQ412111 (tabela 10). BLAST analiza sekvence produkta dužine 528 bp, pokazala je 99 do 100% nukleotidne identičnosti sa ITS rDNK sekvencama 67 izolata deponovanih u GenBank bazu podataka, od čega je 31 izolat vrste *G. zae*, a preostalih 36 vrsta pripadaju kompleksu *F. graminearum* što potvrđuje visoku homologiju ITS regiona između morfološki različitih vrsta gljiva. Proračun genetičke sličnosti odabranih sekvenci obavljeno je nakon trimovanja sekvenci na dužinu od 500 bp. Najviši stepen identičnosti od 100% ispitivan izolat pokazao je sa sekvencama 9 izolata različitog porekla, od čega su četiri izolata prijavljena kao *G. zae* iz Japana (AB289548, AB289549, AB289551, AB289553), dva izolata *G. zae* iz Ekvadora (JN417227, JN589807), kao i sa sekvencom po jednog izolata *G. zae* iz Kolumbije (HQ248200), Kine (GQ466391) i Francuske (AY188924). Najniži stepen nukleotidne identičnosti od 99,6% sa razlikom u dva nukleotida, ispitivani izolat ispoljio je sa sekvencom *F. asiaticum* (DQ459834) iz Japana, *F. brasiliicum* (DQ459861) iz Brazila i *F. cerealis* (DQ459869) iz SAD.

Nakon sekvencioniranja PCR produkata dobijenih amplifikacijom iz micelije svih odabranih uzoraka, korišćenjem para prajmera *ef1/ef2* koji omogućavaju amplifikaciju gena *TEF-1 α* , konsenzus nukleotidne sekvence deponovane su u GenBank bazu podataka i dodeljeni su im pristupni brojevi JQ412107 (izolat 532–10), JF747146 (izolat 535–10) i JQ412108 (izolat 536–10) (tabela 10). Poređenjem sekvenci *TEF-1 α* gena, ispitivani izolati pokazali su visok stepen homologije, pri čemu izolat 532–10 ima 99,7% sličnosti sa druga dva izolata koja su međusobno potpuno identična. BLAST analiza sekvenci produkata u dužini od 676 do 678 bp, pokazala je 98 do 99% nukleotidne identičnosti sa sekvencama 64 izolata *G. zae* deponovanih u GenBank bazi podataka. Višestruko uparivanje i proračun nukleotidne sličnosti odabranih sekvenci obavljeno je nakon trimovanja sekvenci na dužinu od 576 bp. Proračunom genetičke sličnosti ispitivani izolati

pokazali su najviši stepen nukleotidne identičnosti od 99,8% sa razlikom u jednom nukleotidu, sa sekvencama 41 izolata različitog porekla, od čega su 22 izolata prijavljena kao *F. graminearum* iz Norveške (AJ543575–96), osam izolata *G. zea* poreklom iz SAD (AF212455–59, AJ452957, AF107883, GU116585), četiri izolata *G. zea* iz Francuske (JF278571–72, JF278591–92), dva izolata *G. zea* iz Italije (GQ848544–45), dva izolata *G. zea* iz Kine (HQ176419 i HQ176421), kao i sa sekvencom po jednog izolata *G. zea* iz Australije (GU370497), Danske (AJ601394) i Finske (HM744693). Najniži stepen nukleotidne identičnosti od 98,8% sa razlikom u sedam nukleotida, ispitivani izolati ispoljili su sa sekvencom *G. zea* (GU370499) iz Australije.

Nakon sekvencioniranja fragmenta umnoženog u PCR reakciji korišćenjem prajmera T1/T22, dobijena je delimična sekvenca gena za β -tubulin izolata 535–10 (pristupni broj JQ412113). Molekularna identifikacija odabranog izolata obavljena je BLAST analizom sekvence produkta u dužini od 1027 bp i pokazala je 99 do 100% identičnosti sa 18 sekvenci izolata *G. zea* deponovanih u GenBank bazi podataka. Višestruko uparivanje i proračun nukleotidne sličnosti odabranih sekvenci obavljeno je nakon trimovanja sekvenci na dužinu od 703 bp. Najviši stepen nukleotidne identičnosti od 100% sekvenca odabranog izolata pokazala je sa sekvencama osam izolata različitog porekla, od čega su pet izolata prijavljeni kao *G. zea* iz SAD (DQ459630–31, DQ459634–36), dva izolata *G. zea* iz Japana (FJ536851–52), kao i sa sekvencom jednog izolata *G. zea* iz Rusije (HQ141668). Najniži stepen nukleotidne identičnosti od 99,3% sa razlikom u pet nukleotida ispitivani izolat pokazao je sa izolatom pod pristupnim brojem AY303689 iz Kine.

Za sekvencioniranje korišćen je ampikon izolata 535–10 dobijen pomoću para prajmera CL1/CL2A koji omogućavaju amplifikaciju gena za calmodulin i dobijena sekvenca je deponovana u GenBank bazu podataka pod pristupnim brojem JQ412115 (tabela 10). Molekularna identifikacija sekvence produkta u dužini od 713 bp, pomoću BLAST analize pokazala je 99% identičnosti sa jedinom sekvencom izolata *G. zea* deponovanom u GenBank bazi podataka. Nakon trimovanja sekvenci na dužinu od 703 bp, proračnato je da ima 99,7% nukleotidne sličnosti, sa razlikom u dva nukleotida sa izolatom *G. zea* iz Kine (HQ412343).

Nakon sekvencioniranja PCR produkta izolata 535–10 dobijenog amplifikacijom mitohondrijalne male podjedinice (mtSSU) rDNK, konsenzus nukleotidna sekvenca deponovana je u GenBank bazu podataka pod pristupnim brojem JQ717204. BLAST analiza produkta u dužini 638 bp pokazala je 99% nukleotidne identičnosti ispitivanog izolata sa odgovarajućim sekvencama svih drugih izolata prijavljenih u GenBank bazi podataka kao *G. zea*, *F. culmorum*, *F. cerealis* i *F. lunulosporum*. Nakon trimovanja sekvenci na dužinu od 528 bp, izvršen je proračun genetičke sličnosti i najviši nivo homologije od 99,8%, sa razlikom u jednom nukleotidu, ispitivani izolat 535–10 pokazao je sa sekvencama šest izolata različitih *Fusarium* vrsta, od čega su dva izolata prijavljena kao *G. zea* iz Finske (AF406627) i SAD (DQ364632), a četiri izolata *F. culmorum* iz Velike Britanije (EU744732–35). Najniži stepen homologije nukleotidnih sekvenci (99,6%) sa razlikom u dva nukleotida ispitivani izolat pokazao je sa sekvencom po jednog izolata *G. zea* (U34520), *F. culmorum* (U85552), *F. cerealis* (U85551) i *F. lunulosporum* (U85554) iz SAD.

Nakon sekvencioniranja PCR produkta dobijenog amplifikacijom iz peritecija uzorka 14–11, korišćenjem para prajmera ef1/ef2 koji omogućavaju amplifikaciju gena TEF–1 α , konsenzus nukleotidna sekvenca deponovana je u GenBank bazu podataka (JQ862471). BLAST analiza sekvence produkta u dužini od 674 bp, pokazala je 99 % nukleotidne identičnosti sa sekvencama 72 izolata *G. zea* deponovanih u GenBank bazi podataka. Višestruko uparivanje i proračun nukleotidne sličnosti odabranih sekvenci obavljeno je nakon trimovanja sekvenci na dužinu od 582 bp. Proračunom genetičke sličnosti uzorak 14–11 pokazao je najviši stepen nukleotidne identičnosti od 100% sa sekvencama 49 izolata različitog porekla, od čega su 34 izolata prijavljena kao *G. zea* iz SAD (JF270169, JF270171–73, JF270180, JF270185, JF270189–90, JF270196, JF270203, JF270206–08, JF270210, JF270239, JF270241, JF270247, JF270252, JF270263, JF270270, JF270274, JF270276–77, JF270279, JF270282, JF270284–85, JF270292–95, JF270297, GU116585, HM744693), devet izolata *F. graminearum* iz Norveške (AJ543588–96), tri izolata *G. zea* iz Francuske (JF278571–72, JF278591), kao i sa po jednom sekvencom izolata *G. zea* iz Australije (GU370497), Kine (HQ176421) i Italije (GQ848545). Najniži stepen nukleotidne identičnosti od 99,6% sa razlikom u dva

nukleotida, ispitivani izolat ispoljio je sa 11 sekvenci izolata *G. zeae* različitog porekla, od čega su 9 iz SAD (JF270176, JF270188, JF270195, JF270199, JF270213, JF270219, JF270228, JF270309–10), kao i sa po jednom sekvencom iz Nemačke (FJ939688) i Kanade (GU370498).

Molekularna identifikacija *Fusarium thapsinum*. Molekularna identifikacija *F. thapsinum* izvršena je višestrukim uparivanjem i proračunom genetičke sličnosti sekvence odabranog izolata sa sekvencama drugih izolata dostupnih u GenBank bazi podataka. Za ova ispitivanja odabran je izolat 808–11 iz morfološke grupe IV, izolovan iz semena sirka hibrida 'Gold', a koji je prethodno okarakterisan na morfološkom nivou kao *F. thapsinum*. Uspešno je sekvencionirano pet umnoženih genomnih regiona: ITS regiona rDNK, proteinskih gena za TEF-1 α , β -tubulin i calmodulin, kao i mitohondrijalne male podjedinice (mtSSU) rDNK odabranog izolata.

Nakon sekvencioniranja PCR produkta uzorka 808–11, korišćenjem para prajmera ITS1/ITS4 koji omogućavaju amplifikaciju ITS regiona rDNK, konsenzus nukleotidna sekvenca deponovana je u GenBank bazu podataka i dodeljen joj je pristupni broj JQ717206 (tabela 10). BLAST analiza sekvence produkta dužine 506 bp, pokazala je 99 do 100% nukleotidne identičnosti sa ITS rDNK sekvencama sedam izolata *G. thapsina* prijavljenih u GenBank bazi podataka. Proračunom genetičke sličnosti odabranih sekvenci, najviši stepen identičnosti od 100% ispitivan izolat pokazao je sa ukupno šest izolata *G. thapsina* iz SAD (EF152433), Kine (HQ176442) i Indije (GU257894, GU257897, GU257901–02), a najniži stepen identičnosti od 99,6% sa razlikom u dva nukleotida pokazao je sa sekvencom izolata *F. thapsinum* (U34560) iz Južne Afrike.

Nakon sekvencioniranja PCR produkta dobijenog amplifikacijom gena TEF-1 α korišćenjem para prajmera efl/ef2, konsenzus nukleotidna sekvenca deponovana je u GenBank bazu podataka (JQ717205). BLAST analiza sekvence produkta u dužini od 680 bp, pokazala je 99 do 100% nukleotidne identičnosti sa sekvencama 17 izolata *G. thapsina* deponovanih u GenBank bazi podataka. Višestruko uparivanje i proračun nukleotidne sličnosti odabranih sekvenci obavljeno je nakon trimovanja sekvenci na dužinu od 530 bp. Nakon proračuna genetičke sličnosti, izolat 808–11 pokazao je najviši stepen nukleotidne

identičnosti od 100% sa sekvencama 14 izolata različitog porekla, od čega je 10 izolata prijavljeno kao *G. thapsina* iz SAD (JF270217, JF270220, JF270238, JF270251, JF270301, JF270311, GU116573, GU116586, EF152428, AF160270) i četiri izolata *G. thapsina* iz Indije (FJ603488, FJ603498, FJ603506–07). Najniži stepen nukleotidne identičnosti od 99,4% sa razlikom u tri nukleotida ispitivani izolat ispoljio je sa sekvencom HQ176429 iz Kine.

Nakon sekvencioniranja fragmenta umnoženog u PCR reakciji korišćenjem prajmera T1/T22, dobijena je delimična sekvenca gena za β -tubulin i prijavljena je u GenBank bazu podataka (JQ717207). Molekularna identifikacija odabranog izolata obavljena je BLAST analizom sekvence produkta u dužini od 543 bp i pokazala je 100% identičnosti sa sekvencom izolata *G. thapsina* (U34502) iz Južne Afrike.

Za sekvencioniranje korišćen je amplifikovan PCR produkt dobijen pomoću para prajmera CL1/CL2A koji omogućavaju amplifikaciju gena za calmodulin, a sekvenca je deponovana u GenBank bazu podataka (JQ717208). Molekularna identifikacija dobijene sekvence u dužini od 558 bp, pomoću BLAST analize pokazala je 100% identičnosti sa jedinom sekvencom izolata *G. thapsina* (AF158323) iz SAD.

Nakon sekvencioniranja PCR produkta izolata 808–11 dobijenog amplifikacijom mitohondrijalne male podjedinice (mtSSU) rDNK, konsenzus nukleotidna sekvenca deponovana je u GenBank bazu podataka (JQ717209). BLAST analiza sekvence ispitivanog izolata dužine 651 bp, pokazala je 99% nukleotidne identičnosti sa odgovarajućom sekvencom *G. thapsina* (U34502) iz Južne Afrike, koji je takođe izolovan iz *S. bicolor*. Proračunom genetičke sličnosti nakon trimovanja sekvenci na dužinu od 635 bp između ispitivanog izolata 808–11 i *G. thapsina* (U34502) ustanovljena je identičnosti od 99,8%, sa razlikom u jednom nukleotidu.

Molekularna identifikacija *Epicoccum nigrum*. Nakon identifikacije primenom konvencionalnih morfoloških i molekularnih metoda, amplifikacijom ITS regiona rDNK izvršena je karakterizacija izolata V morfološke grupe (291–09 i 315–09) iz zrna gajenog sirka hibrida 'Alba' i 'Gold', poreklom iz Bačkog Petrovca. Molekularna identifikacija odabranih izolata obavljena je nakon sekvencioniranja ITS regiona rDNK, višestrukim

uparivanjem i proračunom genetičke sličnosti dobijenih sekvenci sa sekvencama drugih izolata dostupnih u GenBank bazi podataka.

Sekvencioniranjem dva odabrana PCR produkta uzoraka 291–09 i 315–09, korišćenjem para prajmera ITS1/ITS4, konsenzus nukleotidne sekvence deponovane su u GenBank bazu podataka pod pristupnim brojevima JQ619838 i JQ619839 (tabela 10). BLAST analiza sekvenci produkata u dužini od 546 bp, pokazala je 99% do 100% nukleotidne identičnosti sa sekvencama 31 izolata *E. nigrum*.

Višestruko uparivanje i proračun nukleotidne sličnosti sekvenci izolata 291–09 i 315–09, nakon trimovanja na dužinu od 533 bp pokazalo je najviši stepen nukleotidne identičnosti od 100% sa sekvencama 23 izolata različitog porekla prijavljena kao *E. nigrum*. Od toga je 17 izolata iz Španije (FN868456, FJ424232–37, FJ424242–45, FJ424250, FJ424251, FJ424256, FJ424257, FJ424263, FJ424264), tri iz Kine (GU586847, AB470875, AB470889), dva iz Italije (EU232716, EU529998) i jedan izolot iz Kanade (JN689342).

5.7.2. Molekularna karakterizacija *Fusarium* spp.

Za filogenetske analize kompleksa vrsta *Fusarium* patogenih za gajeni sirak u Srbiji korišćene su delimične nukleotidne sekvence dobijene amplifikacijom pet različitih genomskih regiona: ITS rDNK, TEF-1 α , β -tubulin, calmodulin i mitohondrijalni mtSSU rDNK. U ova ispitivanja uključene su sekvence izolata identifikovanih vrsta *F. equiseti* (286–09), *F. proliferatum* (297a–09, 13–10, 521–10, 522–10, 530–10), *F. graminearum* (532–10, 535–10, 536–10, 14–11) i *F. thapsinum* (808–11).

Dobijene sekvence vrsta *F. proliferatum* i *F. thapsinum* su uparene sa odabranim odgovarajućim sekvencama vrsta kompleksa *G. fujikuroi* dostupnim u GenBank bazi podataka i rekonstruisano je pet filogenetskih stabala na osnovu odgovarajućih delova genoma, primenom Maximum Parsimony metode i bootstrap podrškom od 1000 ponavljanja. Filogenetska stabla svih gena rutovana su sa *F. oxysporum* i *F. inflexum* iz kompleksa *F. oxysporum* kao autgrupom.

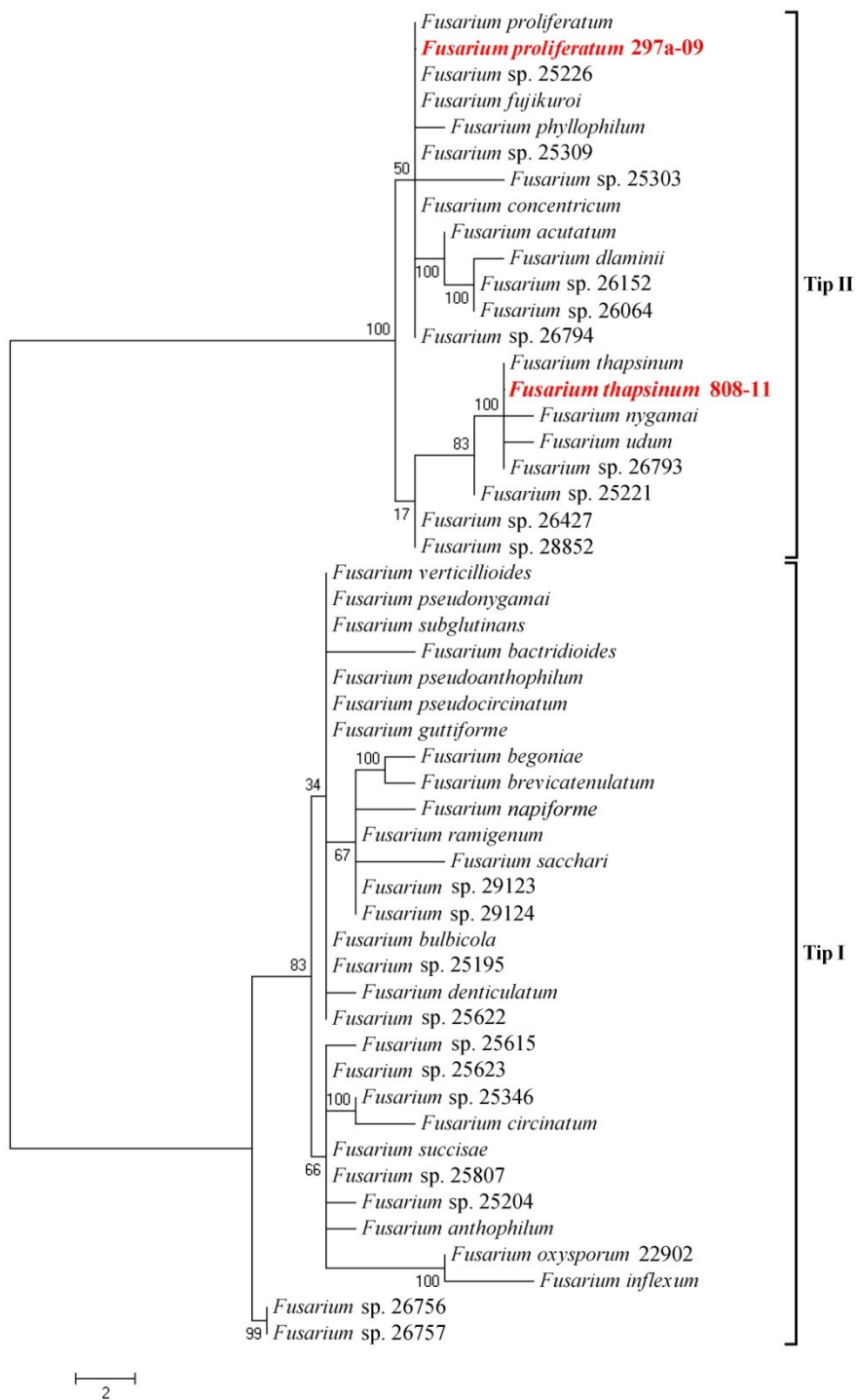
Dobijene sekvence vrste *F. graminearum* su uparene sa odabranim odgovarajućim sekvencama 33 vrste kompleksa *F. graminearum* dostupnim u GenBank bazi podataka i

rekonstruisana su tri filogenetska stabla na osnovu delova genoma ITS regiona rDNK, TEF-1 α i β -tubulina uz primenu Maximum Parsimony metode i bootstrap podrške od 1000 ponavljanja. Filogenetska stabla rutovana su sa *F. pseudograminearum*, kao autgrupom.

Dobijena sekvenca vrste *F. equiseti* je uparena sa odabranim odgovarajućim sekvencama 54 vrste *F. equiseti* dostupnim u GenBank bazi podataka i rekonstruisano je jedno filogenetsko stablo na osnovu gena TEF-1 α uz primenu Maximum Parsimony metode i bootstrap podrške od 1000 ponavljanja. Filogenetsko stablo je rutovano sa *F. graminearum*, kao autgrupom.

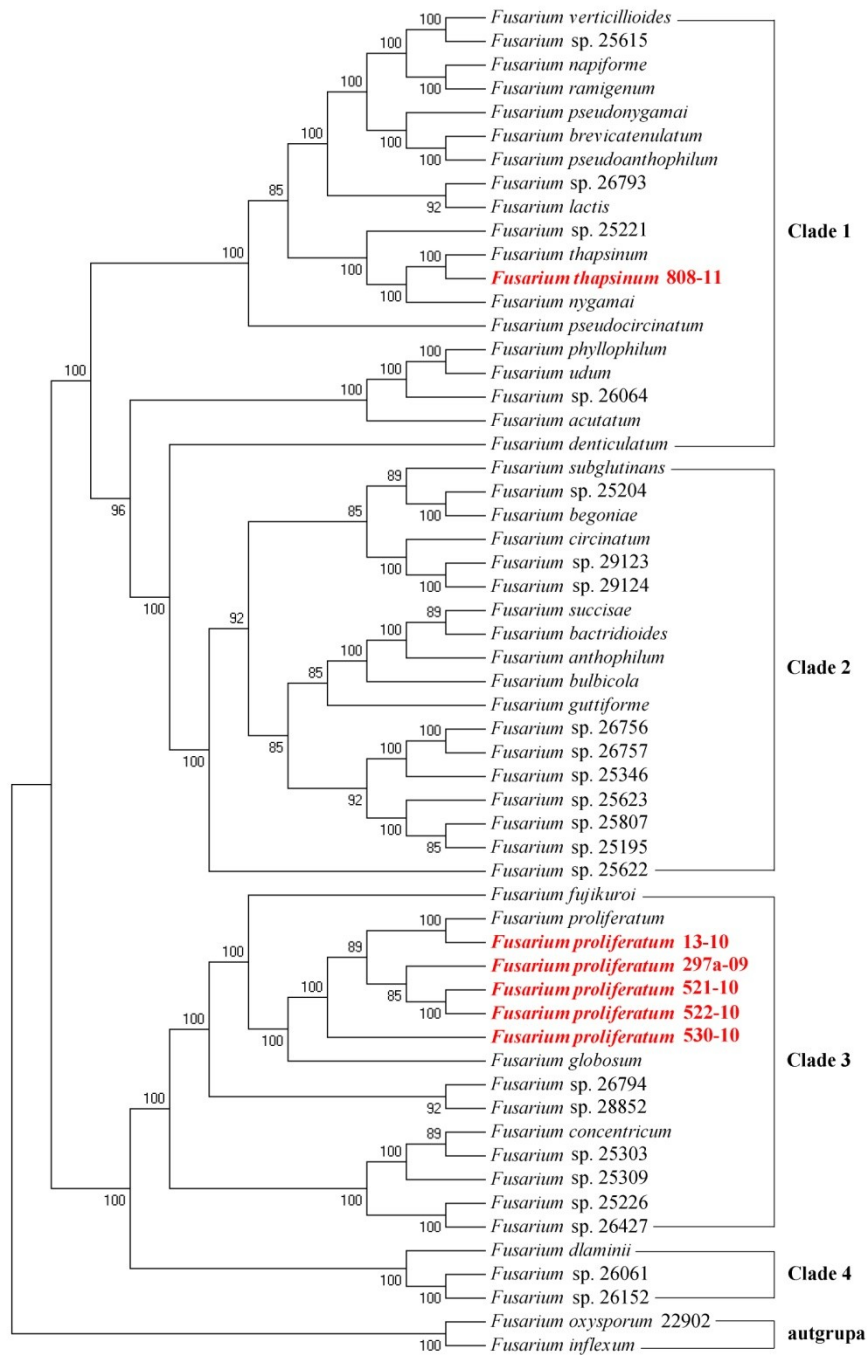
Filogenetska analiza *F. proliferatum* i *F. thapsinum*. Sekvence ITS regiona rDNK izolata 297a-09 (*F. proliferatum*) i 808-11 (*F. thapsinum*) iz sirka poreklom iz Srbije, i 49 dostupnih sekvenci vrsta kompleksa *G. fujikuroi* međusobno su uparene i rekonstruisano je filogenetsko stablo.

Analizom filogenetskog stabla (slika 26) rekonstruisanog na osnovu sekvenci ITS regiona rDNK uočljiva je podela na dva delimično definisana klastera ili dve grupe. Utvrđeno je da su ispitivani izolati 297a-09 (*F. proliferatum*) i 808-11 (*F. thapsinum*) smešteni unutar drugog klastera. U okviru ovog klastera među izolatima različitih vrsta kompleksa *G. fujikuroi*, grupisan je izolat vrste *F. proliferatum* iz orhideje poreklom iz Nemačke i izolat vrste *F. thapsinum* iz *S. bicolor* poreklom iz Južne Afrike. Pored ovih vrsta u drugi klaster grupisali su se izolati vrste *F. acutatum*, *F. concentricum*, *F. dlamirii*, *F. fujikuroi*, *F. nygamai*, *F. phyllophilum*, *F. udum* i druge *Fusarium* sp. ukazujući na njihovu veću srodnost na osnovu ovog dela genoma. U prvom, većem klasteru koji sadrži oko 30 vrsta, između ostalih, nalaze se vrste *F. anthophilum*, *F. bactridioides*, *F. circinatum*, *F. denticulatum*, *F. guttiforme*, *F. napiforme*, *F. pseudoanthophilum*, *F. pseudocircinatum*, *F. pseudonygamai*, *F. ramigenum*, *F. sacchari*, *F. subglutinans*, *F. succisae*, *F. verticillioides* i druge *Fusarium* sp.



Slika 26. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci ITS regiona rDNK 51 izolata vrsta kompleksa *G. fujikuroi* korišćenjem MEGA 5 softvera upotrebom Maximum Parsimony metode sa bootstrap analizom u 1000 ponavljanja gde su bootstrap vrednosti (>50%) prikazane pored odgovarajućih grana. Izolati iz gajenog sirka iz Srbije označeni su crvenom bojom

Filogenetsko stablo rekonstruisano iz fragmenta TEF nuklearnog gena pokazalo je jasno razdvajanje odabranih izolata vrsta *G. fujikuroi* kompleksa u četiri klastera (slika 27). Sekvenca izolata 808–11 (*F. thapsinum*) grupisana je u prvi klaster sa većinom vrsta kompleksa *G. fujikuroi*, među kojima je i sekvenca izolata *F. thapsinum* iz *S. bicolor* poreklom iz Južne Afrike, kao i vrste *F. acutatum*, *F. brevicatenulatum*, *F. denticulatum*, *F. napiforme*, *F. nygamai*, *F. pseudoanthophilum*, *F. pseudocircinatum*, *F. pseudonygamai*, *F. udum*, *F. verticillioides* i druge *Fusarium* sp. Sekvence izolata 297a–09, 13–10, 521–10, 522–10 i 530–10 (*F. proliferatum*) grupisane su u treći klaster zajedno sa vrstom *F. proliferatum* iz orhideje poreklom iz Nemačke, kao i sa vrstama *F. concentricum*, *F. fujikuroi*, *F. globosum*, *F. sacchari* i drugim *Fusarium* sp. Grupisanje u okviru oba klastera snažno je podržano sa “bootstrap” vrednostima od 100%. U drugom klasteru grupisane su vrste *F. anthophilum*, *F. bactridioides*, *F. begoniae*, *F. bulbicola*, *F. circinatum*, *F. guttiforme*, *F. succisae*, *F. subglutinans* i druge *Fusarium* sp., dok unutar četvrtog klastera nalazi se vrsta *F. dlamirii* i dve *Fusarium* sp.

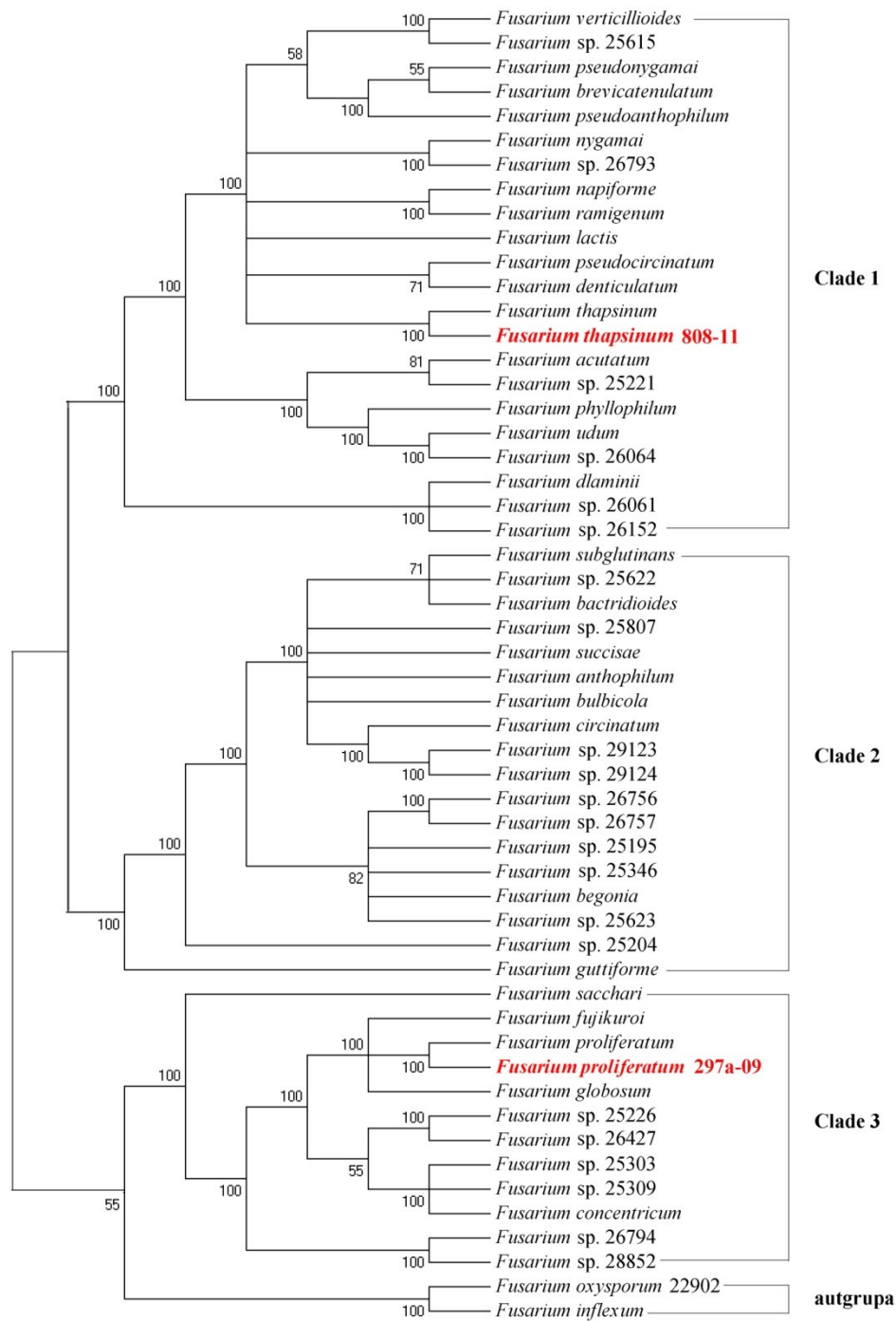


Slika 27. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci nuklearnog gena za protein elongacioni faktor TEF-1 α 55 izolata vrsta kompleksa *G. fujikuroi* korišćenjem MEGA 5 softvera upotrebom Maximum Parsimony metode sa bootstrap analizom u 1000 ponavljanja gde su bootstrap vrednosti (>50%) prikazane pored odgovarajućih grana. Stablo je rutovano sa *F. oxysporum* i *F. inflexum*. Izolati iz gajenog sarka iz Srbije označeni su crvenom bojom

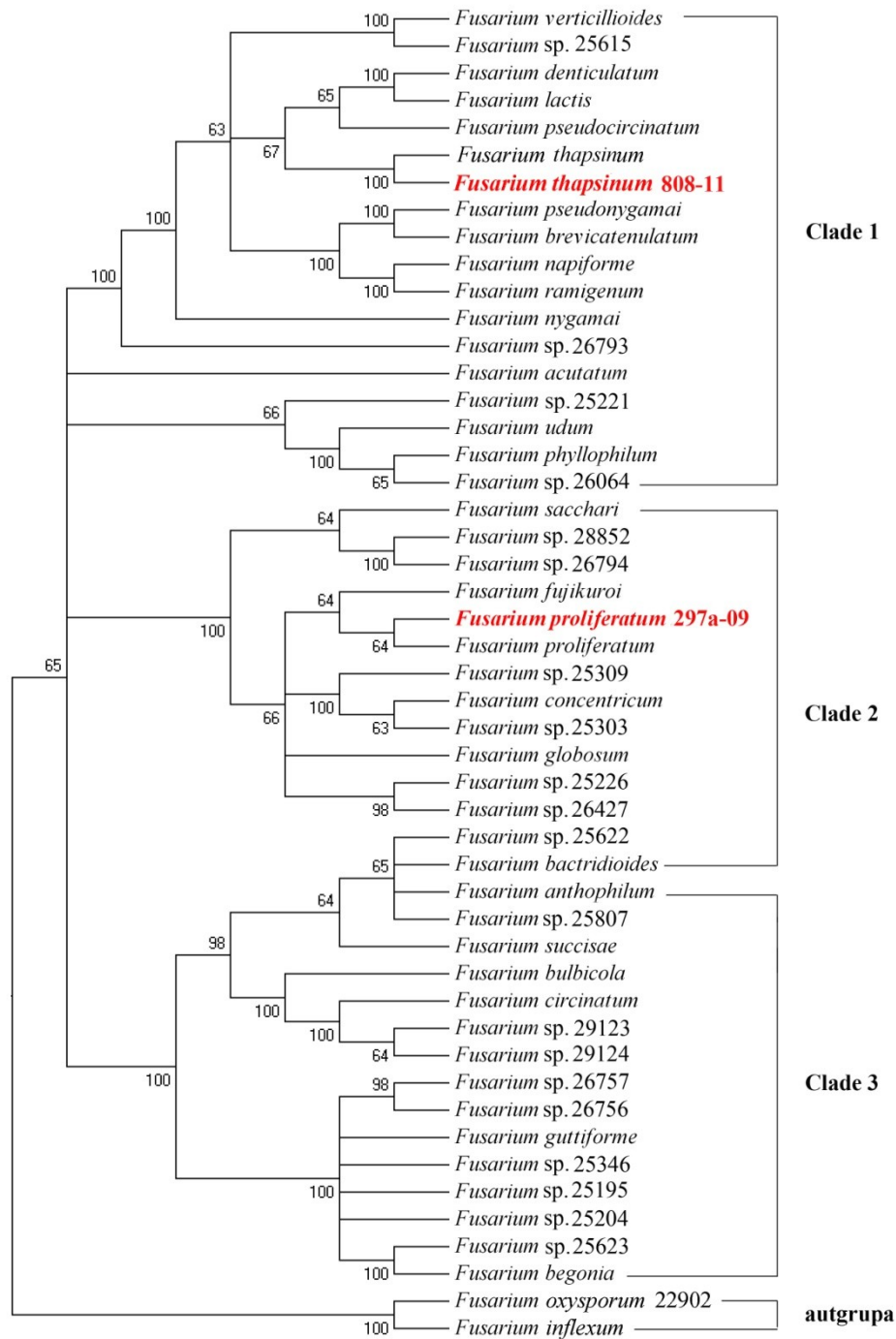
Na osnovu delimičnih nukleotidnih sekvenci nuklearnog gena za β -tubulin izolata 297a-09 (*F. proliferatum*) i 808-11 (*F. thapsinum*) iz sirka poreklom iz Srbije, kao i 52 dostupne sekvence vrsta kompleksa *G. fujikuroi* rekonstruisano je filogenetsko stablo koje je pokazalo razdvajanje odabranih izolata u tri klastera (slika 28). Sekvenca izolata 808-11 (*F. thapsinum*) grupisana je u prvi klaster sa većinom vrsta kompleksa *G. fujikuroi*, među kojima je i sekvenca izolata *F. thapsinum* iz *S. bicolor* poreklom iz Južne Afrike, kao i vrste *F. acutatum*, *F. brevicatenulatum*, *F. denticulatum*, *F. dlaminii*, *F. napiforme*, *F. nygamai*, *F. pseudoanthophilum*, *F. pseudocircinatum*, *F. pseudonygamai*, *F. udum*, *F. verticillioides* i druge *Fusarium* sp., dok je sekvenca izolata 297a-09, (*F. proliferatum*) grupisana u treći klaster zajedno sa vrstom *F. proliferatum* iz orhideje poreklom iz Nemačke, kao i sa vrstama *F. concentricum*, *F. fujikuroi*, *F. globosum*, *F. sacchari* i drugim *Fusarium* sp. Grupisanje u okviru oba klastera snažno je podržano sa “bootstrap” vrednostima od 100%. U drugom klasteru grupisane su vrste *F. anthophilum*, *F. bactridioides*, *F. begoniae*, *F. bulbicola*, *F. circinatum*, *F. guttiforme*, *F. succisae*, *F. subglutinans* i druge *Fusarium* sp.

Rezultati filogenetske analize 49 nukleotidnih sekvenci nuklearnog gena za calmodulin takođe su pokazali da izolat 808-11 (*F. thapsinum*) pripada prvom klasteru, dok se izolat 297a-09 (*F. proliferatum*) grupiše u odvojeni klaster (slika 29). U okviru prvog klastera sa ispitivanim izolatom 808-11, pored sekvence izolata *F. thapsinum* iz *S. bicolor* poreklom iz Južne Afrike, smeštene su i srodnije vrste *F. acutatum*, *F. brevicatenulatum*, *F. denticulatum*, *F. dlaminii*, *F. napiforme*, *F. nygamai*, *F. pseudoanthophilum*, *F. pseudocircinatum*, *F. pseudonygamai*, *F. udum*, *F. verticillioides* i druge *Fusarium* sp. U okviru drugog klastera sa ispitivanim izolatom 297a-09 grupisana je vrsta *F. proliferatum* iz orhideje poreklom iz Nemačke, kao i vrste *F. concentricum*, *F. fujikuroi*, *F. globosum*, *F. sacchari* i druge. Grupisanje u okviru oba klastera snažno je podržano sa “bootstrap” vrednostima od 100%. U trećem klasteru grupisane su sekvence izolata *F. anthophilum*, *F. bactridioides*, *F. begoniae*, *F. bulbicola*, *F. circinatum*, *F. guttiforme*, *F. succisae*, *F. subglutinans* i druge *Fusarium* sp.

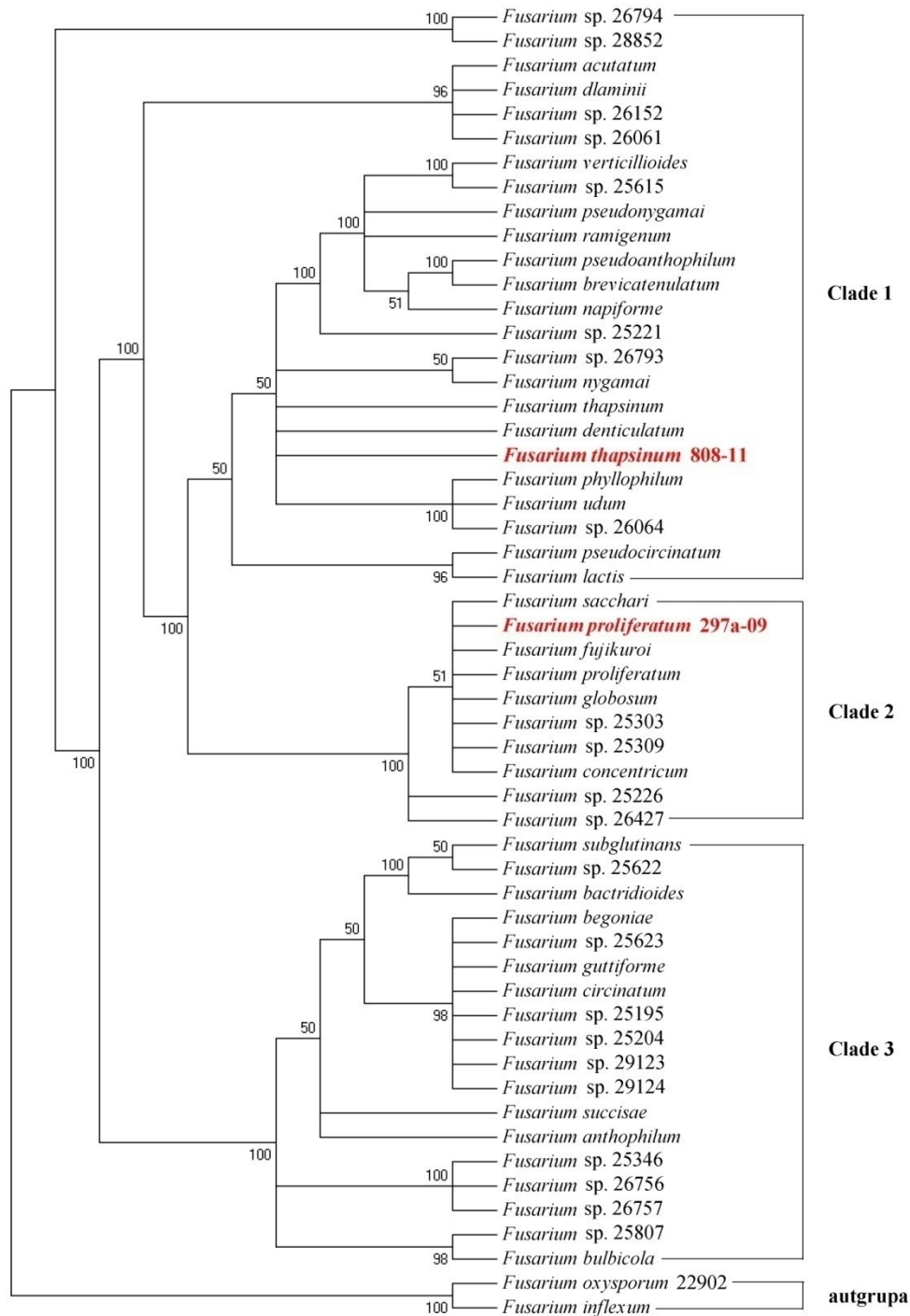
Filogenetsko stablo rekonstruisano iz fragmenta mitohondrijalnog gena za malu podjedinicu ribozomske DNK, pokazalo je jasno razdvajanje 54 odabrana izolata vrsta kompleksa *G. fujikuroi* u tri klastera (slika 30). Sekvenca izolata 808–11 grupisana je u prvi klaster sa većinom vrsta *G. fujikuroi* kompleksa, među kojima je i sekvenca izolata *F. thapsinum* iz *S. bicolor* poreklom iz Južne Afrike, kao i vrste *F. acutatum*, *F. brevicatenulatum*, *F. denticulatum*, *F. dlaminii*, *F. napiforme*, *F. nygamai*, *F. pseudoanthophilum*, *F. pseudocircinatum*, *F. pseudonygamai*, *F. udum*, *F. verticillioides* i druge *Fusarium* sp. Sekvenca izolata 297a–09 grupisana je u drugi klaster zajedno sa vrstom *F. proliferatum* iz orhideje poreklom iz Nemačke, kao i sa vrstama *F. concentricum*, *F. fujikuroi*, *F. globosum*, *F. sacchari* i drugim *Fusarium* sp. Grupisanje u okviru oba klastera snažno je podržano sa “bootstrap” vrednostima od 100%. U trećem klasteru grupisane su sekvence izolata *F. anthophilum*, *F. bactridioides*, *F. begoniae*, *F. bulbicola*, *F. circinatum*, *F. guttiforme*, *F. succisae*, *F. subglutinans* i druge *Fusarium* sp.



Slika 28. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci nuklearnog gena za protein β -tubulin 52 izolata vrsta kompleksa *G. fujikuroi* korišćenjem MEGA 5 softvera upotrebom Maximum Parsimony metode sa bootstrap analizom u 1000 ponavljanja gde su bootstrap vrednosti (>50%) prikazane pored odgovarajućih grana. Stablo je rutovano sa *F. oxysporum* i *F. inflexum*. Izolati iz gajenog sirka iz Srbije označeni su crvenom bojom



Slika 29. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci nuklearnog gena za protein calmodulin 47 izolata vrsta kompleksa *G. fujikuroi* korišćenjem MEGA 5 softvera upotrebom Maximum Parsimony metode sa bootstrap analizom u 1000 ponavljanja gde su bootstrap vrednosti (>50%) prikazane pored odgovarajućih grana. Stablo je rutovano sa *F. oxysporum* i *F. inflexum*. Izolati iz gajenog sirka iz Srbije označeni su crvenom bojom

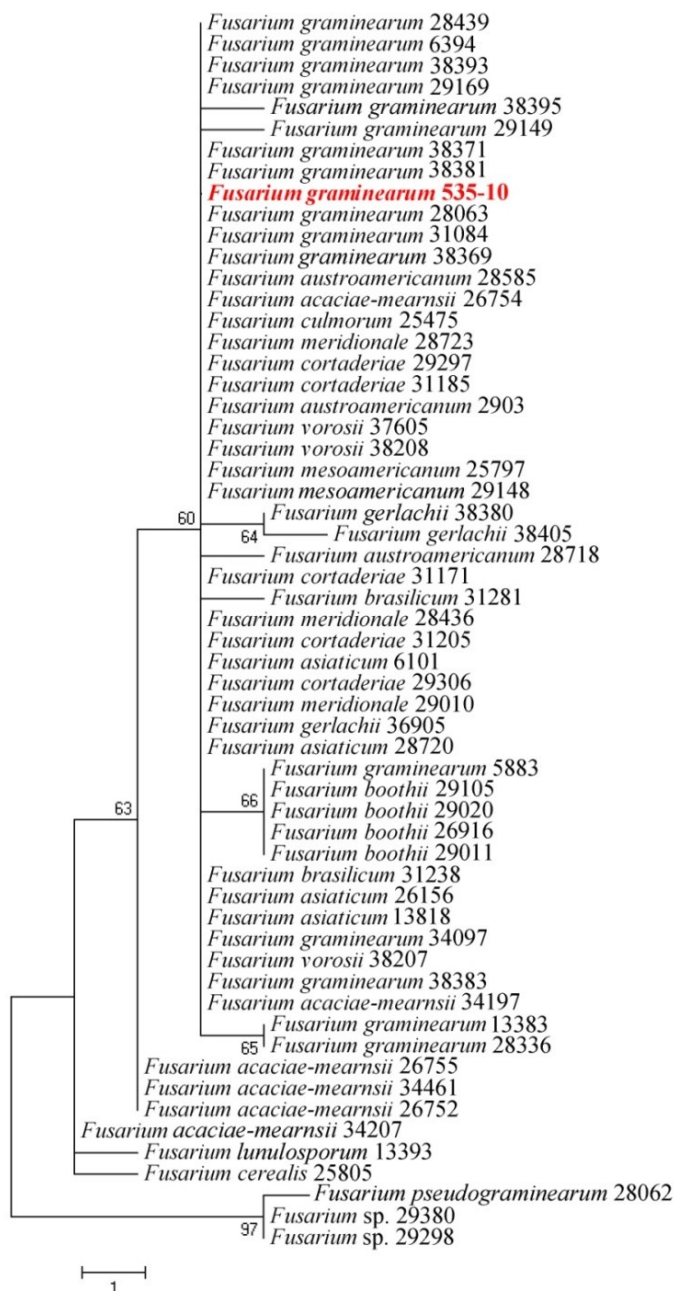


Slika 30. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci mitohondrijalnog gena mtSSU rDNK 52 izolata vrsta kompleksa *G. fujikuroi* korišćenjem MEGA 5 softvera upotrebom Maximum Parsimony metode sa bootstrap analizom u 1000 ponavljanja gde su bootstrap vrednosti (>50%) prikazane pored odgovarajućih grana. Stablo je rutovano sa *F. oxysporum* i *F. inflexum*. Izolati iz gajenog sirka iz Srbije označeni su crvenom bojom

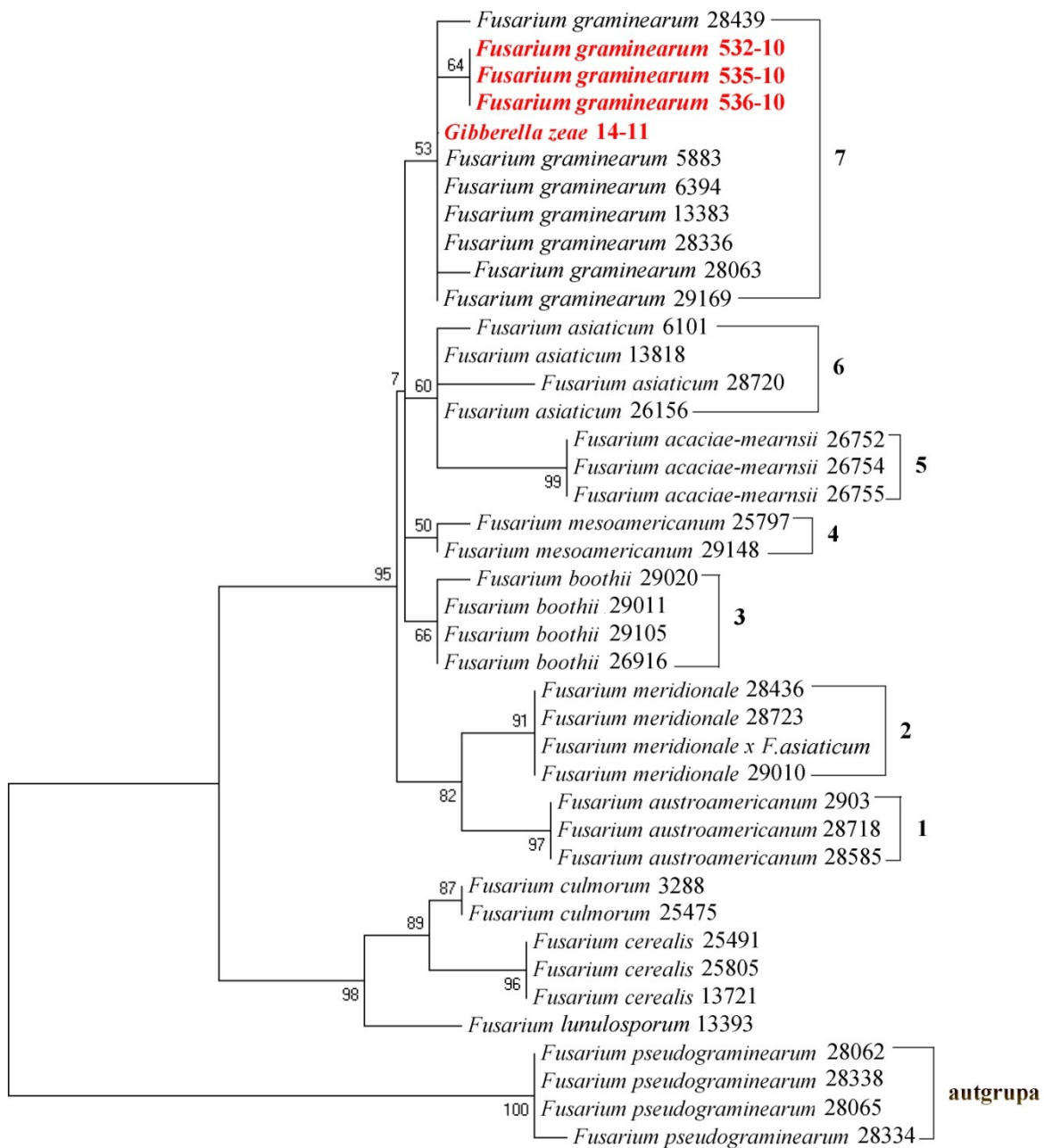
Filogenetska analiza *F. graminearum*. Sekvenca ITS regiona rDNK izolata 535–10 (*F. graminearum*) iz prizemnog dela stabla sirka poreklom iz Čantavira i 54 dostupne sekvence podeljene u 11 ranije opisanih filogeografskih linija unutar *F. graminearum* kompleksa, poreklom iz Severne i Južne Hemisfere odabrane su za filogenetsku analizu. Analizom filogenetskog stabla rekonstruisanog na osnovu sekvenci ITS regiona rDNK, nije dobijeno očekivano razdvajanje (slika 31). Zbog visoke homologije sekvenci ITS regiona svi izolati *F. graminearum* kompleksa grupisani su u jedan zajednički klaster, u koji je između ostalog grupisana i sekvenca ispitivanog izolata 535–10 (*F. graminearum*). Najviši stepen homologije odabranih sekvenci kretao se 99,9–100%, a razlika u samo jednom nukleotidu pokazala se kod sekvenci izolata *F. austroamericanum* (DQ459838), *F. boothii* (DQ459845–48) i *F. brasiliicum* (DQ459861). Razlika u tri nukleotida (99,4%) pokazala se kod sekvenci izolata *F. acaciae–mearnsii* (DQ459849, DQ459851, DQ459853–54), koje su se izdvojile u zaseban klaster.

Filogenetska analiza unutar *Fg* klastera obavljena na osnovu sekvenci gena za TEF–1 α uključila je 33 izolata odabrana iz svetske kolekcije, koji su genetički raznovrsni za ovaj takson, zajedno sa četiri ispitivana izolata. Rekonstruisano stablo pokazalo je izdvajanje sedam klastera unutar kompleksa *F. graminearum* koji su označeni sa oznakama vrsta od 1–7. Ispitivani izolati 532–10, 535–10, 536–10 (*F. graminearum*) i 14–11 (teleomorf *G. zea*) izolovani iz prizemnog dela stabla sirka poreklom iz Čantavira grupisani su u klaster sa oznakom 7, zajedno sa ostalim predstavnicima vrste *F. graminearum* (slika 32). Za vrste ovog klastera karakteristično je da preovlađuju u Severnoj hemisferi, poreklom su iz Mađarske, Holandije, Irana i Srednje Amerike. Grupisanje u okviru klastera podržano je sa “bootstrap” vrednostima od 95%.

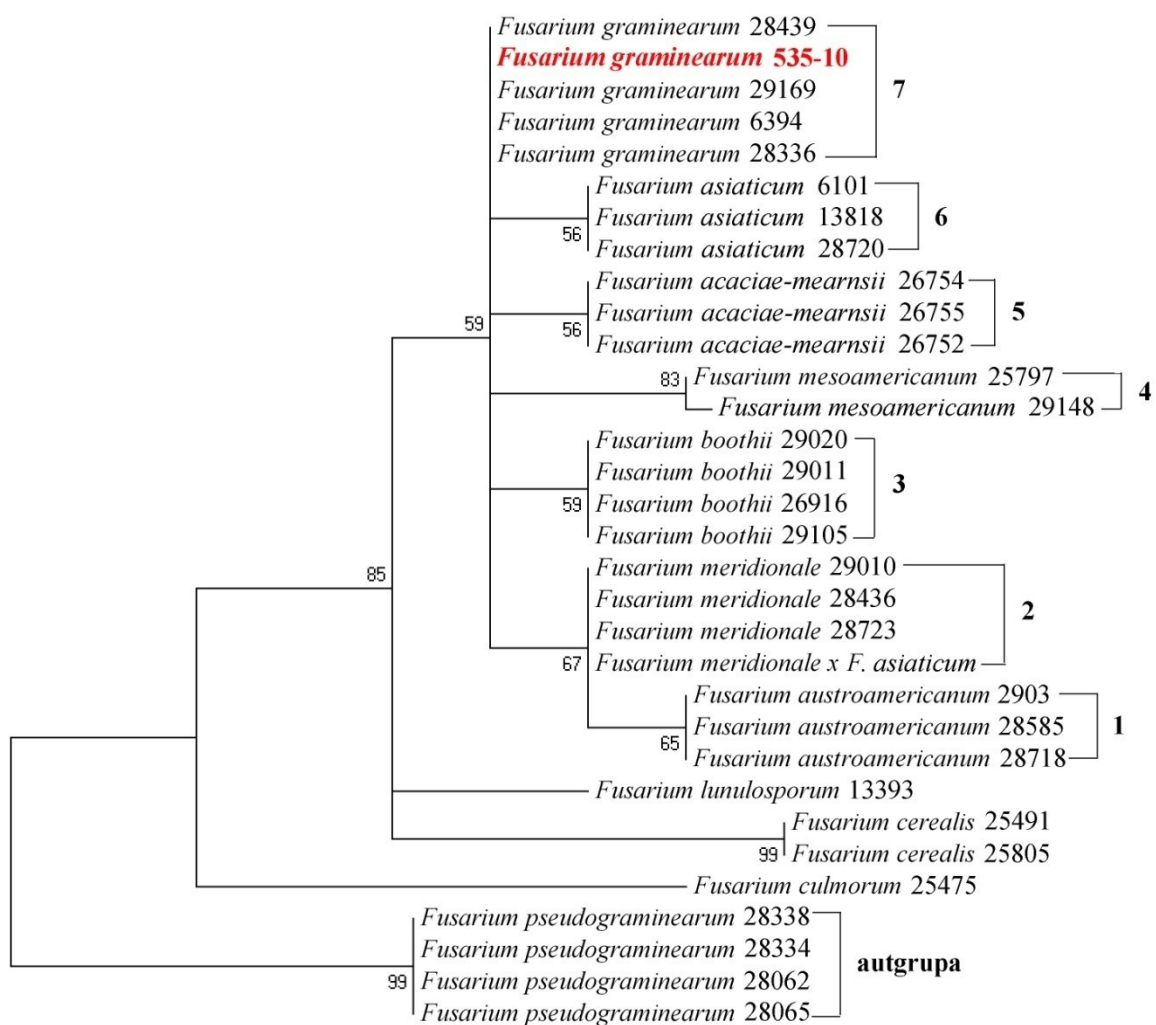
Na osnovu delimičnih nukleotidnih sekvenci gena za β -tubulin izolata 535–10 (*F. graminearum*), kao i 27 dostupne sekvence vrsta kompleksa *F. graminearum*, rekonstruisano je filogenetsko stablo koje je pokazalo razdvajanje odabranih izolata vrsta kompleksa *F. graminearum* u sedam klastera (slika 33). Sekvenca izolata 535–10 grupisala se u sedmi klaster zajedno sa ostalim izolatima vrste *F. graminearum*. Ovi izolati preovlađuju u Severnoj hemisferi, poreklom su iz Mađarske, Holandije i Srednje Amerike. Grupisanje u okviru klastera podržano je sa “bootstrap” vrednostima od 85%



Slika 31. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci ITS regiona rDNK 55 izolata vrsta kompleksa *F. graminearum* korišćenjem MEGA 5 softvera upotrebom Maximum Parsimony metode sa bootstrap analizom u 1000 ponavljanja gde su bootstrap vrednosti (>50%) prikazane pored odgovarajućih grana. Stablo je rutovano sa *F. pseudograminearum* i *Fusarium* sp. NRRL 29380 i NRRL 29298. Izolat iz gajenog sirka iz Srbije označen je crvenom bojom

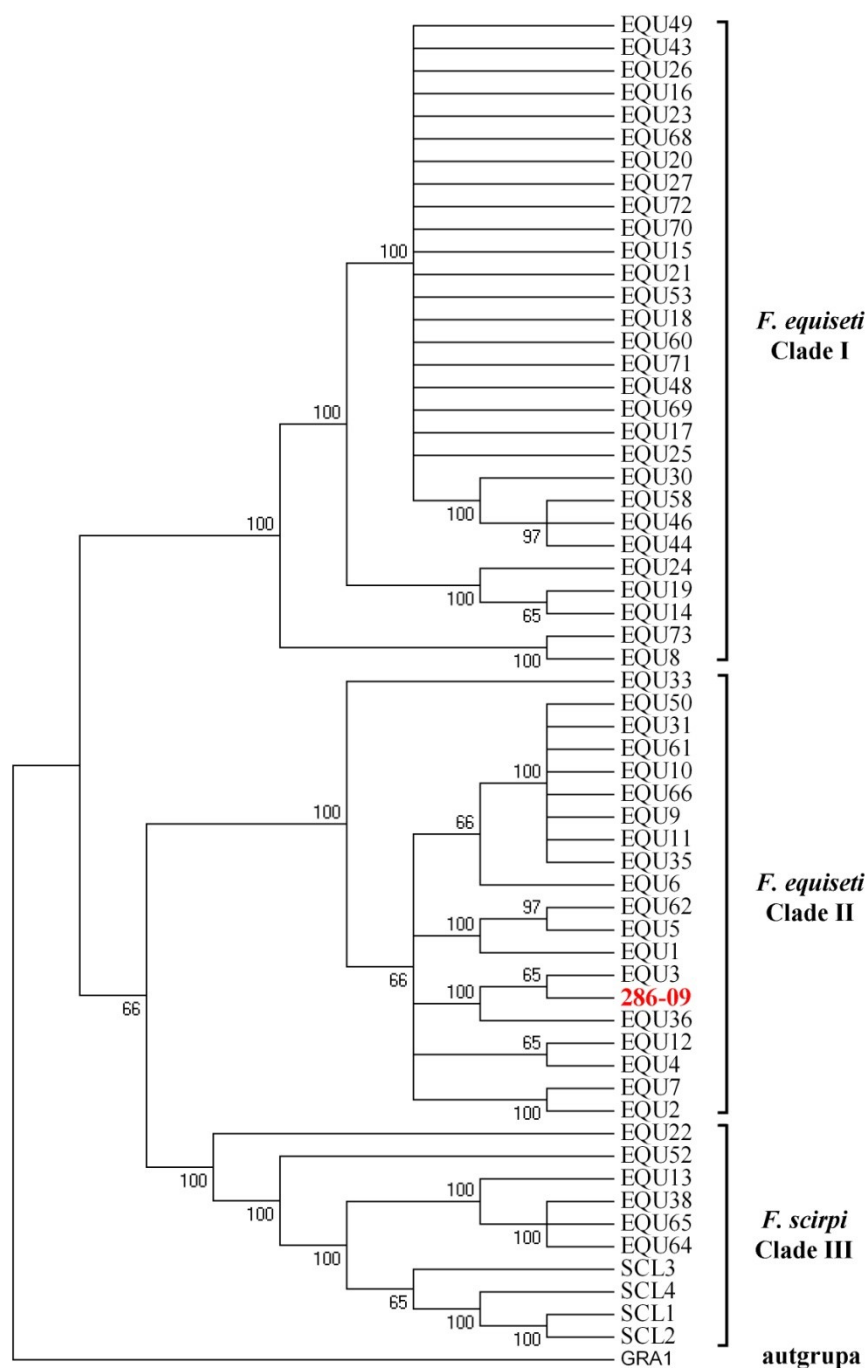


Slika 32. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci nuklearnog gena za protein elongacioni faktor TEF-1 α 37 izolata vrsta kompleksa *F. graminearum* korišćenjem MEGA 5 softvera upotrebom Maximum Parsimony metode sa bootstrap analizom u 1000 ponavljanja gde su bootstrap vrednosti (>50%) prikazane pored odgovarajućih grana. Stablo je rutovano sa *F. pseudograminearum*. Izolati iz gajenog sirka iz Srbije označeni su crvenom bojom



Slika 33. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci nuklearnog gena za protein β -tubulin 28 izolata vrsta kompleksa *F. graminearum* korišćenjem MEGA 5 softvera upotrebom Maximum Parsimony metode sa bootstrap analizom u 1000 ponavljanja gde su bootstrap vrednosti (>50%) prikazane pored odgovarajućih grana. Stablo je rutovano sa *F. pseudograminearum*. Izolat iz gajenog sirka iz Srbije označen je crvenom bojom

Filogenetska analiza *F. equiseti*. Delimična nukleotidna sekvenca nuklearnog gena za elongacioni faktor TEF-1 α izolata 286-09 (*F. equiseti*) iz prizemnog dela stabla sirka poreklom iz Bačkog Petrovca, kao i 54 dostupne sekvence vrste *F. equiseti*, zajedno sa četiri izolata vrste *F. scirpi* koje su blisko povezane, odabrane su za filogenetsku analizu. Rekonstruisano filogenetsko stablo pokazalo je jasno razdvajanje odabranih izolata vrste *F. equiseti* u tri klastera (slika 34). Sekvenca izolata 286-09 grupisana je u drugi klaster sa sekvencama 12 izolata vrste *F. equiseti*, poreklom iz Španije, dok je ostalih 20 sekvenci izolata vrste *F. equiseti*, poreklom iz Severne Evrope grupisano u prvi klaster. Ostalih šest sekvenci izolata vrste *F. equiseti* različitog porekla, iz Malte, Norveške, SAD i Kanade, smeštene su u treći klaster sa sekvencama blisko srodne vrste, *F. scirpi*. Grupisanje u okviru oba klastera snažno je podržano sa “bootstrap” vrednostima od 100%.



Slika 34. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci nuklearnog gena za protein elongacioni faktor TEF-1 α 55 izolata vrste *F. equiseti* i četiri izolata vrste *F. scirpi* korišćenjem MEGA 5 softvera upotrebom Maximum Parsimony metode sa bootstrap analizom u 1000 ponavljanja gde su bootstrap vrednosti (>50%) prikazane pored odgovarajućih grana. Stablo je rutovano sa *F. graminearum*. Izolat iz gajenog sirka iz Srbije označen je crvenom bojom

5.8. Osetljivost različitih genotipova sirka prema *Fusarium* spp.

Rezultati utvrđivanja reakcije različitih genotipova sirka prema prevalentnim vrstama *Fusarium* spp. ukazali su na postojanje različitih nivoa osetljivosti klijanaca komercijalnih sorti i oplemenjivačkog materijala. Uporednim ispitivanjem osetljivosti 11 različitih genotipova sirka u uslovima staklenika i biljaka u polju (veštačka inokulacija i prirodna zaraza stabla), dobijeni su značajni podaci o potencijalu genotipova sirka u agroekološkim uslovima u Srbiji.

5.8.1. Osetljivost klijanaca sirka prema *Fusarium* spp. u uslovima staklenika

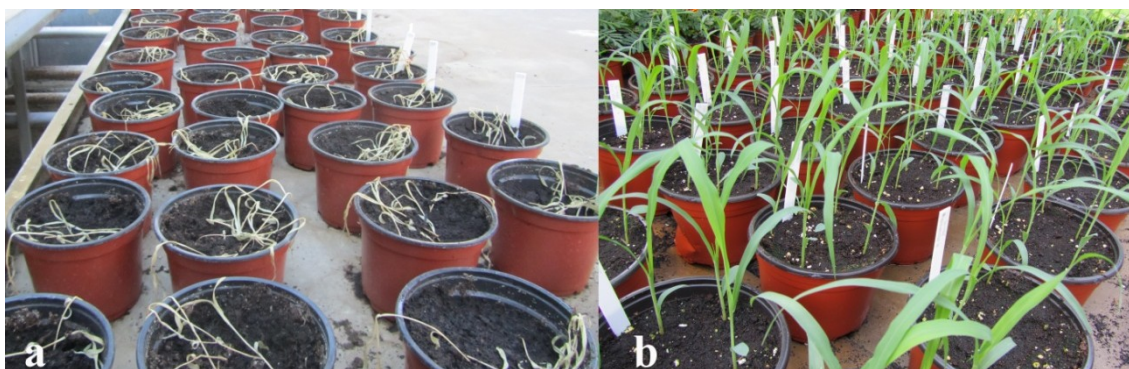
Za ispitivanje stepena osetljivosti 11 različitih genotipova sirka u eksperimentalnim uslovima staklenika odabrano je 12 izolata *Fusarium* spp., za koje je prethodno urađena karakterizacija na morfološkom i molekularnom nivou. Svih 12 izolata, 286–09 (*F. equiseti*), 297a–09, 13–10, 521–10, 522–10, 530–10 (*F. proliferatum*), 532–10, 535–10, 536–10 (*F. graminearum*) i 291–09, 315–09, 539–10 (*E. nigrum*) izazvalo je reakciju na klijancima šest različitih genotipova, sirka metlaša ('Prima' i 'Reform') i sirka za zrno ('Alba', A28, parc.262/2010, PI534163 02 SD, PI656114 01 i SD PI576382 03 SD) u vidu nekroze različitog intenziteta, koja je ocenjena na osnovu skale stepena zaraženosti klijanaca sirka od 0 do 5 (tabela 11). Na genotipovima sirka za zrno 'Gold', kao i na A73 i PI595720 02 SD ispitivani izolati, odnosno četiri različite vrste kompleksa gljiva nisu prouzrokovali patološke promene ili razvoj simptoma na klijancima sirka.

Tabela 11. Prosečne ocene intenziteta zaraze klijanaca različitih genotipova sirka u uslovima veštačke inokulacije izolatima *Fusarium* spp. i *Epicoccum nigrum*

Genotip sirka	Vrste/Izolati												K
	<i>F. equiseti</i>	<i>F. proliferatum</i>					<i>F. graminearum</i>			<i>E. nigrum</i>			
	286-09	297a-09	13-10	521-10	522-10	530-10	532-10	535-10	536-10	291-09	315-09	539-10	
'ALBA'	0,00*	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
'GOLD'	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
'PRIMA'	4,90	4,90	4,95	5,00	4,90	5,00	5,00	5,00	5,00	1,55	1,60	1,60	0,00
'REFORM'	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	0,00
A28	0,00	0,25	0,65	1,00	1,00	0,90	0,15	0,25	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00
A73	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
parc.262/2010	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PI534163 02 SD	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,75	2,75	3,15	0,00
PI576382 03 SD	0,00	0,15	0,20	0,00	0,15	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PI595720 02 SD	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PI656114 01 SD	4,10	4,15	4,00	4,10	3,95	3,90	0,25	0,25	0,25	1,70	1,30	1,00	0,00

*Skala ocene intenziteta zaraze od 0 do 5 (Hooker, 1957)

Ispitivani izolati po tipu simptoma, koje su prouzrokovali na klijancima 11 različitih genotipova sirka, mogu se podeliti u četiri međusobno različite grupe. Prvu grupu činio je izolat 286–09 (*F. equiseti*), koji je prouzrokovao potpuno sušenje i propadanje inokulisanih klijanaca sorte 'Prima', 'Reform', parc.262/2010 i američke linije PI534163 02 SD, dok je nekrozu celog stabla prouzrokovao na liniji PI656114 01 SD (slika 35a). Drugu grupu činili su izolati 297a–09, 13–10, 521–10, 522–10, 530–10 (*F. proliferatum*), koji su takođe prouzrokovali potpuno sušenje klijanaca sorte 'Prima', 'Reform', parc.262/2010 i američke linije PI534163 02 SD, a nešto slabiju nekrozu u vidu sitnih pega na klijancima sorte A28 i linije PI576382 03 SD. Međutim, uočena je varijabilnost unutar vrste, gde je od pet izolata *F. proliferatum*, samo jedan (530–10) prouzokovao simptome na klijancima hibrida 'Alba'. Treću grupu sačinjavali su izolati 532–10, 535–10 i 536–10 (*F. graminearum*), koji su u poređenju sa prethodne dve grupe prouzrokovali slične simptome na klijancima sorte 'Prima', 'Reform', parc.262/2010 i američke linije PI534163 02 SD, dok su na klijancima sorte A28 i linije PI656114 01 SD prouzrokovali slabiju nekrozu u vidu sitnih pega. Izolati četvrte grupe, 291–09, 315–09 i 539–10 (*E. nigrum*) prouzrokovali su potpuno sušenje klijanaca sorte sirka metlaša 'Reform', a slabiju nekrozu u vidu sitnih do dugih pega na klijancima sorte 'Prima' i američkim linijama PI656114 01 SD i PI534163 02 SD. U uslovima postavljenog eksperimenta izolati sve četiri grupe nisu prouzrokovali nekrozu na genotipovima sirka za zrno 'Alba' (osim izolata 530–10), Gold i A73, kao i na američkim linijama PI595720 02 SD i PI576382 03 SD (slika 35b).



Slika 35: Osetljivost klijanaca sirka u uslovima staklenika: reakcije klijanaca sorte 'Reform' (a) i sorte A73 (b) izazvane različitim ispitivanim izolatima

Na osnovu dvofaktorijalne analize varijanse (ANOVA) za stepen zaraze klijanaca u kontrolisanim uslovima utvrđene su statistički vrlo značajne razlike ($P < 0,001$), kako između genotipova i izolata, tako i njihove interakcije (tabela 12).

Tabela 12. Rezultati dvofaktorijalne analize varijanse za osetljivost klijanaca različitih genotipova sirka prema *Fusarium* spp.

Izvor varijacije	Suma kvadrata	Stepeni slobode	Varijanse	F količnik	P vrednost
Genotip	9889,780	10	988,978	4965,450	<0,001
Izolat	1415,741	12	117,978	592,345	<0,001
Genotip x Izolat	2667,529	120	22,229	111,609	<0,001
Greška	541,150	2717	0,199		
Ukupno	14514,200	2859			

Parna poređenja osetljivosti genotipova prema *Fusarium* spp. pokazala su da između genotipova 'Gold', A73, PI595720 02 SD, PI576382 03 SD i 'Alba' ne postoji statistički značajna razlika (tabela 13). Razlike između ove homogene grupe i drugih ispitivanih genotipova (sorte 'Prima', 'Reform', parc. 262/2010 i A28; linije PI656114 01 SD i PI534163 02 SD) statistički su vrlo značajne.

Tabela 13. Razvrstavanje genotipova sirka u homogene grupe na osnovu stepena osetljivosti klijanaca prema *Fusarium* spp.

Genotip sirka	Homogene grupe*						
	1	2	3	4	5	6	7
'Gold'	0,0000						
A73	0,0000						
PI595720 02 SD	0,0000						
PI576382 03 SD	0,0538						
'Alba'	0,0769						
A28		0,3423					
PI656114 01 SD			2,2269				
parc. 262/2010				3,4615			
'Prima'					3,800		
PI534163 02 SD						4,1269	
'Reform'							4,6154
P vrednost	0,500	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

*Homogene grupe utvrđene na osnovu Duncan testa

Parna poređenja izolata i njihovo razvrstavanje u homogene grupe ukazuju da su ispitivani izolati prouzrokovali četiri različita tipa simptoma na klijanacima sirka, zavisno od genotipa, uključujući i kontrolu (tabela 14). Grupa izolata 286–09 (*F. equiseti*), 297a–09, 13–10, 521–10, 522–10, 530–10 (*F. proliferatum*) reagovala je homogeno jer su izolati prouzrokovali potpuno sušenje i propadanje klijanaca sirka. Ovi izolati nisu se međusobno statistički značajno razlikovali, ali jesu od svih ostalih izolata i od kontrole. Drugu homogenu grupu sačinjavali su izolati 532–10, 535–10 i 536–10 (*F. graminearum*) koji su prouzrokovali slične simptome kao i prethodna grupa, ali nešto slabijeg intenziteta na sorti A28 i liniji PI656114 01 SD, i nisu se međusobno statistički značajno razlikovali. Treća grupa izolata 291–09, 315–09 i 539–10 (*E. nigrum*) statistički se razlikovala od ostalih grupa i od kontrole, jer su izolati prouzrokovali niži nivo nekroze.

Tabela 14. Razvrstavanje izolata u homogene grupe na osnovu prosečnih ocena osetljivosti genotipova sirka prema ispitivanim izolatima gljiva

Vrsta	Izolat	Homogene grupe*			
		1	2	3	4
	Kontrola	0,0000			
<i>E. nigrum</i>	291–09		0,9682		
<i>E. nigrum</i>	315–09		0,9773		
<i>E. nigrum</i>	539–10		1,0000		
<i>F. graminearum</i>	532–10			1,8545	
<i>F. graminearum</i>	535–10			1,8636	
<i>F. graminearum</i>	536–10			1,8636	
<i>F. equiseti</i>	286–09			2,1818	2,1818
<i>F. proliferatum</i>	297a–09			2,2227	2,2227
<i>F. proliferatum</i>	13–10			2,2545	2,2545
<i>F. proliferatum</i>	521–10			2,2727	2,2727
<i>F. proliferatum</i>	522–10			2,2818	2,2818
<i>F. proliferatum</i>	530–10				2,3636
P vrednost		1,000	0,885	0,075	0,449

*Homogene grupe utvrđene na osnovu Duncan testa

5.8.2. Osetljivost stabla sirka prema *Fusarium* spp. u poljskim uslovima

Osetljivost stabla različitih genotipova sirka ocenjena je u 2010. i 2011. godini na lokalitetu Bački Petrovac (veštačka inokulacija stabla) i Čantavir (prirodna zaraza). Na osnovu intenziteta zaraze (nekroze) površinskog tkiva i tkiva na uzdužnom preseku

oko mesta inokulacije ocenjena je osetljivost ispitivanih genotipova sirka u uslovima veštačke inokulacije stabla izolatima *Fusarium* spp.

U prvoj godini, na oglednoj parceli u Bačkom Petrovcu, ispitivana je osetljivost stabla četiri genotipa komercijalnog sirka, dva genotipa sirka za zrno (hibridi 'Alba' i 'Gold') i dva genotipa sirka metlaša (sorte 'Prima' i 'Reform'). U drugoj godini ispitivanja, pored navedena četiri, uključena su još četiri genotipa sirka za zrno dobijena u razmeni iz SAD (linije PI656114 01 SD, PI534163 02 SD, PI595720 02 SD i PI576382 03 SD), koja su opisani kao otporni na vrste i forme roda *Fusarium*. Za ova ispitivanja korišćeni su izolati dve različite vrste iz roda *Fusarium*, koje su redovno bile izolovane iz zaraženog materijala sirka u Srbiji, i to: *F. equiseti* (286–09) i *F. proliferatum* (297a–09).

U uslovima prirodne zaraze ocenjena je osetljivost stabla dva genotipa sirka za zrno (hibridi 'Alba' i 'Gold') i dva genotipa sirka metlaša (sorte 'Prima' i 'Reform') na lokalitetu Čantavir.

Osetljivost sirka prema *Fusarium* spp. u uslovima veštačke inokulacije stabla. Na oglednoj parceli u Bačkom Petrovcu tokom 2010. i 2011. godine u poljskim uslovima ocenjena je osetljivost genotipova sirka u uslovima veštačke inokulacije stabla, koja se zasnivala na povređivanju biljnog tkiva direktnim unošenjem patogena u tkivo domaćina metodom inokuliranih čačkalica. Jasno vidljive promene boje tkiva uočene su oko mesta inokulacije, u vidu crvenkastomrkih pega, a kasnije se nekroza intenzivno širila na susedne internodije (slika 36). U nekim slučajevima, nekroza stabla nije bila vidljiva spolja već na uzdužnom preseku stabla.



Slika 36. Simptomi na stablu: Nekroza tkiva na površini stabla oko mesta inokulacije, (levo); nekroza tkiva na uzdužnom preseku stabla (sredina) i kontrola (desno)

a) Osetljivost sirka ocenjena na osnovu intenziteta površinske zaraze stabla oko mesta inokulacije. U zavisnosti od izolata, prosečna ocena intenziteta razvoja nekroze površine stabla u 2010. godini varirala je od 1,37 (*F. equiseti*, izolat 286–09) do 2,56 (*F. proliferatum*, izolat 297a–09) (tabela 15). U proseku, najmanju osetljivost prema *Fusarium* spp. ispoljili su hibridi sirka za zrno 'Alba' (prosečna ocena 1,19) i 'Gold' (prosečna ocena 1,39), a veću osetljivost sorte sirka metlaša 'Reform' (prosečna ocena 2,68) i 'Prima' (prosečna ocena 2,60). Rezultati u kontroli ukazuju da je sorta 'Reform' značajnije reagovala na mehaničku povredu stabla (ocena 1,17) u odnosu na druge genotipove sirka (ocene 0,13–0,89).

Tabela 15. Prosečne ocene intenziteta zaraze površinskog tkiva stabla sirka u uslovima vetačke inokulacije izolatima 286–09 (*Fusarium equiseti*) i 297a–09 (*Fusarium proliferatum*) (Bački Petrovac, 2010)

Genotip sirka	<i>Fusarium</i> spp.		Prosek	Kontrola
	<i>F. equiseti</i> (izolat 286–09)	<i>F. proliferatum</i> (izolat 297a–09)		
'Alba'	0,85*	1,53	1,19	0,43
'Gold'	0,65	2,13	1,39	0,13
'Prima'	2,08	3,12	2,60	0,89
'Reform'	1,90	3,45	2,68	1,17
Prosek	1,37	2,56	1,96	0,66

*Skala ocene intenziteta zaraze od 0 do 5 (Hooker, 1957)

U toku prve godine (2010) ispitivanja uočen je slab razvoj simptoma tipa nekroze u uslovima veštačke inokulacije stabla. Iz ovih biljaka nisu reizolovane vrste roda *Fusarium* već gljive koje su opisane kao sekundarni saprobi iz rodova *Alternaria*, *Penicillium* i *Aspergillus*. Verovatno zbog izuzetnih vremenskih uslova, u vidu neobično visoke relativne vlažnosti vazduha i jake rose u momentu inokulacije svi ispitivani genotipovi ispoljili su određenu osetljivost na mehaničke povrede što je rezultiralo koloniziranjem povređenog tkiva sekundarnim mikroorganizmima i pojavom niskog nivoa reakcije. Međutim, bez obzira na nekrozu na biljkama u negativnoj kontroli ona je bila statistički vrlo značajno različita od reakcije biljaka u tretmanima sa obe vrste *Fusarium*, tako da je bilo moguće tačno oceniti delovanje ispitivanih vrsta. U poređenju sa *F. equiseti*, vrsta *F. proliferatum* prouzrokovala je intenzivniju pojavu nekroze površinskog tkiva stabla sorte 'Prima' i 'Reform', slabiju hibrida 'Gold' i veoma slabu hibrida 'Alba'. Vrsta *F. equiseti* prouzrokovala je veoma slabu nekrozu površine stabla sorti metlaša ('Prima' i 'Reform') dok je na stablu hibrida 'Alba' bila vidljiva tek na uzdužnom preseku.

Dvofaktorijalnom analizom varijanse (ANOVA) za intenzitet zaraze površinskog tkiva stabla dobijena je P vrednost od $<0,001$. Ovi rezultati ukazuju da se srednje vrednosti intenziteta zaraze stabla sirka u 2010. godini statistički vrlo značajno razlikuju, posmatrajući genotipove i ispitivane izolate vrsta *F. equiseti* i *F. proliferatum*, kao i interakcije izolat x genotip (tabela 16).

Tabela 16. Rezultati dvofaktorijalne analize varijanse za intenzitet zaraze površinskog tkiva stabla sirka u uslovima veštačke inokulacije izolatima *Fusarium* spp. (Bački Petrovac, 2010)

Izvor varijacije	Suma kvadrata	Stepeni slobode	Varijanse	F količnik	P vrednost
Izolat	468,236	2	234,18	140,579	$<0,001$
Genotip	230,543	3	76,848	46,144	$<0,001$
Izolat x Genotip	72,650	6	12,108	7,271	$<0,001$
Greška	1437,220	863	1,665		
Ukupno	2219,387	874			

Parna poređenja intenziteta zaraze (nekroza) površinskog tkiva stabla ili osetljivosti genotipova sirka prema *F. equiseti* u 2010. godini pokazala su da između hibrida 'Gold' i 'Alba' ne postoji statistički značajna razlika, kao i između dve sorte sirka metlaša 'Prima' i 'Reform' (tabela 17). Međutim, razlike između ove dve homogene grupe statistički su vrlo značajne.

Tabela 17. Razvrstavanje genotipova sirka u homogene grupe na osnovu intenziteta zaraze (nekroze) površinskog tkiva stabla u uslovima veštačke inokulacije izolatom 286–09 (*Fusarium equiseti*) (Bački Petrovac, 2010)

Genotip sirka	Homogene grupe*	
	1	2
'Gold'	0,65	
'Alba'	0,85	
'Reform'		1,90
'Prima'		2,08
P vrednost	0,328	0,379

*Homogene grupe utvrđene na osnovu Duncan testa

Na osnovu Duncanovog testa za prosečne ocene intenziteta zaraze površinskog tkiva stabla, u uslovima veštačke inokulacije izolatima *F. proliferatum* u 2010. godini, utvrđene su tri homogene grupe genotipova sirka. Prvu grupu čini hibrid 'Alba', drugu hibrid 'Gold' i treću sorte 'Prima' i 'Reform' (tabela 18). Sorte treće homogene grupe nisu se međusobno statistički značajno razlikovale po intenzitetu zaraze površinskog tkiva stabla. Međutim, od ove homogene grupe statistički su se značajno razlikovali hibridi 'Alba' i 'Gold', koji su ispoljili manju osetljivost prema *F. proliferatum*.

Parna poređenja izolata u 2010. godini ukazuju da su razlike u odnosu na kontrolu, statistički veoma značajne, odnosno da su izolati 286–09 i 297a–09 prouzrokovali veće promene na površini stabla hibrida 'Gold' i sorti 'Prima' i 'Reform' u poređenju sa kontrolom (tabela 18). Međutim, *F. equiseti* i *F. proliferatum* prouzrokovale su istu promenu na uzdužnom preseku stabla hibrida 'Alba' u poređenju sa kontrolom, zapravo nije postojala statistička razlika, što je posledica osetljivosti na mehanička oštećenja.

Tabela 18. Razvrstavanje genotipova sirka u homogene grupe na osnovu intenziteta zaraze (nekroze) površinskog tkiva stabla u uslovima veštačke inokulacije izolatom 297a–09 (*Fusarium proliferatum*) (Bački Petrovac, 2010)

Genotip sirka	Homogene grupe*		
	1	2	3
'Alba'	1,53		
'Gold'		2,13	
'Prima'			3,12
'Reform'			3,45
P vrednost	1,000	1,000	0,196

*Homogene grupe utvrđene na osnovu Duncan testa

Parna poređenja reakcije stabla genotipova ('Alba', 'Gold', 'Prima' i 'Reform') u kontroli pokazala su da je u 2010. godini hibrid 'Gold' ispoljio najmanju osetljivost u odnosu na druge genotipove (tabela 19). Nekroza slabog intenziteta utvrđena je kod hibrida 'Alba' i sorti 'Prima' i 'Reform', koji su predstavljali homogenu grupu sa statistički značajnim razlikama od hibrida 'Gold'.

Tabela 19. Razvrstavanje genotipova sirka u homogene grupe na osnovu reakcije na mehaničke povrede sterilisanom čačalicom u kontroli (Bački Petrovac, 2010)

Genotip sirka	Homogene grupe*	
	1	2
'Gold'	0,43	
'Alba'		0,83
'Prima'		0,89
'Reform'		1,17
P vrednost	1,000	0,056

*Homogene grupe utvrđene na osnovu Duncan testa

Rezultati ispitivanja osetljivosti sirka u uslovima veštačke inokulacije stabla u 2011. godini ukazuju na značajne razlike između različitih genotipova i izolata *Fusarium* spp. (tabela 20). Na osnovu ocene intenziteta površinske zaraze stabla oko mesta inokulacije većina ispitivanih genotipova ispoljilo je veću osetljivost prema izolatu *F. proliferatum*, a manju prema *F. equiseti*. Pojedinačno, najveću osetljivost ispoljila je sorta 'Reform' (3,63) prema izolatu 297a–09 (*F. proliferatum*), a najmanju američka linija PI576382 03 SD prema izolatu 286–09 (*F. equiseti*). Prosečni rezultati za oba patogena ukazuju da su hibridi sirka za zrno 'Alba' i 'Gold' ispoljili isti nivo otpornosti (prosečna ocena 1,15), dok su te vrednosti bile 1,42 za sortu 'Prima' i 2,49 za sortu 'Reform'. U proseku, nizak intenzitet površinske zaraze stabla utvrđen je kod

američkih linija PI576382 03 SD (0,84), PI656114 01 SD (0,91), PI534163 02 SD (0,97) i PI595720 02 SD (1,02). U zavisnosti od izolata, prosečno niži nivo intenziteta zaraze prouzrokovao je izolat 286–09 *F. equiseti* (0,97) u poređenju sa izolatom 297a–09 *F. proliferatum* (1,53).

Tabela 20. Prosečne ocene intenziteta zaraze površinskog tkiva stabla sirka u uslovima vetačke inokulacije izolatima 286–09 (*Fusarium equiseti*) i 297a–09 (*Fusarium proliferatum*) (Bački Petrovac, 2011)

Genotip sirka	<i>Fusarium spp.</i>		Prosek	Kontrola
	<i>F. equiseti</i> (izolat 286–09)	<i>F. proliferatum</i> (izolat 297a–09)		
'Alba'	0,83*	1,48	1,15	0,00
'Gold'	1,03	1,27	1,15	0,00
'Prima'	1,04	1,81	1,42	0,00
'Reform'	1,35	3,63	2,49	0,00
PI656114 01 SD	0,95	0,88	0,91	0,00
PI534163 02 SD	0,88	1,07	0,97	0,00
PI595720 02 SD	0,93	1,11	1,02	0,00
PI576382 03 SD	0,72	0,96	0,84	0,00
Prosek	0,97	1,53	1,24	0,00

*Skala ocene intenziteta zaraze od 0 do 5 (Hooker, 1957)

U drugoj godini istraživanja (2011) nije bilo vidljivih reakcija genotipova sirka na mehanička oštećenja od veštačke inokulacije stabla. *F. proliferatum* prouzrokovala je intenzivan razvoj nekroze na površini stabla sorti 'Prima' i 'Reform', a nešto slabiju na hibridima 'Alba' i 'Gold'. Spoljni izgled reakcije površine stabla američkih linija (PI656114 01 SD, PI534163 02 SD, PI595720 02 SD i PI576382 03 SD) ukazivao je na veoma slab razvoj nekroze, koja je bila vidljiva tek na uzdužnom preseku. *F. equiseti* prouzrokovala je slabiju nekrozu na površini stabla hibrida sirka za zrno ('Alba' i 'Gold') i sorti sirka metlaša ('Prima' i 'Reform'). Vidljivi simptomi na površini stabla američkih linija nisu bili prisutni ili je nekroza zahvatila površinu manju od 1 cm od mesta inokulacije izolatom *F. equiseti*.

Na osnovu dvofaktorijske analize varijanse (ANOVA) za intenzitet zaraze površinskog tkiva stabla u 2011. godini utvrđene su statistički vrlo značajne razlike ($P < 0,001$) između genotipova, izolata *Fusarium spp.* i interakcije izolat x genotip (tabela 21).

Tabela 21. Rezultati dvofaktorijalne analize varijanse za intenzitet zaraze površinskog tkiva stabla različitih genotipova sirka u uslovima veštačke inokulacije izolatima *Fusarium* spp. (Bački Petrovac, 2011)

Izvor varijacije	Suma kvadrata	Stepeni slobode	Varijanse	F količnik	P vrednost
Izolat	195,849	2	97,924	502,839	<0,001
Genotip	298,690	7	42,670	219,109	<0,001
Izolat x Genotip	146,213	7	20,888	107,257	<0,001
Greška	244,987	1258	0,195		
Ukupno	893,384	1274			

Na osnovu parnog poređenja osetljivosti sirka, ocenjene na osnovu intenziteta površinske zaraze stabla u uslovima veštačke inokulacije izolatom *F. equiseti* u 2011. godini, izdvojene su četiri homogene grupe (tabela 22). Statistički značajne razlike nisu ustanovljene između četiri američke linije (PI656114 01 SD, PI534163 02 SD, PI595720 02 SD, PI576382 03 SD) i genotipa sirka za zrno ('Alba'), kao i između PI595720 02 SD, PI656114 01 SD, 'Gold' i 'Prime'. Međutim, od ovih grupa statistički se značajno razlikovala sorta sirka metlaša 'Reform'.

Tabela 22. Razvrstavanje genotipova sirka u homogene grupe na osnovu intenziteta zaraze (nekroze) površinskog tkiva stabla u uslovima veštačke inokulacije izolatom 286–09 (*Fusarium equiseti*) (Bački Petrovac, 2011)

Genotip sirka	Homogene grupe*			
	1	2	3	4
PI576382 03 SD	0,72			
'Alba'	0,83	0,83		
PI534163 02 SD		0,88		
PI595720 02 SD		0,93	0,93	
PI656114 01 SD		0,95	0,95	
'Gold'			1,03	
'Prima'			1,04	
'Reform'				1,35
P vrednost	0,105	0,097	0,141	1,000

*Homogene grupe utvrđene na osnovu Duncan testa

U 2011. godini izdvojeno je šest homogenih grupa na osnovu parnog poređenja osetljivosti osam genotipova sirka prema *F. proliferatum* (tabela 23). Grupa genotipova PI656114 01 SD i PI576382 03 SD bila je homogena u pogledu najnižih intenziteta površinske zaraze (nekroze) stabla, koji se statistički značajno nisu međusobno razlikovali. Nešto viši intenzitet zaraze ispoljili su genotipovi druge homogene grupe

(američke linije PI534163 02 SD i PI595720 02 SD), koja se statistički nije značajno razlikovala od treće homogene grupe ('Gold'). Od ovih homogenih grupa statistički su se značajno razlikovali genotipovi 'Alba' (četvrta homogena grupa) i 'Prima' (peta homogena grupa), koji su ispoljili jaču nekrozu na površini stable. Najveću osetljivost prema *F. proliferatum* ispoljio je genotip šeste homogene grupe (sorta sirka metlaša, 'Reform').

Tabela 23. Razvrstavanje genotipova sirka u homogene grupe na osnovu intenziteta zaraze (nekroze) površinskog tkiva stabla u uslovima veštačke inokulacije izolatom 297a-09 (*Fusarium proliferatum*) (Bački Petrovac, 2011)

Genotip sirka	Homogene grupe*					
	1	2	3	4	5	6
PI656114 01 SD	0,88					
PI576382 03 SD	0,96	0,96				
PI534163 02 SD		1,07				
PI595720 02 SD		1,11	1,11			
'Gold'			1,27			
'Alba'				1,48		
'Prima'					1,81	
'Reform'						3,63
P vrednost	0,329	0,091	0,051	1,000	1,000	1,000

*Homogene grupe utvrđene na osnovu Duncan testa

(b) Osetljivost sirka ocenjena na osnovu intenziteta zaraze na uzdužnom preseku od mesta inokulacije. Primenom druge metode ocenjivanja, intenziteta zaraze na uzdužnom preseku inokulisanih biljaka, utvrđene su, takođe, različite reakcije genotipova prema *Fusarium* spp. u 2010. godini (tabela 24). Genotip 'Alba' ispoljio je najmanju osetljivost prema izolatima *F. equiseti* i *F. proliferatum*, jer su ocene intenziteta zaraze (0,47 i 0,43) bile na nivou kontrole (0,44). Najveću osetljivost ispoljile su sorte 'Prima', prema obe vrste (ocene 2,45 i 3,07), i 'Reform' (ocena 3,13) prema *F. proliferatum*. U kontroli je intenzitet zaraze uzdužnog preseka stabla sorte 'Reform' (ocena 1,77) bio veći u poređenju sa rezultatima inokulacije stabla izolatom *F. equiseti*. Na osnovu ukupnih prosečnih ocena uočljiva je mala razlika između izolata *F. equiseti* (1,28) i *F. proliferatum* (1,87).

Tabela 24. Prosečne ocene intenziteta zaraze tkiva na uzdužnom preseku stabla sirka u uslovima vetačke inokulacije izolatima 286–09 (*Fusarium equiseti*) i 297a–09 (*Fusarium proliferatum*) (Bački Petrovac, 2010)

Genotip sirka	<i>Fusarium spp.</i>		Prosek	Kontrola
	<i>F. equiseti</i> (izolat 286–09)	<i>F. proliferatum</i> (izolat 297a–09)		
'Alba'	0,47*	0,43	0,44	0,44
'Gold'	0,55	0,85	0,11	0,11
'Prima'	2,45	3,07	2,76	1,48
'Reform'	1,66	3,13	2,40	1,77
Prosek	1,28	1,87	1,58	0,95

*Skala ocene intenziteta zaraze od 0 do 5 (Hooker, 1957)

Dobijena P vrednost (<0,001), primenom dvofaktorijalne analize varijanse (ANOVA) za intezitet zaraze tkiva na uzdužnom preseku stabla različitih genotipova sirka u uslovima veštačke inokulacije (*Fusarium spp.*) u 2010. godine, ukazuje na statistički vrlo značajne razlike između genotipova, ispitivanih izolata i interakcije izolat x genotip (tabela 25).

Tabela 25. Rezultati dvofaktorijalne analize varijanse za intezitet zaraze tkiva na uzdužnom preseku stabla sirka u uslovima veštačke inokulacije izolatima *Fusarium spp.* (Bački Petrovac, 2010)

Izvor varijacije	Suma kvadrata	Stepeni slobode	Varijanse	F količnik	P vrednost
Izolat	111,810	2	55,905	30,795	<0,001
Genotip	662,703	3	220,901	121,684	<0,001
Izolat x Genotip	87,080	6	14,513	7,995	<0,001
Greška	1566,660	863	1,815		
Ukupno	2453,207	874			

Parna poređenja reakcije genotipova na inokulaciju izolatom *F. equiseti* u vidu nekroze na uzdužnom preseku stabla pokazala su da u 2010. godini nije postojala statistički značajna razlika između hibrida sirka za zrno 'Alba' i 'Gold'. Međutim, ova homogena grupa statistički se značajno razlikovala od druge (sorta 'Prima') i treće homogene grupe (sorta 'Reform'), koje su ispoljile veću osetljivost prema *F. equiseti* (tabela 26).

Tabela 26. Razvrstavanje genotipova sirka u homogene grupe na osnovu intenziteta zaraze (nekroze) na uzdužnom preseku stabla u uslovima veštačke inokulacije izolatom 286–09 (*Fusarium equiseti*) (Bački Petrovac, 2010)

Genotip sirka	Homogene grupe*		
	1	2	3
'Alba'	0,47		
'Gold'	0,55		
'Reform'		1,66	
'Prima'			2,45
P vrednost	0,731	1,000	1,000

*Homogene grupe utvrđene na osnovu Duncan testa

Rezultati Duncan testa za intenzitet zaraze na uzdužnom preseku stabla od mesta inokulacije izolatom *F. proliferatum* u 2010. godini pokazuju da postoje dve homogene grupe (tabela 27). Najveću osetljivost ispoljile su dve sorte sirka metlaša ('Prima' i 'Reform') u drugoj homogenoj grupi koje se nisu međusobno statistički značajno razlikovale (ocene 3,07 i 3,13). Genotipovi prve homogene grupe ('Alba' i 'Gold') ispoljili su znatno manju osetljivost (ocene 0,43 i 0,85) prema *F. proliferatum* u poređenju sa genotipovima druge grupe.

Tabela 27. Razvrstavanje genotipova sirka u homogene grupe na osnovu intenziteta zaraze (nekroze) na uzdužnom preseku stabla u uslovima veštačke inokulacije izolatom 297a–09 (*Fusarium proliferatum*) (Bački Petrovac, 2010)

Genotip	Homogene grupe*	
	1	2
'Alba'	0,43	
'Gold'	0,85	
'Prima'		3,07
'Reform'		3,13
P vrednost	0,070	0,776

*Homogene grupe utvrđene na osnovu Duncan testa

Parna poređenja reakcije kontrolnih biljaka sva četiri genotipa ('Alba', 'Gold', 'Prima' i 'Reform') pokazala su da su genotipovi podeljeni u dve homogene grupe (tabela 28). Prvu grupu sačinjavali su hibridi 'Alba' i 'Gold' koji se nisu međusobno statistički značajno razlikovali, a ispoljili su manju osetljivost na mehanička oštećenja stabla. Nekrozu slabog intenziteta ispoljile su sorte 'Prima' i 'Reform' koje su predstavljale homogenu grupu koja se statistički značajno razlikovala od prve grupe genotipa 'Alba' i 'Gold'.

Tabela 28. Razvrstavanje genotipova sirka u homogene grupe na osnovu reakcije na mehaničke povrede sterilisanom čačalicom u kontroli (Bački Petrovac, 2010)

Genotip	Homogene grupe*	
	1	2
'Alba'	0,41	
'Gold'	0,44	
'Prima'		1,48
'Reform'		1,77
P vrednost	0,897	0,154

*Homogene grupe utvrđene na osnovu Duncan testa

Ocene intenziteta zaraze tkiva na uzdužnom preseku stabla sirka u 2011. godini ukazuju na varijabilnost osetljivosti sirka prema *F. equiseti* i *F. proliferatum* (tabela 29). Hibridi sirka ispoljili su veću osetljivost prema *F. proliferatum* (ocena 3,54–4,77) i *F. equiseti* (ocena 1,76–4,25) u poređenju sa američkim linijama (ocene 1,09–2,24; 1,28–1,69). U proseku, najveću osetljivost prema *Fusarium* spp. ispoljila je sorta 'Reform' (ocena 4,51), a najmanju američka linija PI656114 01 SD (ocena 1,25). Ispitivani genotipovi nisu ispoljili reakciju tkiva na uzdužnom preseku na mehaničko oštećenje stabla u kontroli.

Tabela 29. Prosečne ocene intenziteta zaraze tkiva na uzdužnom preseku stabla sirka u uslovima vetačke inokulacije izolatima 286–09 (*Fusarium equiseti*) i 297a–09 (*Fusarium proliferatum*) (Bački Petrovac, 2011)

Genotip sirka	<i>Fusarium</i> spp.		Prosek	Kontrola
	<i>F. equiseti</i> (izolat 286–09)	<i>F. proliferatum</i> (izolat 297a–09)		
'Alba'	1,76	2,52	2,14	0,00
'Gold'	2,00	2,37	2,18	0,00
'Prima'	3,96	4,43	4,19	0,00
'Reform'	4,25	4,77	4,51	0,00
PI656114 01 SD	1,41	1,09	1,25	0,00
PI534163 02 SD	1,60	1,44	1,52	0,00
PI595720 02 SD	1,69	2,24	1,96	0,00
PI576382 03 SD	1,28	2,03	1,65	0,00
Prosek	2,24	2,61	2,42	0,00

*Skala ocene intenziteta zaraze od 0 do 5 (Hooker, 1957)

Dvofaktorijska analiza varijanse (ANOVA) za intenzitet zaraze tkiva na uzdužnom preseku stabla sirka u uslovima veštačke inokulacije izolatima *Fusarium* spp. u 2011. godini ukazuje na statistički vrlo značajne razlike ($P < 0,001$), između genotipova i ispitivanih izolata i interakcije izolat x genotip (tabela 30).

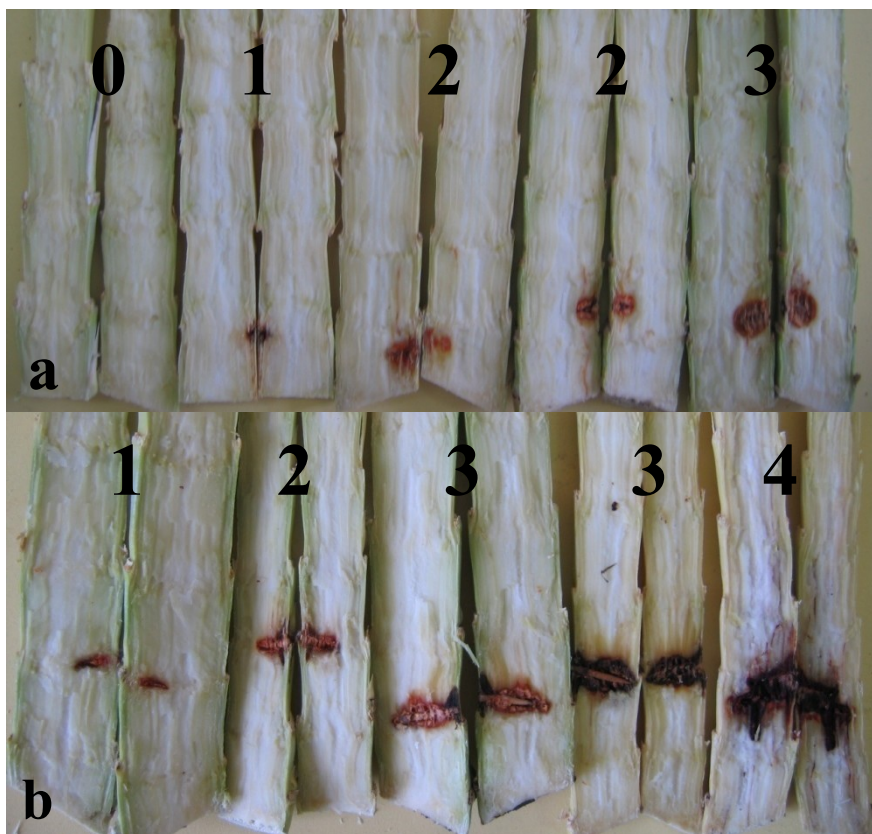
Tabela 30. Rezultati dvofaktorijske analize varijanse za intenzitet zaraze tkiva na uzdužnom preseku stabla sirka u uslovima veštačke inokulacije izolatima *Fusarium* spp. (Bački Petrovac, 2011)

Izvor varijacije	Suma kvadrata	Stepeni slobode	Varijanse	F količnik	P vrednost
Izolat	919,536	2	459,768	634,049	<0,001
Genotip	1593,517	7	227,645	313,937	<0,001
Izolat x Genotip	41,773	7	5,965	8,230	<0,001
Greška	912,213	1258	0,725		
Ukupno	3004,082	1274			

Parna poređenja izolata ukazuju da su ispoljene razlike u odnosu na kontrolu, statistički veoma značajne, odnosno da su izolati 286–09 i 297a–09 izazvali veće promene na uzdužnom preseku stabla sirka različitih genotipova u poređenju sa kontrolom. *F. proliferatum* prouzrokovala je intenzivniji razvoj nekroze na uzdužnom preseku stabla hibrida sirka za zrno ('Alba' i 'Gold') i sorte sirka metlaša ('Prima' i 'Reform') (slika 37), a nešto slabiji na američkim linijama PI656114 01 SD i PI534163 02 SD (slika 38a, b), u poređenju sa *F. equiseti*.



Slika 37. *Fusarium proliferatum*: Uzdužni presek stabla sorte 'Prima' i rastuće ocene reakcije od 1 do 5



Slika 38. Uzdužni presek stabla linije PI656114 01 SD i reakcija na inokulacije sa *Fusarium proliferatum* (a) i *Fusarium equiseti* (b)

Parnim poređenjem osetljivosti genotipova na osnovu intenziteta zaraze sirka na uzdužnom preseku stabla u uslovima veštačke inokulacije izolatom *Fusarium equiseti* u 2011. godini izdvojeno je pet homogenih grupa (tabela 31). Međutim, od ovih grupa statistički su se značajno razlikovale sorte 'Prima' i 'Reform', koje su ispoljile najveću osetljivost prema *F. equiseti*, odnosno jači intenzitet razvoja nekroze na uzdužnom preseku stabla. Između svih američkih linija i genotipa sirka za zrna, hibrida 'Alba' i 'Gold' nisu ustanovljene statistički značajne razlike.

Tabela 31. Razvrstavanje genotipova sirka u homogene grupe na osnovu intenziteta zaraze (nekroze) na uzdužnom preseku stabla u uslovima veštačke inokulacije izolatom 286–09 (*Fusarium equiseti*) (Bački Petrovac, 2011)

Genotip sirka	Homogene grupe*				
	1	2	3	4	5
PI576382 03 SD	1,28				
PI656114 01 SD	1,41	1,41			
PI534163 02 SD		1,60	1,60		
PI595720 02 SD		1,69	1,69	1,69	
'Gold'			1,76	1,76	
'Alba'				2,00	
'Prima'					3,96
'Reform'					4,25
P vrednost	0,376	0,078	0,319	0,053	0,052

*Homogene grupe utvrđene na osnovu Duncan testa

Na osnovu parnog poređenja osetljivosti genotipova sirka u uslovima veštačke inokulacije stabla izolatom *F. proliferatum* u 2011. godini, genotipovi su razvrstani u šest homogenih grupa (tabela 32). Između dve američke linije (PI576382 03 SD i PI595720 02 SD) i dva genotipa sirka za zrno ('Alba' i 'Gold') nisu ustanovljene statistički značajne razlike. Međutim, od ovih grupa statistički su se značajno razlikovale sorte 'Prima' i 'Reform' koje su ispoljile najveću osetljivost, kao i dve američke linije PI656114 01 SD i PI534163 02 SD koje su ispoljile najnižu osetljivost prema *F. proliferatum*.

Tabela 32. Razvrstavanje genotipova sirka u homogene grupe na osnovu intenziteta zaraze (nekroze) na uzdužnom preseku stabla u uslovima veštačke inokulacije izolatom 297a–09 (*Fusarium proliferatum*) (Bački Petrovac, 2011)

Genotip sirka	Homogene grupe*					
	1	2	3	4	5	6
PI656114 01 SD	1,09					
PI534163 02 SD		1,44				
PI576382 03 SD			2,03			
PI595720 02 SD			2,24	2,24		
'Gold'				2,37		
'Alba'				2,52		
'Prima'					4,43	
'Reform'						4,77
P vrednost	1,000	1,000	0,117	0,051	1,000	1,000

*Homogene grupe utvrđene na osnovu Duncan testa

Osetljivost stabla sirka u uslovima prirodne zaraze. Na oglednoj parceli u Čantaviru tokom 2010. i 2011. godine, u uslovima prirodne zaraze sirka ispitivana je osetljivost dva genotipa sirka za zrno (hibridi 'Alba' i 'Gold') i dva genotipa sirka metlaša (sorte 'Prima' i 'Reform'). Simptomi zaraze ispoljeni su prvenstveno na prizemnom delu stabla, na prvom i drugom nodusu, u vidu mrkih pega, koje su se dalje širile na internodije. Na uzdužnom preseku stabla na donjim internodijama uočena je promena boje tkiva od smeđe do bordo crvene, dok je srž bila razorena. Na uzdužnom preseku stabla donjih nodusa vidljiva je bila ružičasta ili beličasta micelijska prevlaka. Tipični simptomi za fuzariozna oboljenja pojavili su se i na korenu, na glavnim i bočnim žilama u vidu tamno ružičaste boje, a pri jačem napadu koren je bio potpuno razoren.

U prvoj godini (2010) ispitivanja ocenjujući reakciju na osnovu vidljive nekroze na površini stabla, hibridi sirka za zrno 'Alba' i 'Gold' reagovali su na prirodnu zarazu prosečnim ocenama 0,11 odnosno 1,07 a sorte sirka metlaša 'Prima' i 'Reform' ocenama 3,58 odnosno 3,77. U drugoj godini (2011) ispitivanja ista metoda ocenjivanja takođe je ukazala na različite reakcije genotipova sa ukupnim prosečnim ocenama 'Alba' (2,92), 'Gold' (3,92), 'Prima' (4,05) i 'Reform' (3,97), (tabela 33). Prema oceni intenziteta zaraze površine stabla, najosetljivije su bile sorte sirka metlaša ('Prima' i 'Reform'), pri čemu su simptomi u drugoj godini proizvodnje bili znatno izraženiji, što se ogledalo u lomljenju i masovnom poleganju biljaka (slika 39). Znatno manju osetljivost ispoljila su dva hibrida sirka za zrno ('Alba' i 'Gold').

Tabela 33. Prosečne vrednosti ocene intenziteta zaraze na površini stabla četiri različita genotipa sirka u uslovima prirodne zaraze tokom 2010. i 2011. godine

Godina	Genotip sirka			
	'Alba'	'Gold'	'Prima'	'Reform'
2010	0,11	1,07	3,58	3,77
2011	2,92	3,92	4,05	3,97

*Skala ocene intenziteta zaraze od 0 do 5 (Hooker, 1957)



Slika 39. Čantavir: Poleganje biljaka sorte sirka metlaša 'Reform'

Dvofaktorijalna analiza varijanse (ANOVA) za intenzitet razvoja nekroze na površini stabla sirka u uslovima prirodne zaraze u 2010. i 2011. godini ukazala je na statistički vrlo značajne razlike ($P < 0,001$) između godina, genotipova i interakcije godina x genotip (tabela 34).

Tabela 34. Rezultati dvofaktorijalne analize varijanse za intenzitet razvoja nekroze na površini stabla sirka u uslovima prirodne zaraze (Čantavir, 2010–2011)

Izvor varijacije	Suma kvadrata	Stepeni slobode	Varijanse	F količnik	P vrednost
Godina	303,02	1	303,02	80,69	<0,001
Genotip	473,32	3	157,77	42,01	<0,001
Godina x Genotip	189,81	3	63,27	16,85	<0,001
Greška	1791,25	477	3,76		
Ukupno	2782,425	484			

Na osnovu intenziteta razvoja nekroze na površini stabla u prirodnim uslovima zaraze u 2010. godini, ispitivani genotipovi sirka su razvrstani u tri homogene grupe (tabela 35). Prvu grupu čini hibrid 'Alba', drugu hibrid 'Gold', a treću sorte 'Prima' i 'Reform'. Sorte sirka metlaša ('Prima' i 'Reform') ispoljile su najveću osetljivost stabla i međusobno nije bilo statistički značajnih razlika. Za razliku od ove homogene grupe, hibridi 'Alba' i 'Gold' ispoljili su znatno manji intenzitet razvoja nekroze na površini stabla sirka i njihove međusobne razlike statistički su značajne.

Tabela 35. Razvrstavanje genotipova sirka u homogene grupe na osnovu intenziteta razvoja nekroze na površini stabla sirka u uslovima prirodne zaraze (Čantavir, 2010)

Genotip sirka	Homogene grupe*		
	1	2	3
'Alba'	0,11		
'Gold'		1,07	
'Prima'			3,58
'Reform'			3,77
P vrednost	1,000	1,000	0,564

*Homogene grupe utvrđene na osnovu Duncan testa

Na osnovu intenziteta razvoja nekroze na površini stabla sirka u uslovima prirodne zaraze u 2011. godini ispitivani genotipovi su svrstani u dve homogene grupe (tabela 36). Prvu grupu čini hibrid 'Alba', a drugu hibrid 'Gold' i sorte 'Prima' i 'Reform'. Druga grupa delovala je homogeno, ispoljavajući jaku nekrozu na površini stabla, i genotipovi se nisu međusobom statistički značajno razlikovali. Međutim, od ove grupe statistički se značajno razlikovao genotip 'Alba', koji je ispoljio znatno niži nivo nekroze na površini stabla.

Tabela 36. Razvrstavanje genotipova sirka u homogene grupe na osnovu intenziteta razvoja nekroze na površini stabla sirka u uslovima prirodne zaraze (Čantavir, 2011)

Genotip sirka	Homogene grupe*	
	1	2
'Alba'	2,92	
'Gold'		3,92
'Prima'		3,97
'Reform'		4,05
P vrednost	1,000	0,747

*Homogene grupe utvrđene na osnovu Duncan testa

Različita osetljivost genotipova sirka utvrđena je u 2010. godini i na osnovu ocene intenziteta razvoja nekroze tkiva na uzdužnom preseku stabla u uslovima prirodne zaraze (tabela 37). Sorte sirka metlaša ('Prima' i 'Reform') ispoljile su veću osetljivost u odnosu na hibride sirka za zrno ('Alba' i 'Gold'), što je utvrđeno na osnovu ocena 3,77 ('Reform'), 3,40 ('Prima'), 1,03 ('Gold') i 0,11 ('Alba'). Na uzdužnom preseku obolelog tkiva sorte 'Reform', uočena je dezorganizovana srž tamnomrke ili ružičaste boje, a pri jačem napadu nekroza je zahvatila veći broj nodusa, pa čak i celo stablo koje je izgubilo čvrstinu (slika 40). U drugoj godini (2011) proizvodnje sirka, prema oceni

zaraženosti uzdužnog preseka stabla simptomi su bili znatno izraženiji kod hibrida 'Alba' (prosečna ocena 2,98) i Gold (prosečna ocena 3,92), pri čemu je tkivo duž svih internodija bilo zahvaćeno nekrozom.

Tabela 37. Prosečne vrednosti ocene intenziteta zaraze na uzdužnom preseku stabla četiri različita genotipa sirka u uslovima prirodne zaraze tokom 2010. i 2011. godine

Godina	Genotip sirka			
	'Alba'	'Gold'	'Prima'	'Reform'
2010	0,11	1,03	3,40	3,77
2011	2,98	3,92	4,15	3,97

*Skala ocene intenziteta zaraze od 0 do 5 (Hooker, 1957)



Slika 40. Prirodna zaraza: Uzdužni presek stabla sorte 'Reform' sa simptomima razorene srži (levo); uzdužni presek stabla hibrida sirka za zrno 'Gold' sa simptomima ružičaste nekroze srži (desno)

Primenom dvofaktorijalne analize varijanse (ANOVA) za srednje vrednosti intenziteta razvoja nekroze na uzdužnom preseku stabla u obe godine ispitivanja, dobijena je P vrednost (<0,001) koja ukazuje na statistički vrlo značajne razlike, posmatrajući godine i genotipove, kao i interakciju godina x genotip (tabela 38).

Tabela 38. Rezultati dvofaktorijalne analize varijanse za intenzitet razvoja nekroze na uzdužnom preseku stabla u uslovima prirodne zaraze (Čantavir, 2010–2011)

Izvor varijacije	Suma kvadrata	Stepeni slobode	Varijanse	F količnik	P vrednost
Godina	340,855	1	340,855	92,883	<0,001
Genotip	454,644	3	151,548	41,297	<0,001
Godina x Genotip	179,691	3	59,897	16,322	<0,001
Greška	1750,463	477	3,670		
Ukupno	2750,763	484			

Na osnovu rezultata ocenjivanja intenziteta zaraze na uzdužnom preseku stabla u prirodnim uslovima u 2010. godini, ispitivani genotipovi sirka ('Alba', 'Gold', 'Prima' i 'Reform') razvrstani su u tri homogene grupe. Prvu grupu čini hibrid 'Alba', drugu hibrid 'Gold', a treću sorte 'Prima' i 'Reform' (tabela 39). Najveću osetljivost ispoljile su sorte sirka metlaša ('Prima' i 'Reform'), koje se nisu međusobno statistički značajno razlikovale, ali jesu od hibrida ('Alba' i 'Gold'). Druga grupa je ispoljila znatno manju osetljivost stabla u uslovima prirodne zaraze, a genotipovi su se međusobno statistički značajno razlikovali.

Tabela 39. Razvrstavanje genotipova sirka u homogene grupe na osnovu intenziteta razvoja nekroze na uzdužnom preseku stabla sirka u uslovima prirodne zaraze (Čantavir, 2010)

Genotip sirka	Homogene grupe*		
	1	2	3
'Alba'	0,11		
'Gold'		1,03	
'Prima'			3,40
'Reform'			3,77
P vrednost	1,000	1,000	0,246

*Homogene grupe utvrđene na osnovu Duncan testa

Ispitivani hibridi su razvrstani u manji broj homogenih grupa u 2011. nego u 2010. godini. U 2011. godini genotipovi su, na osnovu intenziteta zaraze na uzdužnom preseku stabla u uslovima prirodne zaraze, razvrstani u dve homogene grupe. Prvu grupu čini hibrid 'Alba', a drugu hibrid 'Gold' i sorte 'Prima' i 'Reform' (tabela 40). Druga grupa je bila homogena, ispoljavajući jaku nekrozu celog stabla na uzdužnom preseku, a između genotipova nije bilo statistički značajnih razlika. Međutim, od ove

grupe statistički se značajno razlikovao hibrid 'Alba', koji je ispoljio znatno niži nivo osetljivosti, a nekrotirano tkivo zahvatalo je u proseku 1/3 internodije.

Tabela 40. Razvrstavanje genotipova sirka u homogene grupe na osnovu intenziteta razvoja nekroze na uzdužnom preseku stabla sirka u uslovima prirodne zaraze (Čantavir, 2011)

Genotip sirka	Homogene grupe*	
	1	2
'Alba'	2,98	
'Gold'		3,92
'Prima'		3,97
'Reform'		4,15
P vrednost	1,000	0,566

*Homogene grupe utvrđene na osnovu Duncan testa

6. DISKUSIJA

Gajeni sirak je jedna od veoma značajnih gajenih biljaka iz porodice trava, sedmo najčešće gajeno žito (**Alves dos Reis et al.**, 2010). Svetska proizvodnja gajenog sirka pokazuje trend porasta i samo u 2009. godini približila se količini od 62 miliona tona (**USDA**, 2009). U Brazilu ukupan prinos gajenog sirka 2006–2007 bio je preko 1,5 milion tona, na skoro 750 000 ha obradivog zemljišta (**Conab**, 2009). Epidemije fuzariozne plesnivosti klasa (FHB) poslednje dve decenije imale su razarajući uticaj na svetsku poljoprivrednu ekonomiju (**Goswami and Kistler**, 2004). Sa ekonomske tačke gledišta, približno 25% svetskog prinosa zrna kontaminirano je mikotoksinima (**CAST**, 2003). U Severnoj Americi tokom 1990. godine gubici se procenjuju na preko 3 milijarde dolara (**Windels**, 2000), zbog značajnog smanjenja prinosa i kvaliteta žita, kao i pada cene zbog kontaminacije zrna mikotoksinima. Epidemije u Aziji, Kanadi, Evropi i Južnoj Americi ukazuju na sve veću opasnost od FHB koja ugrožava svetsku proizvodnju žita (**Chelkowski**, 1998; **Goswami and Kistler**, 2004; **Brennan et al.**, 2005). Pripadnici kompleksa *F. graminearum* primarni su etiološki prouzrokovajući FHB širom sveta (**O'Donnell et al.**, 2000b, 2004; **Starkey et al.**, 2007), i svaka vrsta unutar kompleksa sposobna je da produkuje trihotecene tipa B i estrogene jedinjenja (**Kim et al.**, 2005). Kao najznačajniji prouzrokovajući fuzarioza useva žita opisuju se različite vrste u pojedinim proizvodnim područjima, pa tako **Summerell and Leslie** (2011) navode da je u Australiji *F. thapsinum* najčešća vrsta na gajenom sirku.

6.1. Simptomi bolesti na biljkama u polju

Tokom višekratnih pregleda četiri lokaliteta gajenja sirka u Vojvodini, u periodu od 2009. do 2011. godine zabeležena je pojava velike učestalosti intenzivnih simptoma fuzariozne truleži korena i stabla. Intenzitet zaraze useva sirka, bio je veoma visok, a sušenje i lomljenje zaraženih biljaka rezultiralo je procenjenim gubicima od preko 90%. Brojni autori saopštavaju o direktnim štetama i ekonomskom značaju zaraza različitih useva sa *Fusarium* vrstama (**Aoki and O'Donnell**, 1999a; **Burlakoti et al.**, 2008; **Vogelsglang et al.**, 2009; **Alvarez et al.**, 2010). Zaražene biljke ispoljavale su simptome prvenstveno na prizemnom delu stabla u vidu mrkih pega, koje su se dalje širile na internodije, dok je korenov sistem u većoj meri bio razoren, kao što opisuju

brojni autori, među kojima su **Tesso et al.** (2010). Na uzdužnom preseku obolelog tkiva uočena je dezorganizovana srž tamnomrke ili ružičaste boje. Patogeni truleži stabla sirka utvrđeni su u različitim fenofazama domaćina, ali su simptomi bolesti bili uočljivi tek nakon metličanja i u toku potpune zrelosti zrna (**Mughogho and Pande**, 1984; **Tesso et al.**, 2010). Tokom ustraživanja, **Alvarez et al.** (2010) su u prikupljenim uzorcima sirka različite fenološke zrelosti, poreklom iz Brazila dokazali prisustvo vrsta iz najmanje osam rodova gljiva, uključujući *Fusarium*, *Epicoccum*, *Alternaria*, *Aspergillus* i *Penicillium*. Unutar roda *Fusarium*, ustanovili su prisustvo vrsta sekcije *Liseola*, mada bez *F. thapsinum*, slično kao i u ovom radu. Slične rezultate dobili su **da Silva et al.** (2000), uporedo analizirajući sveže požnjeveno i uskladišteno seme sirka. Detekcija *F. thapsinum* tek u trećoj godini istraživanja ukazuje da njeno prisustvo i rasprostranjenost u uslovima Srbije zaslužuje nastavak istraživanja i posebne detaljnije analize.

Prisustvo različitih patogenih gljiva na semenu sirka, koje je poslednjih godina sve češće utvrđeno, može biti značajno sa stanovišta smanjenja prinosa i kvaliteta zrna u pogledu kontaminacije štetnim mikotoksinima, a takođe može dovesti i do indirektnih gubitaka smanjujući klijanje semena (**Dawson and Bateman**, 2001; **Singh and Navi**, 2001; **Erpelding and Prom**, 2006). Tokom pregleda oglednih parcela sirka na zaraženim metlicama i zrnu gajenog sirka uočena je nekroza tkiva prekrivena micelijском prevlakom tamnožute do narandžaste ili crvenkaste boje. Zaražena zrna su smežurana i prožeta micelijom i slabije klijavosti. U 16 pregledanih uzoraka semena, ustanovljene su mešane zaraze gljivama iz rodova *Fusarium*, *Alternaria* i *Epicoccum*, koji su bili prisutni u svim uzorcima. Zaraza semena sirka sa *Fusarium* spp. kretala se od 2,3 do 19,7%, u proseku 8,82%, što je u skladu sa rezultatima **Lević i sar.** (2008). Za razliku od dobijenih rezultata, **Lević i sar.** (2008) su identifikovali prisustvo *F. thapsinum* (11,3%) na semenu gajenog sirka u Srbiji. Razlika u dobijenim rezultatima u pogledu prisustva *F. thapsinum* može biti posledica različitih faktora, kao što su razlike u genotipu sirka, području obuhvaćenom ispitivanjima, ali i moguće promene u strukturi populacije *Fusarium* spp. na gajenom sirku u Srbiji.

6.2. Test patogenosti

Izolacijom iz zaraženih biljaka gajenog sirka u polju i iz zaraženog semena dobijeno je ukupno 48 izolata, a za dalji rad odabrano je 13 izolata *Fusarium* spp. koji su svrstani u pet morfoloških grupa.

Infektivnost 13 odabranih monosporijalnih izolata *Fusarium* spp. proverena je primenom dve metode, koje su se pokazale podjednako uspešne. Ipak, inokulacije u *in vitro* uslovima mogu se preporučiti kao brže i jednostavnije, pri čemu pružaju podjednako pouzdane rezultate. Svih 13 ispitivanih izolata uticali su na smanjenje rasta i mase korena, kao i na pojavu jakih simptoma truleži korena klijanaca kod osetljivih genotipova sirka metlaša, sorte 'Prima' i 'Reform'. Suprotno tome, na klijanacima otpornih genotipova sirka za zrno nije bilo vidljivih simptoma bolesti. Prve promene tkiva na stablu sirka, u vidu crvenkastosmeđih sitnih pega u osnovi stabla koje je veštački inokulisano suspenzijom konidija patogena, uočene su već 3–5 dana od inokulacije, što je ukazalo na značajnu agresivnost ovih izolata. Nakon dve nedelje izolati *F. equiseti*, *F. proliferatum*, *F. graminearum* i *F. thapsinum* prouzrokovali su potpuno sušenje i propadanje inokulisanih klijanaca sorte 'Prima' i 'Reform', dok su izolati *E. nigrum* takođe prouzrokovali potpuno sušenje klijanaca sorte 'Reform', a slabiju nekrozu na klijanacima sorte 'Prima'. **Tesso et al.** (2010) su u svojim istraživanjima dokazali različitu infektivnost osam *Fusarium* vrsta (*F. verticillioides*, *F. thapsinum*, *F. andiyazi*, *F. proliferatum*, *F. nyagamai*, *F. pseudoanthophilum*, *F. brevicatenuatum* i *F. pseudonygamai*) i osetljivost različitih genotipova sirka u uslovima zaštićenog prostora.

Test provere patogenosti na klijanacima sirka u uslovima *in vitro*, u epruветama sa Knopovom podlogom, takođe je obavljen uspešno, pri čemu su svi izolati prouzrokovali pojavu nekroze nakon pet dana i zahvatali čitave klijance nakon 10 dana. U ovom testu ispitivani izolati prouzrokovali su pojavu simptoma i na otpornijim genotipovima za zrno ukazujući na to da ovaj test može da pruži rezultate patogenosti bez obzira na sortu koja se odabere za ispitivanja. Na ovaj način verovatno se može pokazati podeljenost i slabije agresivnih vrsta i izolata. **Leslie et al.** (2005) su utvrdili da *F. thapsinum*, prouzrokovatelj truleži stabla i plesnivosti zrna sirka ispoljava izraženu patogenost za klijance sirka u *in vitro* uslovima.

Rezultati testa patogenosti klijanaca sirka u potpunosti su se podudarili sa rezultatima dobijenim u uslovima veštačke inokulacije, kako u stakleniku tako i u laboratoriji, u *in vitro* uslovima. Relativnim poređenjem reakcije genotipova sirka vidi se da su u oba uslova postavljenog eksperimenta genotipovi sirka metlaša bili značajno osetljiviji u poređenju sa hibridima sirka za zrno. Obe metode za inokulaciju korišćene u ovom radu imaju određene prednosti u poređenju sa poljskim ogledima, jer se do rezultata dolazi brže, koristi se uniformna i tačno određena količina inokuluma, što omogućava tačnije poređenje, ponovljivost oglada i otvara mogućnost da se metode koriste za preliminarno ocenjivanje osetljivosti genotipova sirka.

6.3. Morfološka svojstva anamorfa i teleomorfa

Proučavana morfološka svojstva izolata *Fusarium* spp. izolovanih sa gajenog sirka u Srbiji, pružila su stabilnu mogućnost za njihovo razlikovanje. Svi proučavani izolati, poreklom sa prizemnog dela stabla i semena gajenog sirka, svrstani u pet grupa ispoljili su različita morfološka svojstva. Kako vrste roda *Fusarium* variraju u morfološkim svojstvima, naročito po obliku i veličini makrokonidija, načinu obrazovanja mikrokonidija, obrazovanju hlamidospora ili boji kolonija, u istraživanja su uključene tri hranljive podloge u cilju proučavanja njihove promenljivosti.

Predstavnik morfološke grupe I, izolat 286–09 koji ispoljava ista svojstva kao referentni izolat *F. equiseti* (RBG851) imao je brz i ravnomeran porast, krem žutu, pamučastu vazдушnu miceliju, bež pigmentaciju podloge i tamnosmeđe mrlje u supstratnoj miceliji. **Stepień et al.** (2012) ispitali su brzinu porasta 25 izolata *F. equiseti* poreklom iz Poljske i Italije. Većina italijanskih izolata rasla je sporije, formirajući nakon četiri dana prečnik kolonija približno od 2,5 do 3 cm, u odnosu na poljsku grupu izolata, kod kojih je prečnik kolonija varirao od 4 do 5,5 cm. Po ovim svojstvima izolati *F. equiseti* razlikovali su se od svih drugih *Fusarium* spp. izolovanih tokom izrade ove disertacije. Izolat *F. equiseti* poreklom iz Srbije, ispoljio je brži porast od druge dve grupe ispitivanih izolata, što je u saglasnosti sa svojstvima referentnog izolata RBG851 determinisanog od strane **Summerell** (lična komunikacija). Isto tako, mikroskopska svojstva izolata *F. equiseti*, poreklom iz Srbije, kratke i u osnovi proširene konidiofore tipa monofijalida, formirane višecelijske makrokonidije odgovarajućeg oblika i veličine i loptaste, svetlosmeđe hlamidospore u nizovima, u potpunoj su saglasnosti sa

literaturnim navodima od strane **Leslie and Summerell** (2006) i **Chehri et al.** (2011), kao i svojstva referentnog izolata RBG851.

Svi izolati druge grupe (297a–09, 13–10, 521–10, 522–10 i 530–10) ispoljili su najveću morfološku sličnost sa referentnim izolatom RBG5349, identifikovanim kao *F. proliferatum*, **Summerell** (lična komunikacija). Ovi izolati su se po brzini porasta i morfološkim svojstvima razlikovali od svih drugih ispitivanih izolata u ovom radu. Tokom ispitivanja morfoloških svojstava izolata *F. proliferatum* iz drveta mangrove, poreklom iz Kine, **Cheng et al.** (2008) opisali su veoma slična morfološka svojstva, kako po izgledu kolonija i prisustva pigmenata, tako i po obliku i veličini mikrokonidija formiranih iz monofiljlida i polifijalida u vidu lažnih glavica ili dugih nizova. Prisustvo hlamidospora nije ustanovljeno ni kod jednog izolata, što je prema navodima literature karakteristično za vrstu *F. proliferatum* (**Lević**, 2008).

Kolonije reprezentativnih izolata morfološke grupe III, 532–10, 535–10 i 536–10 identifikovanih kao *F. graminearum* ispoljila su sva morfološka svojstva karakteristična za ovu vrstu, uključujući izgled micelije i prisustvo i odsustvo tvorevina za razmnožavanje. Obim i veličina formiranih makrokonidija i hlamidospora u potpunosti odgovaraju opisima **Aoki and O'Donnell**. (1999a), **Schmale et al.** (2005, 2006) i **Lević** (2008). Peritecije formirane na ostacima biljaka sirka, za koje je dokazano da pripadaju teleomorfu *F. graminearum*, vrsti *G. zaeae*, kao i askusi i askospore po izgledu i veličini slažu se sa navodima **Seifert** (1995) i **Aoki and O'Donnell** (1999a).

Izolat 808–11 iz četvrte morfološke grupe čija su svojstva u saglasnosti sa referentnim izolatom RBG5255 vrste *F. thapsinum*, **Summerell** (lična komunikacija), razlikovao se od ostalih grupa izolata po specifičnom tipu porasta na PDA podlozi i karakterističanom žuto–narandžastom pigmentu. Istražujući do tada malo poznate vrste *Fusarium* spp. na gajenom sirku, **Klittich et al.** (1997) su najpre izolate razlikovali na osnovu lučenja žutog pigmenta i relativno sporog porasta, a kasnije opisali kao posebnu vrstu, *F. thapsinum*. Izolat *F. thapsinum* iz Srbije formirao je mikro i makrokonidije odgovarajućeg oblika i veličine i nije formirao hlamidospore, što odgovara navodima **Leslie and Summerell** (2006). **Klittich et al.** (1997) navode da njihovi izolati formiraju mikro i makrokonidije nešto manjih prosečnih dimenzija što može biti posledica gajenja u nestandardizovanim laboratorijskim uslovima, ili varijabilnosti koja se može javiti u populacijama gljiva iz specifičnih područja.

Mada su na osnovu makroskopskih svojstava donekle podsećali na *Fusarium* spp. tri izolata morfološke grupe V, 291–09, 315–09 i 539–10, identifikovani su kao *E. nigrum*. Prosečni dnevni porast ispitivanih izolata, kao i izgled kolonija, u potpunosti odgovara navodima **Fávaro et al.** (2011) za Grupu 1 izolata *E. nigrum*. Kolonija sva tri ispitivana izolata je gusta i vunasta, okružena belom kompaktnom micelijom nepravilnih margina, vazдушna micelija je intenzivno žuta, narandžasta do tamno crvena. Mnogi izolati *Epicoccum* vrsta često su dovedeni u vezu sa vrstama *Fusarium* spp., ili čak identifikovani i kao Ustilaginales (**Navi et al.**, 1999). Sva morfološka makroskopska i mikroskopska svojstva, kao i prisustvo jednoćelijskih konidija formiranih na diskretnim sporodohijama, u potpunoj su saglasnosti sa identifikacijom *E. nigrum* od strane **Mims and Richardson** (2005) i **Pitt and Hocking** (2009).

6.4. Molekularna detekcija i identifikacija

Molekularne metode kao savremen pristup u identifikaciji biljnih patogena imaju veliku prednost u primeni za preciznu identifikaciju, karakterizaciju, utvrđivanje strukture populacije, određivanje puteva introdukcije i drugih brojnih aspekata filogeografije i molekularne epidemiologije različitih patogena. Zbog visoke osetljivosti i specifičnosti, ove metode predstavljaju značajno poboljšanje u dijagnostici oboljenja koje prouzrokuju fitopatogene gljive. PCR tehnika primenjena je u ovim istraživanjima u cilju molekularne detekcije kompleksa gljiva prouzrokovaca fuzariozne truleži korena, prizemnog dela stabla i semena gajenog sirka i potvrde identifikacije obavljene na osnovu njihovih morfoloških svojstava i testova patogenosti, kao i u cilju ispitivanja pogodnosti različitih parova prajmera za detekciju i identifikaciju izolata ekonomski najvažnijih gljiva sirka poreklom iz Srbije. Pored toga, značajan doprinos molekularnih metoda ogleda se u bržoj i lakšoj identifikaciji i razlikovanju srodnih i morfološki sličnih vrsta koje je teško razlikovati na drugi način. Zbog svoje jednostavnosti i pouzdanosti PCR metoda postala je jedna od najčešće korišćenih metoda u detekciji fitopatogenih gljiva. Molekularna detekcija odabranih izolata *Fusarium* spp. obavljena je primenom dva različita načina izolacije ukupne DNK i to primenom DNeasy Plant Mini Kit–a i standardne CTAB metode. Dobijeni rezultati bili su veoma slični u svim ponavljanjima. Ekstrahovana DNK bila je intaktna i pogodna za dalje uspešno umnožavanje u PCR reakciji, omogućujući uspešnu detekciju svih izolata odabranih za

rad. Ipak, primena komercijalnog DNeasy Plant Mini Kita omogućila je da se ukupna DNK prečisti iz biljnog tkiva i ćelija gljiva brzo, lako i pouzdano. Primena komercijalnog kita je i bezbednija jer se ne koristi ekstrakcija sa fenolom ili hloroformom ili precipitacija sa alkoholom što čini postupak lakšim za istovremeni rad sa više uzoraka.

Primenom različitih prajmera prilikom izvođenja PCR metode zabeležena je razlika u specifičnosti i pogodnosti detekcije sekvenci svih pet različitih delova genoma, ITS region, geni za TEF-1 α , β -tubulin i calmodulin i mtSSU rDNK, gljiva prouzrokovala fuzariozne truleži sirka. Univerzalni par prajmera ITS1/ITS4 koji amplifikuje ITS region svih Eukariota, pokazao se pogodnim za proveru uspešnosti ekstrakcije DNK, a takođe i za korišćenje u okviru protokola za identifikaciju sekvencioniranjem dobijenih produkata vrsta roda *Fusarium*. ITS region je visoko varijabilan između morfološki različitih vrsta gljiva nekih rodova, a sa druge strane konzervativan na nivou vrste, tako da su ovi opšti prajmeri omogućili prepoznavanje svih ispitivanih izolata. **Mirhendi et al.** (2010) uspešno su razlikovali 16 *Fusarium* vrsta primenom univerzalnih prajmera ITS1/ITS4 sekvencioniranjem produkata veličine oko 550 bp kod svih ispitivanih izolata. Univerzalni prajmeri ef1/ef2 koji amplifikuju barkoding region TEF-1 α gena kod svih poznatih vrsta roda *Fusarium* (**Summerell et al.**, 2003; **Geiser et al.**, 2004; **Kristensen et al.**, 2005), pokazali su se najpogodnijim za identifikaciju i karakterizaciju ispitivanih izolata, kao i kod mnogih drugih rodova fitopatogenih gljiva. Gen za β -tubulin visoko je konzervativan i pokazao se uspešnim za razlikovanje blisko povezanih vrsta, koje je ranije bilo teško razdvojiti na osnovu morfoloških svojstava (**Geiser et al.**, 2004). Primenom para prajmera T1/T22 (**O'Donnell and Cigelnik**, 1997) uspešno je amplifikovan gen za β -tubulin dužine oko 1300 bp kod 13 od 16 ispitivanih izolata. Međutim, kod izolata ispitivanih standarda *F. equiseti* i *F. graminearum* reakcija je bila slabog inteziteta što se ogledalo u pojavi tanjih traka u više ponovljenih PCR reakcija. Gen za calmodulin, amplifikovan uz pomoć prajmera CL1/CL2A, koji se pokazao informativnim za filogenetske analize kompleksa *G. fujikuroi*, kao i vrsta roda *Fusarium* (**O'Donnell et al.**, 2000a), smatra se najboljim kandidatom i za analize strukture populacije (**Geiser et al.**, 2000). U ovom radu, gen za calmodulin pokazao se odgovarajućim za identifikaciju i filogenetske analize izolata svrstanih u četiri morfološke grupe, ali ne i za amplifikaciju tri izolata

pete morfološke grupe (*E. nigrum*). Detekcija i identifikacija ispitivanih izolata obavljena je i primenom prajmera MS1/MS2 (White et al., 1990) koji omogućavaju amplifikaciju mitohondrijalne male podjedinice (mtSSU) ribozomske DNK. Primenom ovih prajmera prisustvo fragmenta veličine oko 716 bp ustanovljeno je kod predstavnika svih pet morfoloških grupa ispitivanih izolata. Međutim, kod izolata *F. equiseti* (286–09, RBG851), *F. thapsinum* (808–11, RBG5255) i *E. nigrum* (291–09, 315–09, 539–10) reakcija je bila slabog intenziteta, sa pojavom tanjih traka očekivane veličine u svim ponovljenim PCR reakcijama.

Molekularna detekcija, sekvencioniranje i filogenetske analize DNK sekvenci odgovarajućih delova genoma pružile su mogućnost da se preciznije proučava razdvajanje vrsta roda *Fusarium*, da se identifikuju nepoznati izolati, da se ustanove međuodnosi između poznatih vrsta, kao i da se izvrši mapiranje toksikogenih profila vrsta ili grupa vrsta (O'Donnell et al., 1998a). Kako populacija *Fusarium* spp. iz stabla i semena gajenog sirka poreklom iz Srbije do sada nije ispitivana na molekularnom nivou, nije poznata genetička struktura, kao ni variranje srpskih izolata u odnosu na izolate *Fusarium* spp. poreklom iz Evrope i drugih delova sveta, molekularna ispitivanja su, osim detekcije bila usmerena i na njihovu identifikaciju i karakterizaciju. Dobijeni rezultati predstavljaju prvu detaljniju karakterizaciju jednog ovako složenog kompleksa gljiva sa gajenog sirka u Srbiji. Višestrukim poređenjem sekvenci odgovarajućih delova nuklearne i mitohondrijalne DNK, kao i sekvencioniranjem tri proteinska gena (TEF-1 α , β -tubulin, calmodulin) sa dostupnim sekvencama odgovarajućih regiona genoma gljiva u GenBank bazi podataka i proračunom genetičke sličnosti, obavljena je potvrda identifikacije svih odabranih izolata poreklom sa gajenog sirka. Analizom nukleotidnih sekvenci različitih genoma utvrđeno je da odabrani izolati pripadaju vrstama *F. equiseti*, *F. proliferatum*, *F. graminearum* i *F. thapsinum*, kao i vrsti *E. nigrum*. Rezultati dobijeni u ovim istraživanjima, uspešna primena protokola za molekularnu identifikaciju *F. graminearum* na osnovu sekvence TEF gena koji kodira translacioni faktor izduživanja 1-alfa, predstavljaju početak i osnovu proučavanja filogeografske distribucije ove značajne vrste u Srbiji. Naročito je značajno što dobijeni rezultati predstavljaju uvod u bližu genetičku karakterizaciju, kao i brzo i lako razlikovanje ove vrste od morfološki sličnih vrsta iz *Fg* kompleksa (Ristić i sar., 2011).

Molekularna identifikacija odabranih izolata obavljena BLAST analizom sekvenci produkata svih pet gena pojedinačno, pokazala je visok stepen nukleotidne identičnosti (99–100%) sa sekvencama odgovarajućih gena izolata *F. equiseti*, *F. proliferatum*, *F. graminearum* i *F. thapsinum*, kao i *E. nigrum* deponovanih u GenBank bazi podataka.

Genetička sličnost izolata 286–09 sa lokaliteta Bački Petrovac, koji je prethodno okarakterisan na morfološkom nivou kao predstavnik morfološke grupe I, sa ostalim izolatima *F. equiseti* poreklom iz različitih delova sveta, ispitivana je analizom sekvenci svih pet različitih delova genoma koji su se pokazali značajnim za karakterizaciju *F. equiseti*. Izražena uniformnost sekvenci TEF–1 α gena potvrđena je visokim stepenom identičnosti sekvence izolata iz Srbije i izolata *F. equiseti* iz drugih delova sveta. Homologija sekvenci TEF–1 α gena kretala se od 99,5 do 100%, a razliku u samo tri nukleotida ispitivani izolat ispoljio je sa sekvencama (DQ842056, FJ939674, FJ939686) iz Kanade, Francuske i Italije. Na osnovu analize delimične sekvence TEF–1 α gena, **Stepień et al.** (2012) procenili su varijabilnost 27 izolata *F. equiseti* poreklom iz Italije i Poljske. Analizom polimorfizma ovog regiona od ukupno 27 izolata, 22 pokazala su visok nivo nukleotidne identičnosti od 99%.

Molekularna identifikacija na osnovu analize sekvence ITS regiona, potvrdili su pripadnost ispitivanog izolata (286–09) vrsti *F. equiseti*, a homologija sekvenci u okviru vrste kretala se od 99,4 do 100%. Razlika u samo tri nukleotida (99,4%) pokazala se kod sekvenci izolata *F. equiseti* poreklom iz Australije, Francuske i Kine, a najmanju homologiju od 98,7% sa razlikom u 11 nukleotida ispitivani izolat pokazao je sa izolatima *F. equiseti* iz Japana i SAD. Na osnovu ovih dostupnih sekvenci nije bilo moguće uočiti varijabilnost ispitivanih izolata povezanu sa njihovim geografskim poreklom.

Na osnovu analize sekvenci gena za β -tubulin nije ispoljena visoka varijabilnost u okviru vrste *F. equiseti*. Nukleotidnu sličnost od 100% ispitivani izolat ispoljio je sa izolatom *F. equiseti* (GQ915441) iz SAD. Može se uočiti da na osnovu sekvenci gena za calmodulin postoji varijabilnost između izolata u okviru jedne vrste, jer je najviši stepen nukleotidne identičnosti od 100% ispitivani izolat 286–09 pokazao sa izolatom *F. equiseti* iz Nemačke (GQ505509), a najniži stepen identičnosti (97,6%) sa razlikom u 15 nukleotida pokazao je sa izolatom *F. equiseti* iz SAD (GQ857062).

Sekvenca mitohondrijalnog dela genoma (mtSSU) rDNK izolata 286–09 poreklom iz prizemnog dela stabla, iz Srbije, prva je sekvenca ovog dela genoma prijavljena u GenBank bazi podataka, tako da nije bilo moguće napraviti poređenje, niti oceniti varijabilnost na osnovu ovog dela genoma u okviru ove vrste. Stepen nukleotidne sličnosti mtSSU gena ispitivanog izolata sa izolatima dostupnim u GenBank bazi podataka pokazao je nizak stepen identičnosti od 97,1% sa razlikom u 18 nukleotida sa 67 sekvenci različitih specijalizovanih formi *F. oxysporum*.

Genetička sličnost između izolata 297a–09, 13–10, 521–10, 522–10 i 530–10, predstavnika morfološke grupe II i sa ostalim izolatima *F. proliferatum* poreklom iz različitih delova sveta takođe je ispitivana analizom sekvenci pet različitih delova genoma. Na osnovu sekvenci TEF–1 α gena pet ispitivanih izolata pokazuje izuzetno visok stepen međusobne homologije (99,5%–99,8%), što ukazuje tako da na osnovu sekvenci TEF–1 α gena postoji mala varijabilnost između ovih izolata. **Sampietro et al.** (2010) takođe su utvrdili visok stepen nukleotidne sličnosti između izolata bez obzira na poreklo, tako da je čak četiri izolata bilo identično sa izolatima iz pšenice. Slično tome, homologija sekvenci ITS regiona ispitivanih izolata kretala se od 99,4 do 100%. Sekvence ITS regiona su generalno konzervativne ili pokazuju jako male razlike u okviru vrsta roda *Fusarium*, što je potvrđeno visokom homologijom ITS regiona između morfološki različitih vrsta gljiva, pa je tako na osnovu nukleotidne identičnosti ispitivan izolat (297a–09) pokazao 100% sličnosti sa sekvencama izolata prijavljenih pod potpuno različitim imenima (*F. proliferatum*, *G. moniliformis*, *G. intermedia*, *F. subglutinans* i *Fusarium* spp.). Slično tome, **Cheng et al.** (2008) su sekvencu ITS regiona izolata iz Južne Kine uporedili sa vrstama *G. fujikuroi* kompleksa i rezultati su pokazali 100% nukleotidne identičnosti sa sekvencama izolata različitih vrsta *F. proliferatum* i *G. fujikuroi*. Istraživanja **Stanković et al.** (2007) potvrđuju ove rezultate, međutim prema predlogu **Waalwijk's** (1996), identičnost ITS sekvenci *F. proliferatum* i *G. fujikuroi* ne može biti prihvaćena kao odgovarajuća slika njihove morfološke i genetičke različitosti kakva postoji u prirodi. Ovo potvrđuju filogenetske analize i rekonstruisana filogenetska stabla, koja se potpuno razlikuju u odnosu na filogenetske analize na osnovu egzona i introna gena za β -tubulin (**O'Donnell and Cigelnik**, 1997). Neophodna je obazrivost pri filogenetskoj interpretaciji ITS sekvenci roda *Fusarium*. Kao što su i rezultati dobijeni u ovom radu potvrdili, pravilna identifikacija ipak zahteva

analiziranje drugih delova genoma, kao što je TEF-1 α gen koji je visoko informativan na nivou vrste za rod *Fusarium*, i koji pokazuje visok polimorfizam sekvenci između blisko srodnih vrsta, čak i u poređenju sa intronom kodirajućih gena, kao što su β -tubulin, calmodulin i histon *H3* (Geiser et al., 2004).

Na osnovu analize sekvenci gena za β -tubulin i calmodulin, takođe nije ispoljena visoka varijabilnost u okviru vrste *F. proliferatum*. Stepenn nukleotidne sličnosti gena za β -tubulin ispitivanog izolata (297a-09) sa izolatima iz ostalih delova sveta pokazala je visoku homologiju (99,3 do 100%), sa razlikom u samo jednom nukleotidu (99,9%) u odnosu na *F. proliferatum* iz Španije i 9 nukleotida sa izolatom iz Japana. Homologija sekvenci gena za calmodulin takođe je bila visoka i kretala se od 99,2 do 100%. Najviši stepenn identičnosti (100%) pokazao je sa dva izolata *F. proliferatum* iz Italije, a najniži stepenn identičnosti (99,2%) sa razlikom u 5 nukleotida pokazao je sa *F. proliferatum* iz Italije.

Kwon et al. (2001) su analizom sekvenci četiri lokusa gena *F. proliferatum*, dokazali visok stepenn homologije između izolata ove gljive poreklom iz pšenice i šumskog zemljišta iz Španije. Stepenn nukleotidne sličnosti gena za calmodulin ova dva izolata pokazala je potpunu identičnost sekvenci, dok na osnovu gena za TEF-1 α i mtSSU rDNK zabeležena je razlika u dva nukleotida, i kod gena za β -tubulin razlika u tri nukleotida.

Potvrđena je visoka homologija mitohondrijalnog dela genoma (mtSSU) rDNK između morfološki različitih vrsta gljiva i tako je na osnovu sekvenci ovog dela genoma najviši stepenn nukleotidne identičnosti od 100% ispitivan izolat (297a-09) pokazao sa sekvencama izolata prijavljenih kao *F. proliferatum* i najmanje četiri različite gljive, što ukazuje da ni ovaj genski lokus nije u potpunosti pogodan za molekularnu identifikaciju.

Genetička sličnost izolata 532-10, 535-10 i 536-10 iz morfološke grupe III identifikovane kao *F. graminearum* međusobno i sa ostalim izolatima *F. graminearum* poreklom iz različitih delova sveta, analizirana je na osnovu sekvenci gena za TEF-1 α . Ispitivani izolati pokazali su izraženu uniformnost, pri čemu izolat 532-10 ima 99,7% nukleotidne sličnosti sa druga dva izolata, koja su međusobno potpuno identična. Homologija sekvenci ovog gena bila je veoma visoka, kretala se od 98 do 99% sa sekvencama 64 izolata *G. zae* iz drugih delova sveta. Kako se radi o barkoding regionu

ne postoji varijabilnost sekvenci TEF-1 α gena unutar vrste, s obzirom da su izražen stepen identičnosti od 99,8%, sa razlikom u samo jednom nukleotidu ispitivani izolati pokazali sa sekvencom 41 izolata različitog porekla, iz Norveške, USA, Francuske, Danske, Finske, Italije, Kine i Australije. Rezultati molekularne identifikacije na osnovu analize sekvence gena za TEF-1 α , potvrdili su da izolovane peritecije (uzorak 14-11) pripadaju vrsti *G. zeae*. Slično tome, **Sampietro et al.** (2010) utvrdili su visok stepen identičnosti od 100% između izolata *G. zeae* iz kukuruza i pšenice iz Buenos Ajresa sa izolatima iz Mađarske, Irana i SAD, a **Scott and Chakraborty** (2006) potvrdili su identifikaciju 47 izolata ove vrste poreklom iz pšenice iz Australije.

Utvrđena nukleotidna sličnost predstavnika grupe III, (535-10) sa ostalim *F. graminearum* izolatima potvrđuje njegovu identifikaciju kao *F. graminearum* i na osnovu homologije sekvenci ITS regiona. Najviši stepen nukleotidne identičnosti od 100% ispitivan izolat pokazao je sa sekvencama 9 izolata *G. zeae* različitog porekla, iz Japana, Ekvadora, Kolumbije, Kine i Francuske. Visok stepen homologije nukleotidnih sekvenci (99,6%) sa razlikom u dva nukleotida ispitivani izolat pokazao je sa izolatom *F. graminearum* izolovanog iz *Rumohra adiantiformis* iz Floride, SAD. Analizom sekvenci ITS1 i 5.8S rDNK regiona izolata kompleksa *F. graminearum* i *F. culmorum*, **Chung et al.** (2008) dokazali su visoku homologiju sekvenci. Međutim, došlo je do substitucije u dve nukleotidne pozicije ITS1 i ITS2 regiona između izolata *F. graminearum* kompleksa i *F. culmorum*. Slično tome, razna istraživanja navode da ITS1 i 5.8S rDNK region nije pogodan za identifikaciju kompleksa *F. graminearum* i *F. culmorum* zbog niskog polimorfizma nukleotidnih sekvenci (**Bateman et al.**, 1996; **Shilling et al.**, 1996; **Edel et al.**, 1997; **Yli-Mattila et al.**, 2004).

Na osnovu analize sekvenci gena za β -tubulin, 100% nukleotidne sličnosti ispitivani izolat 535-10 ispoljio je sa sekvencom izolata *G. zeae* iz SAD, Japana i Rusije, a nešto niži stepen nukleotidne identičnosti (99,3%) sa razlikom u pet nukleotida pokazao je sa izolatom *G. zeae* iz Kine. Slično tome, vrlo nizak stepen sličnosti gena za calmodulin, sa razlikom u dva nukleotida ispitivani izolat pokazao je sa izolatom *G. zeae* iz Kine. Proračunom genetičke sličnosti na osnovu mitohondrijalnog dela genoma (mtSSU) rDNK, najviši nivo homologije od 99,8%, sa razlikom u jednom nukleotidu, ispitivani izolat pokazao je sa sekvencama šest izolata različitih *Fusarium* vrsta, od čega su dva izolata prijavljena kao *G. zeae* iz Finske i SAD, a četiri izolata *F. culmorum* iz

Velike Britanije. Ovi rezultati ukazuju na ograničeni značaj ovog gena za molekularnu identifikaciju vrste i ograničen značaj ovog dela genoma za razlikovanje blisko srodnih vrsta.

Na osnovu sekvenci pet genomnih delova potvrđeno je da izolat 808–11 pripada vrsti *F. thapsinum*, što je preliminarno utvrđeno na osnovu morfoloških svojstava. Homologija sekvenci gena za TEF–1 α izolata iz Srbije i iz drugih delova sveta bila je visoka a najveća razlika od svega tri nukleotida ustanovljena je sa *F. thapsinum* iz Kine. Slično tome, **Sampietro et al.** (2010) utvrdili su veliku sličnost između izolata iz sirka iz Argentine i iz SAD, a **Rahjoo et al.** (2008) identifikovali su 140 izolata dobijenih iz klipa kukuruza, poreklom iz 11 različitih klimatskih oblasti Irana. Zbog izuzetnog značaja ovog dela genoma u identifikaciji, proglašen je barkoding regionom i u okviru FUSARIUM–ID baze podataka (**Benson et al.**, 2007), stavljen na raspolaganje istraživačima širom sveta.

Na osnovu analize sekvenci ITS regiona, nije ispoljena visoka varijabilnost u okviru vrste *F. thapsinum*, tako da je ispitivani izolat 808–11 bio identičan sa šest izolata *F. thapsinum* iz SAD, Kine i Indije, a razlikovao se samo u dva nukleotida sa izolatom iz Južne Afrike.

Na osnovu analize sekvenci gena za β -tubulin i calmodulin, takođe je uočena visoka uniformnost sekvenci. U regionu sekvence gena za β -tubulin, ispitivani izolat 808–11 bio je identičan sa izolatom *F. thapsinum* iz Južne Afrike, dok je sekvenca gena za calmodulin bila identična sa izolatom iste vrste iz SAD. Na osnovu sekvence mitohondrijalnog dela genoma (mtSSU) rDNK, izolat iz Srbije razlikovao se samo u jednom nukleotidu od izolata *G. thapsina* iz Južne Afrike, koji je takođe izolovan iz *S. bicolor*.

Primena molekularnih metoda i identifikacije na osnovu sekvencioniranja odgovarajućeg dela genoma pokazala se veoma korisnim u slučaju morfološke grupe V ispitivane u ovom radu. Po morfologiji kolonije, pigmentu i neobičnom izgledu konidija, pojedini izolati pogrešno su dovedeni u vezu sa *Fusarium* sp. Tek je primena molekularnih metoda identifikacije i karakterizacije na osnovu sekvenci ITS regiona rDNK dovela izolate 291–09 (JQ619838) i 315–09 (JQ619839) u vezu sa vrstom *Epicoccum nigrum* jer je ustanovljena potpuna nukleotidna sličnost sa sekvencama 23 izolata različitog porekla koji su prijavljeni kao *E. nigrum*.

Kako populacija *E. nigrum* iz semena sirka poreklom iz Srbije do sada nije ispitivana na molekularnom nivou, nije poznata genetička struktura, kao ni variranje srpskih izolata u odnosu na izolate *E. nigrum* poreklom iz Evrope i drugih delova sveta. Iz ovih razloga, molekularna ispitivanja su, osim detekcije bila usmerena i na njihovu identifikaciju i karakterizaciju, a dobijeni rezultati predstavljaju prvu detaljniju karakterizaciju *E. nigrum* u Srbiji.

Kilpatrick and Chilvers (1981) ispitali su varijabilnost 2000 izolata *Epicoccum* i zaključili da pripadaju genetski varijabilnoj vrsti, što je kasnije potvrđeno i analizom 5.8S i ITS regiona rDNK (**Wang and Guo**, 2004). Na osnovu poređenja sekvenci u području ITS regiona, ustanovljena je značajna sličnost sa vrstom *Cerebella andropogonis* (**Pažoutová end Kolínská**, 2003) što ukazuje da su ovi rodovi sinonimni, kao što je i ranije bilo predloženo (**Schol-Schwarz**, 1959). Na osnovu morfoloških zapažanja i ITS analiza predloženo je da *Phoma epicoccina*, još jedna srodna vrsta, i *E. nigrum* predstavljaju iste biološke vrste (**Arenal et al.**, 2004), mada su izolati *E. nigrum* izgubili sposobnost da formiraju piknide za razliku od izolata *P. epicoccina*. Dalja istraživanja **Fávaro et al.** (2011) dokazala su genetičku povezanost između izolata *E. nigrum* poreklom sa različitih biljaka domaćina, korišćenjem sekvenci ITS regiona rDNK i β -tubulin gena, a filogenetske analize pokazale su da izolati *E. nigrum* mogu biti razdvojeni u dve odvojene grupe. Pomenuta istraživanja ukazuju na činjenicu da su obe grupe široko rasprostranjene u svetu. Primenjujući složenije analize, kombinujući morfološke, fiziološke i molekularne analize, **Fávaro et al.** (2011) razlikuju dva klastera i postavljaju hipotezu da isolate *E. nigrum* treba razdvojiti u dve vrste. Dalja istraživanja ukazaće na opravdanost razdvajanja ovih izolata u zasebne vrste, a time i preciznije mesto koje pripada analiziranim izolatima sa sirka u Srbiji. U isto vreme, dobijeni rezultati predstavljaju prvu karakterizaciju izolata *E. nigrum* u Srbiji, što s obzirom na specifičnu ulogu ove vrste u prirodi otvara mogućnost za dalja istraživanja, naročito metabolita i njihove uloge u patogenezi i epidemiologiji.

6.5. Molekularna karakterizacija *Fusarium* spp.

Filogenetska analiza nukleotidnih sekvenci različitih delova genoma (ITS region; TEF-1 α ; β -tubulin; calmodulin i mtSSU rDNK) potvrdila je genetsku heterogenost ispitivanih izolata gljiva prouzrokovala fuzariozne truleži sirka. U ovom

radu, ukupno je rekonstruisano devet filogenetskih stabala koja su dala doprinos razumevanju međusobnih odnosa ispitivanih vrsta roda *Fusarium*. Rasvetljavanje evolutivne međupovezanosti različitih izolata pružilo je uvid u prisustvo i rasprostranjenost vrsta ovog veoma značajnog roda u našoj zemlji i njihovo mesto u odnosu na ostale vrste u svetu.

Raznolikost sekvence ITS1 rDNK može ilustrovati sličnosti između mnogih vrsta jedne sekcije, dok se na osnovu sekvenci ITS2 *Fusarium* spp. mogu grupisati u dva glavna klastera (tip I i tip II), koja su podudarna ili odstupaju od granica sekcija (Waalwijk et al., 1996). S obzirom da sekvence regiona ITS2 obuhvataju dve divergentne i neortologe kopije, celokupan ITS region koji je puno korišćen u filogenetskim analizama brojnih drugih rodova gljiva, prema navodima O'Donnell et al. (2000a) nije dobar izbor za filogenetske analize vrsta roda *Fusarium* jer ustanovljene razlike nisu evolutivno informativne. Da bi se došlo do pouzdanih zaključaka potrebno je prema Waalwijk et al. (1996) kombinovati morfološke i molekularne metode bazirane na filogenetskoj analizi drugih lokusa. Slično tome filogenetskim stablom rekonstruisanim na osnovu sekvenci ITS regiona rDNK, *F. proliferatum* (297a–09) i *F. thapsinum* (808–11) iz Srbije, smešteni su unutar drugog klastera zajedno sa drugim srodnim vrstama. Isti način grupisanja vrsta unutar *G. fujikuroi* kompleksa iz različitih delova sveta, utvrdili su i O'Donnell et al. (2000a), mada ih nisu dalje analizirali. Ove dve vrste ispoljavaju morfološku sličnost, mada *F. thapsinum* formira mikrokoniidije u vidu lažnih glavica ili nizova samo iz monofijalida, dok *F. proliferatum* iz monofijalida i polifijalida (Leslie and Summerell, 2006). Takođe, zajedno formiraju blago srpaste do skoro prave makrokoniidije, sa tri do pet poprečnih pregrada, što je tipično za vrste *G. fujikuroi* kompleksa. Sva ova svojstva podržavaju filogenetsko grupisanje ukazujući na bliži odnos ove dve vrste unutar roda *Fusarium*. Međutim, različito opisana toksikogena svojstva, *F. proliferatum* koja sintetiše visok nivo fumonizina (Desjardins, 2006), i *F. thapsinum* koja luči visok nivo moniliformina (Porter et al., 2000; Porter et al., 2002), podržavaju rezultate dobijene filogenetskom analizom.

Kombinacija sekvenci različitih genskih regiona i njihova analiza proširila su saznanja o vrstama unutar *G. fujikuroi* kompleksa (O'Donnell and Cigelnik, 1997; O'Donnell et al., 1998a, 2000a; Steenkamp et al., 1999, 2000; Aoki et al., 2001; Geiser et al., 2005). Prema trenutnim saznanjima, smatra se da *G. fujikuroi* kompleks

obuhvata najmanje 50 različitih vrsta ili filogenetskih linija, koje približno odgovaraju onim vrstama koje su priznate korišćenjem morfološkog i biološkog koncepta klasifikacije. Korišćenje sekvenci različitih gena za sistematiku na nivou vrste, takođe je pružilo uvid u filogenetski međuodnos unutar kompleksa *G. fujikuroi*, određivši preciznije mesto mnogim prethodno nedovoljno precizno klasifikovanim izolatima. Uopšteno govoreći, molekularna filogenetska analiza pruža neophodni taksonomski okvir potreban za proučavanje granice između vrsta i veze između areala rasprostranjenja, kruga domaćina, biogeografije i potencijala za biosintezu mikotoksina (O'Donnell et al., 1998a).

Brojna proučavanja uporednih konvencionalnih i molekularnih svojstava ukazala su na evolutivne veze između vrsta *G. fujikuroi* kompleksa koje se grupišu u tri velika klastera. Iako nisu formalno imenovani, figuriraju oznake koje se odnose na geografsko poreklo biljke domaćina iz koje su *Fusarium* vrste izolovane, tako da se često označavaju kao “Afrički”, “Američki” i “Azijski”. Mada se ovi nazivi široko upotrebljavaju, nisu retka ni osporavanja (Kvas et al., 2009). Ova biogeografska hipoteza izgleda pouzdana i primenljiva za većinu *Fusarium* vrsta unutar kompleksa *G. fujikuroi*. Prema biogeografskom razdvajanju *F. proliferatum* iz Srbije, pripada “Azijskom” klasteru zajedno sa izolatom *F. proliferatum* iz orhideje iz Nemačke, dok je *F. thapsinum* iz Srbije smešten u “Afrički” klaster sa većinom vrsta kompleksa *Gibberella fujikuroi*, među kojima je i sekvenca izolata *F. thapsinum* iz *S. bicolor* iz Južne Afrike. Ovako razdvajanje *F. proliferatum* i *F. thapsinum* iz Srbije u dva odvojena klastera povezano sa uočenim morfološkim razlikama i po svemu sudeći dobro ilustruje njihovu evolutivnu udaljenost. Prema tome, filogenetske analize na osnovu TEF-1 α regiona najbolje ilustruju međusobne odnose ove dve vrste, ističući njihove razlike unutar kompleksa vrsta *G. fujikuroi* u svetu.

“Afrički” klaster je najveći sa 21 filogenetskom vrstom, od kojih četiri predstavljaju biološke vrste ili populacije sa polnim načinom razmnožavanja (Klittich and Leslie, 1992; Leslie, 1995; Klaasen and Nelson, 1996; Klittich et al., 1997; Geiser et al., 2005; Lepoint et al., 2005). Morfološki, ovaj klaster karakterišu ovalne do izdužene mikrokonidije u dugim nizovima formirane iz monofijalida, što u potpunosti odgovara svojstvima koja je ispoljio izolat 808–11 slično drugim srodnim

vrstama kao što su *F. dlaminii*, *F. napiforme*, *F. nygamai*, *F. acutatum*, *F. pseudoanthophilum* i *F. udum*.

Nasuprot tome, *F. proliferatum* iz Srbije, karakteriše prisustvo mikrokonidija iz polifijalida u vidu dugih lanaca, što je u saglasnosti sa svojstvima vrsta iz “Azijskog” klastera, kao što su ostali izolati vrsta *F. proliferatum* i *F. fujikuroi*. “Azijski” klaster je najmanji, sadrži 10 morfološki opisanih vrsta, od kojih je za tri vrste poznato da formiraju i polni stadijum (**Kuhlman**, 1982; **Leslie**, 1991, 1995; **Samuels et al.**, 2001; **Leslie et al.**, 2005). “Američki” klaster, gde nema predstavnika iz Srbije poreklom iz sirka, obuhvata 18 filogenetskih vrsta ili linija u kome je većina pokazala morfološka svojstva slična *F. subglutinans* koji formira ovalne mikrokonidije na lažnim glavicama iz mono- i polifijalida (**Nelson et al.**, 1983).

Na osnovu ispitivanja vrsta roda *Fusarium*, poreklom sa sirka u Srbiji, utvrđeno je prisustvo vrste iz *F. graminearum* kompleksa (*Fg* kompleks), koji predstavlja drugi značajan kompleks gljiva u okviru ovog roda. DNK sekvence šest gena 99 izolata *F. graminearum* sakupljenih iz različitog biljnog materijala širom sveta **O'Donnell et al.** (2000b) su razdvojili (*Fg* kompleks) u sedam različitih filogenetskih linija porekla. Posle dodatnih ispitivanja, pre svega toksikogenih svojstava, ove linije su podignute na nivo vrsta koje ispoljavaju različitu rasprostranjenost i učestalost (**O'Donnell et al.**, 2004). Do sličnih zaključaka došli su i **Zeller et al.** (2004) primenom polimorfizma dužine amplifikovanih fragmenata (AFLP, Amplified Fragment Length Polymorphism) i analizom 30 lokusa. Jedna od vrsta iz *Fg* kompleksa, koja je na osnovu sekvenci introna i egzona β -tubulin gena i heterotalusnog ponašanja u testovima ukrštanja, među prvima izdvojena je *F. pseudograminearum* (nekada poznata kao *F. graminearum* Grupa1) (**Aoki and O'Donnell.**, 1999a). **Schmale et al.** (2006) smatraju da su ove poljske populacije deo jedne velike regionalne populacije koja nije polno izolovana, da njihove askospore predstavljaju osnovni inokulum koji se vetrom prenosi na velike udaljenosti omogućavajući efikasno širenje i doprinoseći razmeni genetičkog materijala. Ovakve rezultate potvrdili su **Burlakoti et al.** (2008) i **Vogelgsang et al.** (2009), navodeći da ove filogenetske linije porekla ipak predstavljaju pre genetički i geografski razdvojene populacije koje nisu polno izolovane, a koje su deo jedne velike populacije koja se ne razlikuje u odnosu na biljke domaćine sa kojih su izolovane. **Alvarez et al.** (2010) navode da je u Argentini, u *Fg* kompleksu, prisutna samo predominantna *F.*

graminearum sensu stricto, međutim, novija istraživanja dovode u pitanje ovakve rezultate.

Dalja brojna istraživanja ovog *Fg* kompleksa doprinose opisivanju novih vrsta ili novih saznanja o njihovim odnosima (**O'Donnell et al.**, 2000b; **Cumagun et al.**, 2004; **O'Donnell et al.**, 2004; **Starkey et al.**, 2007; **O'Donnell et al.**, 2008; **Yli-Mattila et al.**, 2009).

Analizom filogenetskog stabla rekonstruisanog na osnovu sekvenci ITS regiona rDNK, odabrani izolati *Fg* kompleksa nisu se grupisali prema očekivanoj evolutivnoj srodnosti. Zbog visoke homologije sekvenci ITS regiona svi izolati *Fg* kompleksa grupisani su u jedan zajednički klaster, gde spada i ispitivani izolat 535-10. Međutim, filogenetska analiza unutar *Fg* klastera obavljena na osnovu DNK sekvenci gena za TEF1- α i β -tubulin, pokazala je da su izolati 532-10, 535-10, 536-10 i 14-11, identifikovani kao *F. graminearum* svrstani u klaster 7, zajedno sa ostalim izolatima iste vrste, koje preovlađuju u Severnoj hemisferi. Na osnovu ovog filogenetskog stabla **O'Donnell et al.** (2000b) zaključili su da je evolutivna povezanost između sedam linija *Fg* klastera dosta slaba, izuzev između sestrinske grupe linija porekla 1 i 2 (*F. austroamericanum* i *F. meridionale*). Ove linije unutar *Fg* klastera razlikuju se između ostalog i po svojoj rasprostranjenosti, nastanjujući različite kontinente.

Filogenetsko stablo rekonstruisano iz fragmenta gena za elongacioni faktor TEF-1 α 54 dostupnih sekvenci *F. equiseti* izolata iz Severne i Južne Evrope pokazalo je jasno razdvajanje u tri klastera. Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije potvrdila su postojanje navedenih tipova u okviru vrste *F. equiseti*, pri čemu je populacija u Srbiji po prvi put molekularno okarakterisana na nivou nižem od vrste. Sekvenca izolata 286-09 iz Srbije grupisana je u drugi klaster, koji odgovara tipu II, zajedno sa sekvencama 12 izolata *F. equiseti* iz Španije. Filogenetska analiza na osnovu gena za elongacioni faktor (TEF-1 α) izolata *F. equiseti* i *F. acuminatum* iz ječma i pšenice, iz Španije i drugih delova sveta ukazuje na postojanje široke genetičke varijabilnosti izolata iz Severne i Južne Evrope podeljenih u dva klastera, koji odgovaraju populacijama označenim kao tip I i tip II (**Marín et al.**, 2012). Ove dve populacije, odnosno tipovi, razlikuju se prema toksikogenoj aktivnosti (**Adejumo et al.**, 2007; **Kosiak et al.**, 2005; **Marín et al.**, 2012). Slične rezultate dobili su i **Jurado et al.** (2006). Četiri od pet izolata iz Severne Evrope koje su opisali **Kosiak et al.** (2005)

pripadaju tipu I, dok su preostali svrstani unutar klastera *F. scirpi*. Postojanje dve različite populacije u okviru vrste može da objasni njihovo prisustvo u značajno različitim klimatima. Takođe, životni ciklus *F. equiseti* podrazumeva i polni stadijum *Gibberella intrincans* (Leslie and Summerell, 2006) a peritecije su do sada proučavane samo u *in vitro* uslovima. Stoga, kao zastupljeniji način razmnožavanja *F. equiseti* smatra se bespolni stadijum. Buduća istraživanja mogu biti od koristi za karakterizaciju dve populacije, uključujući istraživanje ekofizioloških karakteristika pojedinih izolata iz obe grupe i njihov međusobni odnos u okviru različitih klimatskih uslova.

Rezultati dobijeni u istraživanjima u okviru ove doktorske disertacije, uspešna primena protokola za molekularnu identifikaciju kompleksa vrsta *G. fujikuroi*, *F. graminearum* i *F. equiseti* predstavljaju početak i osnovu proučavanja filogeografske rasprostranjenosti ovih značajnih vrsta u Srbiji. Dobijeni rezultati predstavljaju uvod u bližu genetičku karakterizaciju, kao i brzo i lako razlikovanje ovih vrsta od morfološki sličnih vrsta. Sekvencioniranje većeg broja izolata, uključivanje dodatnih delova genoma, njihovo poređenje i određivanje njihovog međudnosa i odnosa sa drugim izolatima u svetu doprinosi poznavanju strukture populacije vrsta *G. fujikuroi*, *F. graminearum* i *F. equiseti* kompleksa iz čega jedino i može da proizade uspešna strategija kontrole ovih veoma štetnih patogena.

6.6. Ocenjivanje nivoa osetljivosti različitih genotipova sirka

Vrste roda *Fusarium* su jedna od naznačajnijih grupa patogena koja napada pretežno useve različitih žita, uključujući i gajeni sirak, prouzrokujući najčešće veoma značajne ekonomske štete (Nirenberg and O'Donnell, 1998; Leslie et al., 1992; Leslie, 1995). Problemi sa bolestima sirka metlaša koje se u našim uslovima mogu sporadično pojaviti poput antraknoze čiji je prouzrokovač *Colletotrichum graminicola* i virusa mozaične kržljivosti kukuruza (*Maize Dwarf Mosaic Virus*, MDMV) u velikoj meri rešeni su selekcijom otpornih sorti (Mijavec, 1993; Maćko, 1995). U uslovima veštačke inokulacije izdvojeno je nekoliko genotipova od kojih su primenom metode pojedinačne selekcije (pedigre metoda selekcije) formirane dve linije otporne na antraknozu i tri otporne na MDMV. Ove linije ispoljavaju relativno dobre agronomске karakteristike, a njihovo testiranje u svojstvu roditelja eksperimentalnih hibrida je u toku (Sikora i Berenji, 2010). Vršena su preliminarna istraživanja i u pogledu

osetljivosti sirka na trulež stabla koju prouzrokuje *Fusarium* sp. (Baláž et al., 1996; 1997).

Dva pravca unapređenja proizvodnje gajenog sirka su metlaš i sirak za zrno. Kod sirka metlaša oplemenjivanje je usmereno na stvaranje F1 hibridnih sorti, dok se hibridi sirka za zrno ('Alba' i 'Gold') ističu poboljšanom tolerantnošću prema nepovoljnim uslovima spoljne sredine (Berenji i sar., 2008). Upravo zbog toga, ova dva genotipa su uključena u ogledе veštačke inokulacije i prirodne zaraze, u cilju određivanja nivoa osetljivosti prema odabranim *Fusarium* spp. Oplemenjivanje na otpornost prema bolestima obuhvata dve faze. Najpre je potrebno dobro proučiti patogena, etiologiju bolesti, genetičku prirodu reakcije zaraženih biljaka, razviti odgovarajuće metode poljske inokulacije i identifikovati efikasne izvore otpornosti. U drugoj fazi se geni za otpornost inkorporiraju u lokalne adaptirane ali osetljive genotipove (Berenji i Sikora, 2006). Tokom dugogodišnjeg rada na programu oplemenjivanja i unapređenja proizvodnje sirka metlaša u Institutu za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu razrađena je tehnologija proizvodnje i stvoreno je ukupno 11 sorti. Sadašnji sortiment čine sorte 'Prima', 'Tan Sava' i 'Reform' koje u potpunosti zadovoljavaju potrebe proizvođača u pogledu prinosa, a i prerađivača (metlara) u pogledu kvaliteta sirkove slame (Sikora i Berenji, 2010). Trulež stabla prouzrokuju mnogobrojni mikroorganizmi, mnoge vrste jednog roda, različiti genotipovi iste vrste, prisutna je interakcija prouzrokovala, poligeno se nasleđuje, a značajan je uticaj stresa i drugih faktora na pojavu ovog oboljenja (Penčić i Lević, 1994; Nastasić i sar., 2001). Metode veštačkog zaražavanja stabla su destruktivne i nisu u potpunosti odgovarajuće prirodnim zarazama. Ovo se pokazalo kao jedan od elemenata koji je komplikovao tumačenje rezultata poljskih ogleda za osetljivost primenom veštačkih inokulacijama obavljenim u toku izrade ove disertacije u kojima se u prvoj godini istraživanja pojavio određeni niži nivo nekroze nakon inokulacije sterilisanim čačalicama. Bez obzira na to, nekroza prouzrokovana od strane oba izolata *Fusarium* spp. bila je značajno različita i viša, što je moglo razdvojiti delovanje patogena od osetljivosti genotipova na mehanička oštećenja. Na ovaj način, primenom veštačkih inokulacija bilo je moguće uporediti genotipove sirka na osnovu njihove reakcije bez obzira na destruktivnost same metode.

Ocenjivanje osetljivosti na osnovu veštačke inokulacije i prirodne zaraze stabla sirka sa *Fusarium* spp. može dati različite rezultate (**Jocković i sar.**, 2008). Jedan od doprinosa ove disertacije je uporedno ispitivanje reakcije istih genotipova sirka na veštačke inokulacije i prirodne zaraze istom grupom prouzrokovaca truleži stabla. Iz biljaka u okviru oglada za ispitivanje osetljivosti sirka u prirodnim uslovima (Čantavir), prethodno su izolovane prevalentne *Fusarium* spp. sa kojima su u drugom lokalitetu (Bački Petrovac) bez istorije pojave oboljenja vršene veštačke inokulacije. Na taj način omogućeno je direktno poređenje reakcije genotipova. Ono što je od naročitog interesa jeste da su genotipovi sirka najotporniji u uslovima veštačke zaraze ('Alba' i 'Gold'), ispoljili najvišu otpornost i u uslovima prirodnih zaraza. Na taj način, ilustrovana je jasna reakcija genotipova i dobijeni su realni podaci o nivou otpornosti, nezavisno od metode inokulacije. Istovremeno, rezultati su pokazali da se veštačke inokulacije mogu primeniti i da u uslovima postavljenog eksperimenta, pružaju pouzdane podatke.

Kako je organizovanje poljskog oglada za ocenu osetljivosti najčešće teško, skupo i dugotrajno, postoji potreba da se preliminarno testiranje obavi u uslovima koji su kontrolisani i u kojima je moguće doći do rezultata brže a pri tome obuhvatiti veći broj genotipova sirka i patogena. Zbog toga, ocena nivoa osetljivosti genotipova sirka za zrno i sirka metlaša u kontrolisanim uslovima (stakleniku) uz veštačku inokulaciju obezbeđuje brži uspeh u preliminarnom pronalaženju otpornih genotipova. Veštačke inokulacije imaju i veliku prednost, u tome što se koristi precizno određena i uniformna količina inokuluma (fragment kolonije određene veličine, suspenzija spora određene koncentracije ili inokulisane čačkalice) identifikovanog prouzrokovaca. Sve ovo obezbeđuje ponovljivost oglada i preciznije određivanje potencijala u pogledu osetljivosti ispitivanih genotipova. Uporednim ispitivanjem osetljivosti 11 različitih genotipova sirka u različitim uslovima zaraze, dobijeni su značajni podaci o potencijalu ovih genotipova u agroekološkim uslovima u Srbiji. Osetljivost genotipova sirka je ocenjena na osnovu rezultata iz tri uporedna oglada: (a) veštačka inokulacija klijanaca sirka u uslovima staklenika; (b) inokulacija stabla sirka u poljskim uslovima u 2010. i 2011. godini na lokalitetu Bački Petrovac; (c) prirodna zaraza stabla u uslovima 2010. i 2011. godine na lokalitetu Čantavir. U svetu postoji ograničen broj sličnih uporednih testiranja na osetljivost u različitim sistemima inokulacija (**Tesso et al.**, 2010).

Prilikom ispitivanja nivoa osetljivosti klijanaca 11 različitih genotipova sirka u eksperimentalnim uslovima staklenika, ispitivane vrste *F. equiseti*, *F. proliferatum*, *F. graminearum* i *E. nigrum*, međusobno su se razlikovale po patogenosti. *F. equiseti* i *F. proliferatum* bile su najpatogenije, zatim *F. graminearum* nešto slabije patogenosti, a najslabije *E. nigrum*. U uslovima postavljenog eksperimenta, sve četiri vrste gljiva nisu prouzrokovale pojavu nekroze na genotipovima sirka za zrno 'Alba', 'Gold' i A73, kao i na američkim linijama PI595720 02 SD i PI576382 03 SD. Međutim, unutar vrste *F. proliferatum* dokazana je varijabilnost u patogenosti na nivou nižem od vrste, što je od velikog značaja. Od sve četiri ispitivane vrste, samo jedan izolat *F. proliferatum* bio je patogen za genotip 'Alba'. Na ovaj način, ispitivanjem u ranijim fenofazama razvoja biljaka sirka moguće je odrediti nivo osetljivosti genotipova neposredno posle nicanja, što je čest slučaj u prirodi jer se vrste roda *Fusarium* mogu prenositi iz godine u godinu i u nova područja pomoću zaraženog semena (Tesso et al., 2010).

Tesso et al. (2010) su u svojim istraživanjima uporedili patogenost osam *Fusarium* vrsta i otpornost različitih genotipova sirka u uslovima zaštićenog prostora. Istraživanja patogenosti pokazala su da je *F. thapsinum* najpatogeniji na gajenom sirku, kako u zaštićenom prostoru, tako i na otvorenom polju. *F. verticillioides* je pokazala veći nivo patogenosti u zaštićenom prostoru i približno isti nivo kao i ostale *Fusarium* spp. u poljskim uslovima. Istraživanja koja su sprovedi Leslie et al. (2005) ističu *F. thapsinum* kao patogeniju vrstu u odnosu na ostale proučavane vrste. Mada se *F. verticillioides* smatra primarnim patogenom kukuruza, Leslie et al. (1992) su dokazali prisustvo u tkivu sirka, ali je intenzitet zaraze bio značajnije niži u poređenju sa *F. thapsinum* (Jardine and Leslie, 1992; Mansuetus et al., 1997).

Tokom preliminarnih ispitivanja prisustva i rasprostranjenosti vrsta roda *Fusarium* na gajenom sirku, kao prevalentne na semenu i u usevu sirka u Srbiji izolovane su *F. equiseti* i *F. proliferatum*. Mada se u literaturi vrsta *F. thapsinum* često navodi kao najznačajnija na sirku (Summerell and Leslie, 2011), ona je izolovana tek u uzorcima prizemnog dela stabla i semena sirka tokom 2011. godine i bila je mnogo manje zastupljena u odnosu na vrste *F. equiseti* i *F. proliferatum*. Upravo zbog toga, za oglede utvrđivanja osetljivosti genotipova sirka odabrana su dva izolata *F. equiseti* i *F. proliferatum*. Međutim, u testu provere patogenosti u uslovima staklenika, utvrđeno je da je *F. thapsinum* patogena za klijance sirka obe gajene forme, sirka za zrno (hibridi

'Alba' i 'Gold') i sirka metlaša (sorte 'Prima' i 'Reform'). Nakon dve nedelje *F. thapsinum* prouzrokovala je potpuno sušenje i propadanje inokulisanih klijanaca sorte 'Prima' i 'Reform', dok na hibridima 'Alba' i 'Gold' nije prouzrokovala pojavu bolesti klijanaca. Buduća istraživanja uključice, pored *F. equiseti* i *F. proliferatum* kao prevalentnih tokom dve godine istraživanja i vrste *F. thapsinum* i *F. graminearum*, kao dva svakako vrlo značajna patogeni sirka za uporedno ispitivanje osetljivosti genotipova u eksperimentalnim uslovima, u stakleniku, kao i u uslovima veštačke inokulacije i prirodne zaraze.

Očitavanje rezultata u toku prve godine ispitivanja (2010) osetljivosti stabla sirka na osnovu veštačke inokulacije u polju, otežavala je činjenica da su svi ispitivani genotipovi ispoljili određenu osetljivost na mehaničke povrede što je rezultiralo koloniziranjem povređenog tkiva sekundarnim saprobima. Do ovakve reakcije verovatno je došlo zbog specifičnih uslova spoljašnje sredine i izuzetne vlage koja je bila prisutna na biljkama u vidu vodenog filma u momentu inokulacije. Međutim, *F. proliferatum* prouzrokovala je statistički značajno veću nekrozu na površini i uzdužnom preseku stabla sorte 'Prima' i 'Reform', a nešto slabiju na hibridu 'Gold'. Površina stabla hibrida 'Alba' takođe je bila zahvaćena slabom nekrozom, koja je bila vidljiva tek na uzdužnom preseku. Vrsta *F. equiseti* prouzrokovala je slabiju nekrozu na površini i uzdužnom preseku stabla sorti sirka metlaša ('Prima' i 'Reform') u poređenju sa *F. proliferatum*. Razlike u intenzitetu bolesti između otpornih i osetljivih genotipova jasno su se uočavale. Najviši nivo otpornosti u uslovima veštačke inokulacije u polju ispoljio je genotip sirka za zrno, hibrid 'Alba', zatim hibrid 'Gold', a najmanju tolerantnost sorte 'Prima' i 'Reform'. Sve reakcije bile su statistički vrlo značajno više od nivoa nekroze koji je zabeležen u kontrolnim biljkama.

U drugoj godini (2011) su u ispitivanja bila uključena i četiri genotipa sirka za zrno dobijena u razmeni iz SAD (linije PI656114 01 SD, PI534163 02 SD, PI595720 02 SD i PI576382 03 SD). Takođe su za inokulaciju korišćene dve prevalentne vrste *F. equiseti* i *F. proliferatum*, koje su se po patogenosti međusobno razlikovale. U ovoj godini istraživanja nije bilo vidljive reakcije genotipova sirka na mehanička oštećenja do kojih je dolazilo prilikom veštačkih inokulacija. *F. proliferatum* prouzrokovala je snažniju nekrozu kako na površini tako i na uzdužnom preseku stabla sorti 'Prima' i 'Reform', a nešto slabiju na hibridima 'Alba' i 'Gold'. Spoljni izgled reakcije površine

stabla američkih linija (PI656114 01 SD, PI534163 02 SD, PI595720 02 SD i PI576382 03 SD) ukazivao je na još slabiju nekrozu, koja je bila vidljiva tek na uzdužnom preseku. Vrsta *F. equiseti* prouzrokovala je slabiju nekrozu na površini i unutrašnjosti stabla hibrida sirka za zrno ('Alba' i 'Gold') i sorti sirka metlaša ('Prima' i 'Reform') u poređenju sa *F. proliferatum*. Simptomi na površini stabla američkih linija nisu bili prisutni ili je nekroza zahvatila manje od 1 cm oko mesta uboda. Ovom metodom inokulacije potvrđena je otpornost američkih linija prema vrstama *F. equiseti* i *F. proliferatum*. U uslovima postavljenog eksperimenta, može se zaključiti da su najveću otpornost prema uticaju *F. equiseti* i *F. proliferatum* ispoljili hibrid 'Alba' i američke linije PI576382 03 SD, PI534163 02 SD, PI595720 02 SD i PI656114 01 SD, zatim 'Gold' i 'Prima', a najmanju ispoljila je sorta sirka metlaša, 'Reform'. U literaturi su malobrojni podaci o proučavanjima patogenosti *F. equiseti* za različite genotipove sirka, što verovatno proizilazi iz činjenice da je u svetu ova vrsta retko identifikovana na stablu i zrnu sirka, za razliku od *F. andiyazi*, *F. thapsinum* i *F. proliferatum* koje dominiraju u hladnijim i vetrovitim oblastima širom Australije (Petrović et al., 2009). U ovom radu utvrđeno je da je *F. equiseti* manje patogena vrsta za sirak u poređenju sa *F. proliferatum*. Predmet istraživanja Tesso et al. (2004) bio je da ispituju otpornost devet roditeljskih linija i 18 F₁ hibrida sirka za zrno na fuzarioznu trulež stabla u uslovima veštačkih inokulacija, pri čemu je nivo otpornosti hibrida uglavnom bio viši nego kod roditeljskih linija. Takođe su utvrdili da je izolat *F. proliferatum* srednje patogenosti za različite linije sirka i njihove hibride

Tokom 2010. i 2011. godine ispitivana je u Čantaviru u uslovima prirodne zaraze sirka osetljivost dva genotipa sirka za zrno (hibridi 'Alba' i 'Gold') i dva genotipa sirka metlaša (sorte 'Prima' i 'Reform') na trulež stabla. Zaražene biljke ispoljavale su simptome prvenstveno na prizemnom delu stabla u vidu mrkih pega, koje su se dalje širile na internodije. Prema intenzitetu zaraze površine stabla i unutrašnjeg tkiva najosetljivije su bile sorte sirka metlaša ('Prima' i 'Reform'), pri čemu su simptomi u drugoj godini ispitivanja bili znatno izraženiji, zbog čega je dolazilo do lomljenja i poleganja biljaka. Znatno manju osetljivost ispoljila su dva hibrida sirka za zrno ('Alba' i 'Gold'), međutim u prvoj godini nekroza na površini stabla bila je u vidu sitnih, mrkih pega, dok je u drugoj godini nekroza zahvatala više od 1/2 internodije. Rezultati ocene osetljivosti genotipova sirka u potpunosti su se podudarili sa rezultatima dobijenim u

veštačkim inokulacijama, i to kako u stakleniku tako i u polju. Poređenjem reakcije genotipova sirka vidi se da su i u uslovima prirodne zaraze genotipovi iz grupe metlaša bili značajno osetljiviji u poređenju sa hibridima iz grupe sirka za zrno. Izlaganje biljaka prirodnim izvorima inokuluma najčešće nije dovoljno pouzdano za ocenu patogenosti *Fusarium* spp. zbog variranja brojnih činilaca u interakciji patogen–biljka domaćin–spoljašnja sredina (Lević, 2008). Rezultati dobijeni dvogodišnjim ispitivanjima u okviru ove disertacije pokazali su da je zbog značajnih razlika u reakciji dve gajene forme sirka, bilo moguće napraviti istovetnu gradaciju i vrednovanje sorti i hibrida na osnovu njihove osetljivosti. Sa druge strane, *Fusarium* spp. se u prirodi najčešće nalaze u vidu kompleksa od više vrsta i verovatno kao takve učestvuju u patološkim procesima prouzrokujući mešane infekcije. Na ovaj način, ispitivanja koja su prethodno obezbedila određivanje prisustva prevalentnih vrsta u nekom polju a potom veštačke inokulacije istim vrstama u drugom neinfestiranom polju, kako je to urađeno u okviru ove disertacije, dala su stvarne podatke o nivou osetljivosti genotipova sirka. Tome u prilog govori i slična reakcija svih ispitivanih genotipova i isto grupisanje bez obzira na to da li su zaraze bile veštačke ili prirodne, i to u obe godine ispitivanja. Sorte sirka metlaša 'Prima' i 'Reform' bile su osetljivije bez obzira na metodu, čak su bili osetljiviji i na sama mehanička oštećenja što po svemu sudeći može da predstavlja osnovu njihove osetljivosti. U zavisnosti od metode ocenjivanja intenziteta zaraze *Fusarium* spp. u uslovima prirodne zaraze, svi genotipovi su se različito grupisali, mada se ocena preseka stabla pokazala kao bolja i pouzdanija metoda, jer su simptomi nekroze bili vidljivi i intenzivniji tek na uzdužnom preseku stabla.

Rezultati ovih ispitivanja ukazali su na postojanje različitih vidova osetljivosti komercijalnih sorti i oplemenjivačkog materijala prema prevalentnim *Fusarium* spp., koji će se dalje koristiti u programima oplemenjivanja gajenog sirka na otpornost prema ovim patogenima. Od naročitog značaja je i uporedno ispitivanje osetljivosti genotipova u uslovima veštačke inokulacije i prirodne zaraze, kao i u eksperimentalnim uslovima, u stakleniku, čime su dobijeni realni podaci o potencijalu ovih genotipova u agroekološkim uslovima Srbije. U svim postavljenim uslovima eksperimenta, najveću osetljivost prema prouzrokovateljima truleži stabla ispoljile su dve sorte sirka metlaša 'Prima' i 'Reform'. Značaj utvrđenih rezultata, odnosno visoke korelacije između nivoa osetljivosti genotipova u poljskim, odnosno kontrolisanim uslovima, ogleda se u

mogućnosti bržeg oplemenjivačkog rada, čiji je važan deo ocenjivanje reakcije genetičkog materijala prema *Fusarium* spp. U uslovima staklenika moguće je još pre početka vegetacije ispitati nivo osetljivosti genotipova i za dalji rad u polju odabrati genotipove koji ispoljavaju otpornost. Takođe buduća istraživanja treba da uključe i vrstu *F. thapsinum* i da se detaljnije ispita njena učestalost i značaj u proizvodnim područjima gajenog sirka, posebno u Vojvodini, i to severni (okolina Kanjiže, Sente i Bačke Topole) i južni rejon (šira okolina Bačkog Petrovca, Selenče i Pivnica).

7. ZAKLJUČAK

Na osnovu obavljenih trogodišnjih istraživanja fuzariozne truleži gajenog sirka u Srbiji i kompleksa gljiva koji je prouzrokuje, rodova *Fusarium* i *Epicoccum*, dobijen je niz značajnih rezultata i izvedeni su sledeći zaključci.

Pregledom useva sirka u četiri različita lokaliteta gajenja u Vojvodini, zabeležena je pojava intenzivnih simptoma fuzariozne truleži korena, prizemnog dela stabla i semena. Procenjena zaraženost pregledanih useva sirka, bila je veoma visoka, a sušenje i brzo propadanje zaraženih biljaka rezultiralo je gubicima od preko 90%. U pregledanim uzorcima semena, ustanovljene su mešane zaraze gljivama iz rodova: *Fusarium*, *Alternaria*, *Epicoccum*, *Aspergillus* i *Penicillium*. Zaraza semena sirka sa *Fusarium* spp. kretala se od 2,3 do 19,7%, u proseku 8,82%. Izolacijom fitopatogenih gljiva iz zaraženih biljaka sirka u polju i iz zaraženog semena, izdvojeno je ukupno 48 izolata *Fusarium* spp. kojima je potvrđena patogenost veštačkim inokulacijama klijanaca sirka.

Tokom izolacije i gajenja kultura *Fusarium* spp. i *Epicoccum* za proveru patogenosti, uočena su izvesna morfološka svojstva na osnovu kojih je izvršeno njihovo grupisanje. Za nastavak istraživanja, odabrano je 13 izolata, 8 izdvojenih iz prizemnog dela stabla sirka i 5 sa semena, koji su međusobno upoređivani u cilju pravilne identifikacije i utvrđivanja njihovog taksonomskog međuodnosa. U ispitivanja su uključena i četiri referentna izolata iz Australije. Odabrani izolati svrstani su u pet morfoloških grupa na osnovu međusobne sličnosti i sličnosti sa standardima. Prvu grupu činio je izolat 286–09 koji je morfološki odgovarao referentnom izolatu *F. equiseti* (RBG851). Izolati 297a–09, 13–10, 521–10, 522–10 i 530–10 formirali su drugu grupu koja je ispoljila sličnost sa referentnim izolatom (RBG5349) identifikovanim kao *F. proliferatum*. Treću grupu činili su izolati 532–10, 535–10 i 536–10 koji su ispoljili sličnost sa morfološkim svojstvima navedenim u literaturi za vrstu *F. graminearum*. izolat 808–11, predstavnik četvrte grupe sličan je referentnom izolatu (RBG5255) koji je identifikovan kao *F. thapsinum*. Izolati 291–09, 315–09 i 539–10 koji su se izdvojili od ostalih proučavanih izolata formirali su petu grupu koja je morfološki, po izgledu i boji kolonija, dovedena u vezu sa izgledom kolonija vrsta *Fusarium* spp.

Testovi patogenosti provereni primenom veštačkih inokulacija klijanaca sirka dve gajene forme, sirka za zrno (hibridi 'Alba' i 'Gold') i sirka metlaša (sorte 'Prima' i 'Reform'), u uslovima staklenika, kao i inokulacijom klijanaca u epruvetama, u *in vitro* uslovima, obavljani su uspešno reprodukcijom simptoma prirodne infekcije.

Proučavana makroskopska i mikroskopska morfološka svojstva odabranih izolata gljiva iz gajenog sirka iz Srbije, a koje pripadaju kompleksu vrsta *Fusarium*, pružile su stabilnu karakteristiku za njihovo razlikovanje. S obzirom da vrste roda *Fusarium* imaju sposobnost da variraju u morfološkim osobinama (oblik i veličina makrokonidija, način obrazovanja mikrokonidija, obrazovanje hlamidospora ili boja kolonija), različite hranljive podloge uključene u istraživanja omogućile su razlikovanje i grupisanje svih odabranih izolata i njihovu identifikaciju do vrste, što je nadalje i potvrđeno molekularnim metodama identifikacije. Tokom ispitivanja morfoloških svojstava, koje je obavljeno *in situ* direktno u kolonijama izolata, kao i na izvornim zaraženim ostacima biljaka sirka, ustanovljeno je i prisustvo tvorevina polnog razmnožavanja, peritecija, koje su se formirale površinski oko osnove inficiranog stabla sirka. Imajući u vidu poznatu varijabilnost, odnosno mogućnost postojanja različitih morfoloških varijanti u okviru pojedinih vrsta roda *Fusarium*, ipak neophodna je oprezna primena morfoloških kriterijuma u taksonomske svrhe.

Reakcijom umnožavanja ciljne DNK patogena, prouzrokovala fuzariozne truleži sirka uz primenu različitih prajmera utvrđena je razlika u specifičnosti i pogodnosti detekcije sekvenci svih pet različitih delova genoma (ITS region, TEF-1 α , β -tubulin, calmodulin i mtSSU rDNK) ispitivanih izolata. Međutim, primenjene PCR reakcije i korišćeni prajmeri uspeli su da dokažu prisustvo nukleinskih kiselina odgovarajućih vrsta i tako su ujedno i potvrdili razlikovanje i formiranje morfoloških grupa unutar ispitivanih *Fusarium* spp.

Molekularna detekcija, sekvencioniranje i filogenetske analize DNK sekvenci odgovarajućih delova genoma pružile su mogućnost da se preciznije proučava razdvajanje vrsta roda *Fusarium*, da se identifikuju nepoznati izolati i da se ustanove međuodnosi između poznatih vrsta. Višestrukim poređenjem sekvenci dobijenih sekvencioniranjem odgovarajućih delova nuklearne i mitohondrijalne DNK, kao i sekvencioniranjem tri proteinska gena (TEF-1 α , β -tubulin, calmodulin) sa dostupnim sekvencama odgovarajućih regiona genoma gljiva u GenBank bazi podataka i

proračunom genetičke sličnosti, obavljena je potvrda identifikacije svih dobijenih sekvenci odabranih izolata sirka. Analizom nukleotidnih sekvenci različitih genoma utvrđeno je da odabrani izolati pripadaju vrstama roda *Fusarium*: *F. equiseti*, *F. proliferatum*, *F. graminearum* i *F. thapsinum*, kao i vrsti iz roda *Epicoccum*: *E. nigrum*. Tokom preliminarnih ispitivanja prisustva i rasprostranjenosti vrsta roda *Fusarium* na gajenom sirku, kao prevalentne na semenu i u usevu sirka u Srbiji izolovane su *F. equiseti* i *F. proliferatum*.

Rekonstrukcijom filogenetskih stabala dat je doprinos u rasvetljavanju evolutivne međupovezanosti različitih izolata i pružilo je uvid u prisustvo i rasprostranjenost vrsta *Fusarium* u našoj zemlji. Uspešna primena protokola za molekularnu identifikaciju vrsta *G. fujikuroi* i *F. graminearum* i *F. equiseti* kompleksa na osnovu sekvenci TEF gena koji kodira translacioni faktor izduživanja 1-alfa, β -tubulina i calmodulina, predstavljaju početak i osnovu proučavanja filogeografske distribucije ovih značajnih vrsta u Srbiji. Dobijeni rezultati predstavljaju uvod u bližu genetičku karakterizaciju, kao i brzo i lako razlikovanje ovih vrsta od morfološki sličnih vrsta iz *G. fujikuroi*, *F. graminearum* i *F. equiseti* kompleksa. Sekvencioniranje većeg broja izolata, uključivanje dodatnih delova genoma, njihovo poređenje i određivanje njihovog međuodnosa i odnosa sa drugim izolatima u svetu doprinosi poznavanju strukture populacije vrsta *G. fujikuroi*, *F. graminearum* i *F. equiseti* kompleksa iz čega jedino i može da proizađe uspešna strategija suzbijanja ovih veoma štetnih patogena.

Rezultati ispitivanja u okviru ove disertacije ukazali su na postojanje različitih vidova osetljivosti komercijalnih sorti i oplemenjivačkog materijala prema prevalentnim vrstama *Fusarium* spp., koji će se dalje koristiti u programima oplemenjivanja gajenog sirka na otpornost prema ovim patogenima. U uslovima postavljenog eksperimenta, može se zaključiti da su najveću otpornost prema *F. equiseti* i *F. proliferatum* ispoljili hibrid 'Alba' i američke linije PI576382 03 SD, PI534163 02 SD, PI595720 02 SD i PI656114 01 SD, zatim hibrid 'Gold' i sorta 'Prima', a najmanju sorta sirka metlaša, 'Reform'. Značaj rezultata dobijenih istraživanjem osetljivosti sirka na *Fusarium* spp., odnosno visoka korelacija između nivoa otpornosti genotipova u poljskim, kao i kontrolisanim uslovima, ogleda se u mogućnosti bržeg oplemenjivačkog rada, čiji je važan deo ocenjivanje reakcije genetičkog materijala prema *Fusarium* spp.

Morfološka i molekularna karakterizacija različitih izolata *Fusarium* kompleksa iz Srbije, obavljena u okviru ove doktorske disertacije, pružila je uvid u prisustvo i rasprostranjenost vrsta *Fusarium* kompleksa u našoj zemlji. Taksonomski kriterijumi, razvijeni molekularni protokoli i potpuno okarakterisani izolati *Fusarium* kompleksa u Srbiji predstavljaju osnovu koja se može primeniti za razlikovanje novih izolata gljiva ovog kompleksa. Takođe, rezultati ovih istraživanja pružili su neke od odgovora o postojanju osetljivosti genotipova prema predominantnim vrstama *Fusarium* spp. u Srbiji, ukazali na najpogodnije metode za ispitivanje osetljivosti, a sve u cilju rešavanja problema u programima selekcije na otpornost prema ovim patogenim vrstama.

8. LITERATURA

- Adejumo, T. O., Hettwer, U., Karlovsky, P. (2007): Survey of maize from south-western Nigeria for zearalenone, α - and β -zearalenols, fumonisin B1 and enniatins produced by *Fusarium* species. *Food Additives & Contaminants*, 24: 993–1000.
- Alvarez, L. C., Somma, S., Moretti, A., Fernandez Pinto, V. (2010): Agressivness of *Fusarium graminearum sensu stricto* isolates in wheat kernels in Argentina. *Journal of Phytopathology*, 158: 173–181.
- Alves dos Reis, T., Zorzete, P., Pozzi, C. R., Nascimento da Silva, V., Ortega, E., Corrêa, B. (2010): Mycoflora and fumonisin contamination in Brazilian sorghum from sowing to harvest. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90: 1445–1451.
- Amatulli, M. T., Spadaro, D., Gullino, M. L., Garibaldi, A. (2010): Molecular identification of *Fusarium* spp. associated with bakanae disease of rice in Italy and assessment of their pathogenicity. *Plant Pathology*, 59: 839–844.
- Andersen, A. L. (1948): The development of *Gibberella zeae* headblight of wheat. *Phytopathology*, 38: 595–611.
- Aoki, T., O'Donnell, K. (1999a): Morphological and molecular characterization of *Fusarium pseudograminearum* sp. nov., formerly recognized as the Group 1 population of *Fusarium graminearum*. *Mycologia*, 91: 597–609.
- Aoki, T., O'Donnell, K. (1999b): Morphological characterization of *Gibberella coronicola* sp. nov., obtained through mating experiments of *Fusarium pseudograminearum*. *Mycoscience*, 40: 443–453.
- Aoki, T., O'Donnell, K., Ichikawa, K. (2001): *Fusarium fractiflexum* sp. nov. and two other species within the *Gibberella fujikuroi* species complex recently discovered in Japan that form aerial conidia in false heads. *Mycoscience*, 42: 461–478.
- Arenal, F., Platas, G., Peláez, F. (2004): Taxonomic reconsideration of *Epicoccum nigrum* and *Phoma epicoccina* based on DNA sequences and morphological observations. *Mycotaxon*, 89: 465–471.
- Backhouse, D., Abubakar, A. A., Burgess, L. W., Dennis, J. I., Hollaway, G. J., Wildermuth, G. B., Wallwork, H., Henry, F. J. (2004): Survey of *Fusarium* species associated with crown rot of wheat and barley in eastern Australia. *Australasian Plant Pathology*, 33: 255–261.
- Backhouse, D., Burgess, L. W. (2002): Climatic analysis of the distribution of *Fusarium graminearum*, *F. pseudograminearum* and *F. culmorum* on cereals in Australia. *Australasian Plant Pathology*, 31: 321–327.

- Backhouse, D., Burgess, L. W., Summerell, B. A. (2001): Bibliography of *Fusarium*. 122–137. Summerell, B. A., Leslie, J. F., Backhouse, D., Bryden, W. L., Burgess, L. W. (eds), *Fusarium*–Paul E. Nelson Memorial Symposium. APS Press, St. Paul, Minnesota, 392.
- Bačvanski, S., Kunc, V., Berenji, J., Makević, S. (1988): Proučavanje hibridnih sirkova za proizvodnju zelene mase. *Savremena poljoprivreda*, 36: 193–288.
- Bagi, F. (2006): Viroze gajenog sirka u Vojvodini. *Bilten za hmelj, sirak i lekovito bilje*, 38: 5–28.
- Bagi, F., Berenji, J., Jasnić, S., Stojšin, V. (2004): Otpornost genotipova sirka metlaša prema virusu mozaične kržljivosti kukuruza. *Pesticidi i fitomedicina*, 19: 167–172.
- Bai, G. H., Shaner, G. E. (1994): Wheat scab: respective and control. *Plant Disease*, 78: 760–766.
- Balaž, F., Berenji, J., Bagi, F. (1997): Reaction of different broomcorn (*Sorghum bicolor* (L.) Moench.) genotypes to stalk rot (*Gibberella fujikuroi* (Sow.) Wollenw). Proceedings of the “10th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, Montpellier – Le Corum (France), 541–545.
- Balaž, F., Berenji, J., Bagi, F., Malešević, S. (1996): Osetljivost različitih genotipova sirka metlaša (*Sorghum bicolor* L.) Moench. prema prouzročivaču truleži stabla (*Gibberella fujikuroi* (Saw.) Wollenw.). Deseti jugoslovenski simpozijum o zaštiti bilja sa međunarodnim učešćem, Budva, 30. septembar – 4. oktobar 1996. *Zbornik rezimea*, 75.
- Bateman, G. L., Kwasna, H., Ward, E. (1996): Relationships among *Fusarium* spp. estimated by comparing restriction fragment length polymorphisms in polymerase chain reaction–amplified nuclear rDNA. *Canadian Journal of Microbiology*, 42: 1232–1240.
- Benson, D. A., Karsch–Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., Wheeler, D. L. (2007): GenBank. *Nucleic Acids Research*, 35: 21–25.
- Berenji, J. (1994): Bioalkohol od sirka i čičoke. *Revija agronomska saznanja*, 4: 19–21.
- Berenji, J. (1993): Mesto sirka za zrno u ratarskoj proizvodnji. *Zbornik radova Instituta za ratarstvo i povrtarstvo Novi Sad*, 21: 427–438.
- Berenji, J. (1996): Dostignuća u oplemenjivanju sirka metlaša i sirka za zrno. *Zbornik radova Instituta za ratarstvo i povrtarstvo Novi Sad*, 25: 435–444.

- Berenji, J. (2000): Broomcorn breeding for disease resistance. Abstracts of the Maize and Sorghum EUCARPIA XVIIth International Conference on Maize and Sorghum Genetics and Breeding at the end of the 20th Century, Belgrade, 62.
- Berenji, J. (2008): Scopaeologija – prošlost, sadašnjost i budućnost metli. Zbornik radova XV Međunarodni kongres poljoprivrednih muzeja, (CIMA XV), Novi Sad–Kulpin, 22–26. septembar, 40–46.
- Berenji, J., Adamović, D., Sikora, V., Sabo, J. (2008): Dostignuća u unapređenju proizvodnje i korišćenja alternativnih kultura u odeljenju za hmelj, sirak i lekovito bilje Instituta za ratarstvo i povrtarstvo. Zbornik radova, Sveska 45: 145–158.
- Berenji, J., Dahlberg, J. (2004): Perspectives of Sorghum in Europe. Journal of Agronomy and Crop Science, 1905: 332–338.
- Berenji, J., Dahlberg, J., Sikora, V. (2004): Sirak za zrno – mogućnost za ublažavanje štetnih posledica suše. Zbornik referata 37. Seminara agronoma Naučnog instituta za ratarstvo i povrtarstvo Novi Sad, 151–158.
- Berenji, J., Dahlberg, J., Sikora, V., Latković, D. (2011): Origin, History, Morphology, Production, Improvement, and Utilization of Broomcorn [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] in Serbia. Economic Botany, 65: 190–208.
- Berenji, J., Kišgeci, J. (1996): Broomcorn—classical example of industrial use of sorghum. 1 European seminar on sorghum for energy and industry, Toulouse, 43–48.
- Berenji, J., Kunc, V. (1995): Prinos i kvalitet sirka za zrno. Zbornik radova Instituta za ratarstvo i povrtarstvo Novi Sad, 23: 309–318.
- Berenji, J., Mijavec, A. (1992): Sirkovi. Bilten za hmelj, sirak i lekovito bilje 23/24: 53–65.
- Berenji, J., Mijavec, A., Kišgeci, J. (1987): Broomcorn (*Sorghum bicolor* (L.) Moench.) breeding in Yugoslavia. Proceedings of the 16th Conference of the EUCARPIA Maize and Sorghum Section, Nitra.
- Berenji, J., Mijavec, A., Tošić, M. (1993): Broomcorn breeding for MDMV and anthracnose resistance. 16th Conference of EUCARPIA Maize and Sorghum Section, Bergamo.
- Berenji, J., Sikora, V. (2004): Perspektive proizvodnje sirka za zrno kod nas. Acta Agriculturae Serbica, 9: 501–507.
- Berenji, J., Sikora, V. (2006): Dostignuća u oplemenjivanju sirka metlaša. Zbornik radova Instituta za ratarstvo i povrtarstvo Novi Sad, 42: 79–89.

- Bilai, V. I. (1955): Fuzarii. Izd. Akad. Nauk. Ukrain SSR (Published by the Academy of Sciences of the Ukrainian SSR), Kiev, 320.
- Bogo, A., Mantle, P. G. (1999): *Claviceps africana* discovered in India. *Plant Disease*, 83: 79.
- Booth, C. (1971): The Genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 237.
- Bowden, R. L., Leslie, J. F. (1999): Sexual recombination in *Gibberella zeae*. *Phytopathology*, 89: 182–188.
- Brennan, J. M., Egan, D., Cooke, B. M., Doohan, F. M. (2005): Effect of temperature on head blight of wheat caused by *Fusarium culmorum* and *F. graminearum*. *Plant Pathology*, 54: 156–160.
- Burgess, L. W., Backhouse, D., Swan, L. J., Esdaile, R. J. (1996): Control of *Fusarium* crown rot of wheat by late stubble burning and rotation with sorghum. *Australasian Plant Pathology*, 25: 229–233.
- Burgess, L. W., Dodman, R., Mayers, P., Pont, W. (1981): *Fusarium* diseases of wheat, maize and grain sorghum in eastern Australia. In '*Fusarium*: Diseases, Biology and Taxonomy'. (Eds Nelson, P., Toussoun, T., Cook, R.) Pennsylvania State University Press, University Park, 64–76.
- Burgess, L. W., Summerell, B. A. (1992): Mycogeography of *Fusarium*: Survey of *Fusarium* species in subtropical and semi-arid grassland soils from Queensland, Australia. *Mycological Research* 96: 780–784.
- Burgess, L. W., Summerell, B. A., Backhouse, D., Benyon, F., Levic, J. (1997): Biodiversity and population studies in *Fusarium*. *Sydowia*, 48: 1–11.
- Burgess, L. W., Summerell, B. A., Bullock, S., Gott, K. P., Backhouse, D. (1994): *Laboratory Manual for Fusarium Research*, 3rd ed. University of Sydney/Royal Botanic Gardens, Sydney, Australia.
- Burlakoti, R. R., Ali, S., Secor, G. A., Neate, S. M., McMullen, M. P., Adhikari, T. B. (2008): Genetic relationships among populations of *Gibberella zeae* from barley, wheat, potato and sugar beet in upper midwest of United States. *Phytopathology* 98: 969–976.
- Caron, D. (1993): Les Fusarioses, in: Maladies des bles et orges. Institut technique des céréales et des fourrages (ITCF), 30–39.
- Caron, D. (2000): Fusarioses des épis – Sain-on pr 'evoir leur' developpement. *Perspectives Agricoles*, 253: 56–62.

- CAST (2003): Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems. Task Force Report 139, Council for Agricultural Science and Technology, Ames, IA.
- Chambers, K. R. (1988): Effect of time of inoculation on *Diplodia* stalk and ear rot of maize in South Africa, *Plant Disease*, 72: 529–531.
- Chehri, K., Salleh, B., Yli-Mattila, T., Reddy, K. R. N., Abbasi, S. (2011): Molecular characterization of pathogenic *Fusarium* species in cucurbit plants from Kermanshah province, Iran. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18: 341–351.
- Chelkowski, J. (1998): Distribution of *Fusarium* species and their mycotoxins in cereals grains. In: Sinha KK, Bathnagar D (eds), *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*, New York, NY, Dekker, 45–64.
- Cheng, Z., Tang, W., Su, Z., Cai, Y., Sun, S., Chen, Q., Wang, F., Lin, Y., She, Z., Vrijmoed, L. L. P. (2008): Identification of mangrove endophytic fungus 1403 (*Fusarium proliferatum*) based on morphological and molecular evidence. *Journal of Forestry Research*, 19: 219–224.
- Chongo, G., Gossen, B. D., Kutcher, H. R., Gilbert, J., Turkington, T. K., Fernandez, M. R., McLaren, D. (2001): Reaction of seedling roots of 14 crop species to *Fusarium graminearum* from wheat heads. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 23: 132–137.
- Chung, W. –H., Ishii, H., Nishimura, K., Ohshima, M., Iwama, T., Yoshimatsu, H. (2008): Genetic analysis and PCR-based identification of major *Fusarium* species causing head blight on wheat in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 74: 364–374.
- Clark, J. W., Miller, F. R., Creelman, R. (1980): Utilisation of grain sorghum biomass for energy. *Sorghum Newsletter*, 23: 44–45.
- Čobić, T., Kunc, V., Berenji, J. (1987): Ispitivanje hemijskog sastava i hranljive vrednosti zrna sirka nemenjenog za ishranu preživara. *Savremena poljoprivreda*, 35: 361–368.
- Conab (Companhia Nacional de Abastecimento), *Quarto Levantamento de Avaliação da Safra 2006/2007*. [Online]. Available: <http://www.conab.gov.br/conab-web/index.pdf> [30 September 2009].
- Conner, R. L., Hwang, S. F., Stevens, R. R. (1996): *Fusarium proliferatum*: a new causal agent of black point in wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 18: 419–423.
- Cumagun, C. J. R., Rabenstein, F., Miedaner, T. (2004): Genetic variation and covariation for aggressiveness deoxynivalenol production and fungal colonization among progeny of *Gibberella zeae* in wheat. *Plant Pathology*, 53: 446–453.

- Cunnington, J. H., Takamatsu, S., Lawrie, A. C., Pascoe, I. G. (2003): Molecular identification of anamorphic powdery mildews (Erysiphales). *Australasian Plant Pathology*, 32: 421–428.
- da Silva, J. B., Pozzi, C. R., Mallozzi, M. A. B., Ortega, E. M., Corrêa, B. (2000): Mycoflora and occurrence of aflatoxin B1 and fumonisin B1 during storage of Brazilian sorghum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 4352–4356.
- Dahlberg, J. A. (2000): Classification and characterization of sorghum. In: Smith, C. W. and Frederiksen, R. A. (eds), *Sorghum: Origin, History, Technology, and Production*. John Wiley & Sons Inc., New York, 99–130.
- Dahlberg, J. A., Wolfrum, E., Bean, B., Rooney, L. (2011a): Compositional and agronomic evaluation of sorghum biomass as a potential feedstock for renewable fuels. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, 5: 507–513.
- Dahlberg, J., Berenji, J., Sikora, V., Latković, D. (2011b): Assessing sorghum [*Sorghum bicolor* (L) Moench] germplasm for new traits: food, fuels & unique uses. *Maydica*, 56: 165–172.
- Dawson, W. A. J. M., Bateman, G. L. (2001): Fungal communities on roots of wheat and barley and effects of seed treatments containing fluquinconazole applied to control take-all. *Plant Pathology*, 50: 5–82.
- Day, J. P., Shattock, R. C. (1997): Agressiveness and other factors relating to displacement of population of *Phytophthora infestans* in England and Wales. *European Journal of Plant Pathology*, 103: 379–391.
- De Nijs, M., Van Egmond, H. P., Rombouts, F. M., Notermans, S. H. W. (1997): Identification of hazardous *Fusarium* secondary metabolites occurring in food raw materials. *Journal of Food Safety*, 17: 161–191.
- de Wet, J. M. J. (1978): Systematics and evolution of sorghum Sect. Sorghum (Gramineae). *American Journal of Botany*, 65: 477–484.
- de Wet, J. M. J., Huckabay, J. P. (1967): The origin of Sorghum bicolor. II. Distribution and domestication. *Evolution*, 21: 787–802.
- Desjardins, A. E. (2006): *Fusarium Mycotoxins: Chemistry, Genetics, and Biology*. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Desjardins, A. E., Busman, M., Muhitch, M. J., Proctor, R. (2007): Complementary host–pathogen genetic analyses of the role of fumonisins in the *Zea mays*–*Gibberella moniliformis* seedling interaction. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 70: 149–160.

- Dhingra, O. D., Sinclair, J. B. (1986): Basic Plant Pathology Methods. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, USA, 1–355.
- Dickson, J. G., Mains, E. B. (1929): Scab of wheat and barley and its control. USDA Farmers' Bulletin 1599, 1–18.
- Dill–Macky, R., Jones, R. K. (2000): The effect of previous crop residues and tillage on fusarium head blight of wheat. *Plant Disease*, 84: 71–76.
- Doggett, H. (1988): Sorghum. Second edition. Longman Scientific & Technical, 344.
- Dugan, F. M., Hellier, B. C., Lupien, S. L. (2003): First report of *Fusarium proliferatum* causing rot of garlic bulbs in North America. *Plant Pathology*, 52: 426.
- Dugan, F. M., Hellier, B. C., Lupien, S. L. (2007): Pathogenic fungi in garlic seed cloves from the United States and China, and efficacy of fungicides against pathogens in garlic germplasm in Washington State. *Journal of phytopathology*, 155: 437–445.
- Duncan, D. B. (1955): Multiple–rang and multiple F test. *Biometrics*, 11: 1–42.
- Edel, V., Steinberg, C., Gautheron, N., Alabouvette, C. (1997): Evaluation of restriction analysis of polymerase chain reaction (PCR) –amplified ribosomal DNA for the identification of *Fusarium* species. *Mycological Research*, 101: 179–187.
- Edel, V., Steinberg, C., Gautheron, N., Recorbet, G., Alabouvette, C. (2001): Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* populations isolated from different soils in France. *FEMS Microbiology Ecology*, 36: 61–71.
- El–Hassan, K. I., El–Saman, M. G., Mosa, A. A., Mostafa, M. H. (2004): Interaction between non–pathogenic *Fusarium* isolates and *Fusarium* species causing dry rot of potato tubers. *Annals of Agricultural Science*, 49: 759–771.
- Elmer, W. H. (1996): Fusarium fruit rot of pumpkin in Connecticut. *Plant Disease*, 80: 131–135.
- Elmer, W. H., Summerell, B. A., Burgess, L. W., Backhouse, D., Abubaker, A. A. (1997): *Fusarium* species associated with asparagus crowns and soil in Australia and New Zealand, Australas. *Plant Pathology*, 26: 255–261.
- Erpelding, J. E., Prom, L. (2006): Seed mycoflora for grain mold from natural infection in sorghum germplasm grown at Isabela, Puerto Rico and their association with kernel weight and germination. *Plant Pathology Journal*, 5: 106–112.
- Fakhrunnisa, M. H. H., Ghaffar, A. (2006): Seed–borne mycoflora of wheat, sorghum and barley. *Pakistan Journal of Botany*, 38: 185–192.

- FAO (2004): Production year book, vol 58. FAO Statistical Series, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Fávaro, L. C. dL., de Melo, F. L., Aguilar–Vildoso, C. I., Araújo, W. L. (2011): Polyphasic Analysis of intraspecific Diversity in *Epicoccum nigrum* Warrants Reclassification into Separate Species. PLoS ONE 6 (8): e14828. doi:10.1371/journal.pone.0014828
- Fernando, W. G. D., Miller, J. D., Seaman, W. L., Seifert, K., Paulitz, T. C. (2000): Daily and seasonal dynamics of airborne spores of *Fusarium graminearum* and other *Fusarium* species sampled over wheat fields. Canadian Journal of Botany, 78: 497–505.
- Fisher, N. L., Burgess, L. W., Toussoun, T. A. and Nelson, P. E. (1982): Carnation leaves as a substrate and for preserving cultures of *Fusarium* species. Phytopathology, 72: 151–153.
- Food and Agricultural Organization of the United Nations (2011): FAOSTAT ProdSTAT, Production Crops. <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor> (accessed June 23, 2011).
- Francis, R. G., Burgess, L.W. (1977): Characteristics of two populations of *Fusarium roseum* ‘Graminearum’ in eastern Australia. Transactions of the British Mycological Society, 68: 421–427.
- Frederiksen, R. A. (1982): Disease problems in Sorghum. In: Sorghum in the eightsies. Proceedings of the International Symposium on Sorghum, 2–7, Nov. 1981, India, Patancheru, 263–271.
- Frederiksen, R. A. (1986): Compendium of Sorghum Diseases. St. Paul, Minnesota, USA: The American Phytopathological Society, Aps Press, 82.
- Frederiksen, R. A., Odvody, G. N. (2000): Compendium of Sorghum Diseases. St. Paul, Minnesota, USA: The American Phytopathological Society, Aps Press, 1–75.
- Gassem, M. A. A. (1999): Study of the micro–organisms associated with the fermented bread (khamir) produced from sorghum in Gizan region, Saudi Arabia. Journal of Applied Microbiology, 86: 221–225.
- Geiser, D. G., Lewis–Ivey, M. L., Hazika, G., Juba, J. H., Miller, S. A. (2005): *Gibberella xylarioides* (anamorph: *Fusarium xylarioides*), a causative agent of coffee wilt disease in Africa, is a previously unidentified member of the *Gibberella fujikuroi* species complex. Mycologia, 97: 191–201.
- Geiser, D. M., Dorner, J.W., Horn, B. W., Taylor, J. W. (2000): The phylogenetics of mycotoxin and sclerotium production in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*. Fungal Genetics and Biology, 31: 169–179.

- Geiser, D. M., Jimenez Gasco, M. M., Kang, S., Mkalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T. J., Zhang, N., Kuldau, G. A., O'Donnell, K. (2004): FUSARIUM-IDv.1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 473–479.
- Geiser, D. M., Juba, J. H., Wang, B., Jeffers, S. N. (2001): *Fusarium hostae* sp nov., a relative of *F. redolens* with a *Gibberella* teleomorph. *Mycologia*, 93: 670–678.
- Gelderblom, W. C. A., Jaskiewicz, K., Marasas, W. F. O., Thiel, P. G., Horak, R. M., Vlegaar, R., Kriek, N. P. J. (1988): Fumonisin – novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Applied and Environmental Microbiology*, 54: 1806–1811.
- Gilbert, J., Conner, R. L., Fernandez, M. R., McLaren, D., Woods, S. M. (2003): Role of spring wheat seed infested with *Fusarium graminearum* in spread and development of fusarium head blight and effects on agronomic performance. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 25: 73–81.
- Gilbert, J., Tekauz, A. (1995): Effects of fusarium head blight and seed treatment on germination, emergence, and seedling vigour of spring wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 17: 252–259.
- Gilbert, J., Tekauz, A. (2000): Review: recent developments in research on fusarium head blight of wheat in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 22: 1–8.
- Gordon, T. R., Storer, A. J., Wood, D. L. (2001): The pitch canker epidemic in California. *Plant Disease*, 85: 1128–1139.
- Goswami, R. S., Kistler, H. C. (2004): Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology*, 5: 515–525.
- Gwary, D. M., Mailafiya, D. M., Jibrin, T. J. (2006): Survival of *Colletotrichum sublineolum* and other seed-borne fungi in sorghum seeds after twenty months of storage. *International Journal of Agriculture and Biology*, 8: 676–679.
- Hooker, A. L. (1957): Factors affecting the spread of *Diplodia zae* in inoculated corn stalks. *Phytopathology*, 47: 196–199.
- Hörberg, H. M. (2002): Patterns of splash dispersed conidia of *Fusarium poae* and *Fusarium culmorum*. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 73–80.
- Inch, S. A., Gilbert, J. (2003): Survival of *Gibberella zae* on Fusarium-damaged kernels of spring wheat. *Plant Disease*, 87: 282–287.
- Inch, S., Fernando, D., Gilbert, J., Tekauz, A. (2000): Temporal aspects of ascospore and macroconidia release by *Gibberella zae* and *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 22: 186.

- Islam, S. M. M., Masum, M. M. I., Fakir, M. G. A. (2009): Prevalence of seed-borne fungi in sorghum of different locations of Bangladesh. *Scientific Research and Essay*, 4: 175–179.
- Ivanović, D., Berenji, J. (1996): Reakcija sirka metlaša (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) na zarazu virusom mozaične kržljivosti kukuruza (MDMV). Deseti Jugoslovenski simpozijum o zaštiti bilja, Budva, 30.09–04.10.1996, Zbornik rezimea, 98.
- Ivanović, M., Ivanović, D. (2001): Mikoze i pseudomikoze biljaka. Poljoprivredni fakultet, Beograd, 1–547.
- Jardine, D. J., Leslie, J. F. (1992): Aggressiveness of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*) isolates to grain sorghum under greenhouse conditions. *Plant Disease*, 76: 897–900.
- Jenkinson, P., Parry, D. W. (1994): Splash dispersal of conidia of *Fusarium culmorum* and *Fusarium avenaceum*. *Mycological Research*, 98: 506–510.
- Jimenez, M., Logrieco, S., Bottalico, A. (1993): Occurrence and pathogenicity of *Fusarium* species in banana fruits. *Journal of Phytopathology*, 137: 214–220.
- Jocković, Đ., Bekavac, G., Purar, B., Nastasić, A., Stojaković, M., Ivanović, M., Latković, D., Boćanski, J. (2008): Oplemenjivanje kukuruza u Institutu za ratarstvo i povrtarstvo danas i sutra. *Zbornik radova Instituta za ratarstvo i povrtarstvo*, 45: 5–13.
- Johnson, N., Kartik, S., Rajasab, A. H. (2008): Occurrence of *Sphacelia sorghi* on grass hosts in Karnataka, India. *Journal of Mycology and Plant Pathology*, 38: 500–503.
- Johnson, N., Rajasab, A. H. (2003): Prevalence of *Claviceps sorghi* on sorghum in Karnataka, India. *International Sorghum and Millets Newsletter*, 44: 93–95.
- Jurado, M., Vázquez, C., Callejas, C., González-Jaén, M. T. (2006): Occurrence and variability of mycotoxigenic *Fusarium* species associated to wheat and maize in the South of Spain. *Mycotoxin Research*, 22: 87–91.
- Kilpatrick, J. A., Chilvers, G. A. (1981): Variation in a natural population of *Epicoccum purpurascens*. *Transactions of the British Mycological Society*, 77: 497–508.
- Kim, Y. -T., Lee, Y. -R., Jin, J., Han, K. -H., Kim, H., Kim, J. -C., Lee, T., Yun, S. H., Lee, Y. -W. (2005): Two different polyketide synthase genes are required for synthesis of zearalenone in *Gibberella zeae*. *Molecular Microbiology*, 58: 1102–1113.
- Kiraly, Z., Klement, Z., Solymosy, F., Voros, J. (1970): *Methods in Plant Pathology*. Ed. By Z. Kiraly, Akademiai Kiado, Budapest, 237–477.

- Kišgeci, J., Berenji, J., Pejin, D., Razmovski, R., Ružić, N. (1988): Bio-alcohol production from sorghum and Jerusalem artichoke. *CNRE Bulletin*, 20: 113–121.
- Kišgeci, J., Mijavec, A., Berenji, J. (1983): Growing sorghum on marginal lands as raw material for the production of fuel alcohol. *CNRE Bulletin*, 2: 26–29.
- Klaasen, J. A., Nelson, P. E. (1996): Identification of a mating population, *Gibberella nygamai* sp. nov., within the *Fusarium nygamai* anamorph. *Mycologia*, 88: 965–969.
- Klittich, C. J. R., Leslie, J. F. (1992): Identification of a second mating population within the *Fusarium moniliforme* anamorph of *Gibberella fujikuroi*. *Mycologia*, 84: 541–547.
- Klittich, C. J. R., Leslie, J. F., Nelson, P. E., Marasas, W. F. O. (1997): *Fusarium thapsinum* (*Gibberella thapsina*): A new species in section *Liseola* from sorghum. *Mycologia*, 89: 643–652.
- Kommedahl, T., Abbas, H. K., Burnes, P. M., Mirocha, C. J. (1988): Prevalence and toxigenicity of *Fusarium* species from soils of Norway near Arctic Circle. *Mycologia*, 80: 790–794.
- Konstantinova, P., Bonants, P. J. M., van Gent–Pelzer, M. P. E., van der Zouwen, P., van den Bulk, R. (2002): Development of specific primers for detection and identification of *Alternaria* spp. in carrot material by PCR and comparison with blotter and plating assays. *Mycological Research*, 106: 23–33.
- Kosiak, E. B., Holst–Jensen, A., Rundberget, T., Gonzalez Jaen, M. T., Torp, M. (2005): Morphological, chemical and molecular differentiation of *Fusarium equiseti* isolated from Norwegian cereals. *International Journal of Food Microbiology*, 99: 195–206.
- Kristensen, R., Torp, M., Kosiak, B., Holst–Jensen, A. (2005): Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation elongation factor 1 alpha gene sequences. *Mycological Research*, 109: 173–186.
- Krnjaja, V., Lević, J., Tomić, Z., Nešić, Z., Stojanović, Lj., Trenkovski, S. (2007): Dynamics of incidence and frequency of populations of *Fusarium* species on stored maize grain. *Biotehnology in Animal Husbandry*, 23: 589–600.
- Kuhlman, E. G. (1982): Varieties of *Gibberella fujikuroi* with anamorphs in *Fusarium* section *Liseola*. *Mycologia*, 74: 759–768.
- Kunc, V., Bačvanski, S., Berenji, J., Čobić, T. (1991): Proizvodnja zelene mase kukuruza, krmnog sirka i sudanske trave u postrnoj setvi. *Savremena poljoprivreda*, 39: 41–44.

- Kvas, M., Marasas, W. F. O., Wingfield, B. D., Wingfield, M. J., Steenkamp, E. T. (2009): Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex. *Fungal Diversity*, 34: 1–21.
- Kwon, S. –I., van Dohlon, C. D., Anderson, A. J. (2001): Gene sequence analysis of an opportunistic wheat pathogen, an isolate of *Fusarium proliferatum*. *Canadian Journal of Botany*, 79: 1115–1121.
- Lacey, J., Bateman, G. L., Mirocha, C. J. (1999): Effects of infection time and moisture on development of ear blight and deoxynivalenol production by *Fusarium* spp. in wheat. *Annals of Applied Biology*, 134: 277–283.
- Lepoint, P. C. E., Munaut, F. T. J., Maraite, H. M. M. (2005): *Gibberella xylarioides* sensu lato from *Coffea canephora*: A new mating population in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 8466–8471.
- Leslie, J. F. (1995): *Gibberella fujikuroi*: available populations and variable traits. *Canadian Journal of Botany*, 73: 282–291.
- Leslie, J. F. (1991): Mating populations in *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section *Liseola*). *Phytopathology*, 81: 1058–60.
- Leslie, J. F., Anderson, L. L., Bowden, R. L. and Lee, Y. W. (2007): Inter- and intra-specific genetic variation in *Fusarium*. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 25–32.
- Leslie, J. F., Doe, F. J., Plattner, R. D., Shackelford, D. D., Jonz, J. (1992): Fumonisin B1 production and vegetative compatibility of strains from *Gibberella fujikuroi* mating population A (*Fusarium moniliforme*). *Mycopathologia*, 117: 37–45.
- Leslie, J. F., Marasas, W. F. O. (2002): Will the real “*Fusarium moniliforme*” please stand up! In ‘Sorghum and Millets Diseases’. (Ed. Leslie, J. F). (Iowa State University Press: Ames, Iowa, USA), 201–209.
- Leslie, J. F., Pearson, C. A. S., Nelson, P. E., Toussoun, T. A. (1990): *Fusarium* species from corn, sorghum, and soybean fields in the central and eastern United States. *Phytopathology*, 80: 343–350.
- Leslie, J. F., Summerell, B. A. (2006): The *Fusarium* Laboratory Manual, 1st edition. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA, 1–369.
- Leslie, J. F., Zeller, K. A., Lamprecht, S. C., Rheeder, J. P., Marasas, W. F. O. (2005): Toxicity, pathogenicity, and genetic differentiation of five species of *Fusarium* from sorghum and millet. *Phytopathology*, 95: 275–283.
- Leslie, J. F., Zeller, K. A., Logrieco, A., Mulè, G., Moretti, A., Ritieni, A. (2004): Species diversity and toxin production by strains in the *Gibberella fujikuroi*

- species complex isolated from native prairie grasses in Kansas. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 2254–2262.
- Leslie, J. F., Zeller, K. A., Summerell, B. A. (2001): Icebergs and species in populations of *Fusarium*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 59: 107–117.
- Lević, J. (2008): Vrste roda *Fusarium* u oblasti poljoprivrede, veterinarske i humane medicine. Cicero, Beograd, 1226.
- Lević, J., Ivanović, D., Stanković, S. (2003): Paraziti kukuruza, sirka i prosa koji se prenose semenom. *Biljni lekar*, 6: 570–577.
- Lević, J., Kovačević, T., Stanković, S., Ivanović, D., Berenji, J. (2006): The first report on *Fusarium thapsinum* on sorghum grains in Serbia. In: Book of Abstracts, European Fusarium Seminar, Wageningen, The Netherlands, 19–22 September, 52.
- Lević, J., Kovačević, T., Vukojević, J., Stanković, S. (2008): Mikrobiota semena sirka. in: Savetovanje o zaštiti bilja (IX), 24–28 novembar, Zlatibor, Zbornik rezimea, 48–49.
- Lević, J., Stanković, S., Bočarov–Stančić, A., Škrinjar, M., Mašić, Z. (2004): The Overview on Toxigenic Fungi and Mycotoxins in Serbia and Montenegro. In: An Overview on toxigenic fungi and mycotoxins in Europe, (Logrieco, A., Visconti, A. eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, 201–218.
- Lević, T. J., Stanković, Ž. S., Krnjaja S. V., Bočarov–Stančić S. A. (2009): *Fusarium* species: The occurrence and the importance in agriculture of Serbia. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, 116: 33–48.
- Lieberman, T. W., Ferry, A. P., Bottone, E. J. (1979): *Fusarium solani* endophthalmitis without primary corneal involvement. *American Journal of Ophthalmology*, 88: 764–767.
- Little, C. R., Magill, C. W. (2004): Colonization of sorghum peduncles by *Fusarium thapsinum* and *Curvularia lunata*: Subsequent pigment accumulation. *International Sorghum and Millets Newsletter*, 45: 28–30.
- Logrieco, A., Moretti, A., Castella, G., Kostecky, M., Golinski, P., Ritieni, A., Chelkowski, J. (1998): Beauvericin production by *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 3084–3088.
- Logrieco, A., Mule, G., Moretti, A., Bottalico, A. (2002): Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 597–609.

- Maciá–Vicente, J. G., Jansson, H. B., Abdullah, S. K., Descals, E., Salinas, J., Lopez–Llorca, L. V. (2008): Fungal root endophytes from natural vegetation in Mediterranean environments with special reference to *Fusarium* spp. *FEMS Microbiology Ecology*, 64: 90–105.
- Mačko, V. (1995): Osetljivost sirka metlaša prema prouzročivaču antraknoze. *Bilten za hmelj, sirak i lekovito bilje*, 27/28: 5–108.
- Mansuetus, A. S. B., Odvody, G. N., Frederiksen, R. A., Leslie, J. F. (1997): Biological species in the *Gibberella fujikuroi* species complex (*Fusarium* section *Liseola*) recovered from sorghum in Tanzania. *Mycological Research*, 101: 815–820.
- Marasas, W. F. O. (2000): *Fusarium* mycotoxins in the third millennium. 42. The 6th European *Fusarium* Seminar and Third COST 835 Workshop of Agriculturally Important Toxigenic Fungi. Berlin, Germany, 11–16 September 2000.
- Marasas, W. F. O., Rheeder, J. P., Lamprecht, S. C., Zeller, K. A., Leslie, J. F. (2001): *Fusarium andiyazi* sp. nov., a new species from sorghum. *Mycologia*, 93: 1203–1210.
- Marín, P., Moretti, A., Ritieni, A., Jurado, M., Vázquez, C., González–Jaén, M. T. (2012): Phylogenetic analyses and toxigenic profiles of *Fusarium equiseti* and *Fusarium acuminatum* isolated from cereals from Southern Europe. *Food Microbiology*, 31: 229–237.
- Marín, S., Ramos, A. J., Vázquez, C., Sanchis, V. (2007): Contamination of pine nuts by fumonisin produced by strains of *Fusarium proliferatum* isolated from *Pinus pinea*. *Letters in Applied Microbiology*, 44: 68–72.
- Martinelli, J., Bocchese, C., Rosewich Gale, L., Xie, W., O'Donnell, K., Kistler, H. C. (2001): Soybean is a host for *Fusarium graminearum* [online]. In 2001 National Fusarium Head Blight Forum Proceedings. 8–10 December 2001, Holiday Inn Cincinnati–Airport, Erlanger, Ky. Compiled by S.M. Canty, J. Lewis, L. Siler, and R. Ward, Michigan State University, East Lansing, Mich. Organized by US Wheat and Barley Scab Initiative. Printed by Kinko's, Okemos, Mich. Available from http://www.scabusa.org/pdfs/forum_01_proc.pdf [accessed October 2004], 136.
- Martinović, M. (1969): *Fusarium roseum* (L.K) Snyder et Hansen – parazit sirka (*Sorghum technicus* Körn). *Poljoprivreda*, 5: 53–59.
- McGee, D.C. (1988): *Maize diseases. A reference source for seed technologists*. St. Paul, Minnesota, USA; APS Press, 149.
- McMullen, M., Jones, R., Gallenberg, D. (1997): Scab of wheat and barley: A reemerging disease of devastating impact. *Plant Disease*, 81: 1340–1348.

- Mesiaen, C. M., Lafon, R., Molot, P. (1959): Necroses de racines, purritures de tiges et verse parasitaire du maïs. *Annals Epiphyties*, 4: 441–471.
- Mijavec, A. (1993): Proučavanje otpornosti genotipova sirka prema virusu mozaične krzljivosti kukuruza. *Bilten za hmelj, sirak i lekovito bilje*, 25/26: 7–111.
- Mijavec, A., Tošić, M., Berenji, J. (1991): Breeding of broomcorn for resistance to MDMV. 6th Conference on virus diseases of Gramineae in Europe, Torino 19.
- Mims, C. W., Richardson, E. A. (2005): Ultrastructure of sporodochium and conidium development in the anamorphic fungus *Epicoccum nigrum*. *Canadian Journal of Botany*, 83: 1354–1363.
- Mirhendi, H., Ghiasian, A., Vismer, H. F., Asgary, M. R., Jalalizand, N., Arendrup, M. C., Makimura, K. (2010): Preliminary Identification and Typing of Pathogenic and Toxigenic *Fusarium* Species Using Restriction Digestion of ITS1–5.8S rDNA–ITS2 Region. *Iranian Journal of Public Health*, 39: 35–44.
- Moretti, A. N. (2009): Taxonomy of *Fusarium* genus, a continuous fight between lumpers and splitters. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, 117: 7–13.
- Mughogho, L. K., Pande, S. (1983): Charcoal rot of sorghum. In L. K. Mughogho and G. Rosenberg, eds. *Sorghum root and stalk rots. A critical review*. Patancheru, India: International Crop Research Institute for the Semi–Arid Tropics, 11–24.
- Mughogho, L. K., Pande, S., (1984): Charcoal rot of sorghum. In: Mughogho, L. K. (Ed.), *Sorghum Root and Stalk Rots: A Critical Review*. Proceedings of the Consultative Group discussion on Research needs and Strategies for Control of Root and Stalk rot Diseases. ICRISAT, Bellagio, Italy/Patancheru, India, 11–24.
- Mulé, G., Susca, A., Stea, G., Moretti, A. (2004): A species-specific PCR assay based on the calmodulin partial gene for identification of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. subglutinans*. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 495–502.
- Muntanola–Cvetković, M. (1987): Opšta mikologija, Niro Književne novine, Beograd, 13–320.
- Muthusubramanian, V., Bandyopadhyay, R., Rajaram Reddy, D., Tooley, P. W. (2006): Cultural characteristics, morphology, and variation within *Claviceps africana* and *C. sorghi* from India. *Mycological Research*, 110: 452–464.
- Nalim, F. A., Elmer, W. H., McGovern, R. J., Geiser, D. M. (2009): Multilocus phylogenetic diversity of *Fusarium avenaceum* pathogenic on lisianthus. *Phytopathology*, 99: 462–468.
- Nastasić, A., Stojaković, M., Jocković, Đ., Bekavac, G., Vasić, N., Petrović, Z. (2001): Ef fect of S1 re cur rent se lec tion on the occurence of stalk, ear and root rot

- (*Fusarium graminearum*) in the synthetic corn population NSB. *Genetika*, 32: 181–188.
- Navi, S. S., Bandyopadhyay, R., Hall, A. J., Bramel–Cox, P. J. (1999): A pictorial guide for the identification of mold fungi on sorghum grain. Information Bulletin no. 59 (In En. Summaries in En, Fr). Patancheru 502 324, Andhra Pradesh, India: International Crops Research Institute for the Semi–Arid Tropics. 118 pp. ISBN 92–9066–416–9. Order code IBE 059.
- Nelson, P. E. (1991): History of *Fusarium* systematics. *Phytopathology*, 81: 1045–1051.
- Nelson, P. E., Toussoun, T. A., Marasas, W. F. O. (1983): *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. The Pennsylvania State Univ., Press, University Park.
- Nirenberg, H. I. (1976): Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der *Fusarium* Sektion *Liseola*. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt Für Land– und Forstwirtschaft (Berlin – Dahlem)*, 169: 1–117.
- Nirenberg, H. I., O'Donnell, K. (1998): New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 90: 434–458.
- Nitschke, E., Nihlgard, M., Varrelmann, M. (2009): Differentiation of eleven *Fusarium* spp. isolated from sugar beet, using restriction fragment analysis of a polymerase chain reaction–amplified translation elongation factor 1 alpha gene fragment. *Phytopathology*, 99: 921–929.
- O'Donnell, K., Cigelnik, E. (1997): Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 7: 103–116.
- O'Donnell, K., Cigelnik, E., Casper, H. H. (1998b): Molecular phylogenetic, morphological, and mycotoxin data support reidentification of the Quorn mycoprotein fungus as *Fusarium venenatum*. *Fungal Genetics and Biology*, 23: 57–67.
- O'Donnell, K., Cigelnik, E., Nirenberg, H. I. (1998a): Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 90: 465–493.
- O'Donnell, K., Kistler, H. C., Cigelnik, E., Ploetz, R. C. (1998c): Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 95: 2044–2049.
- O'Donnell, K., Kistler, H. C., Tacke, B. K., Caspar, H. H. (2000b): Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among

- lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97: 7905–7910.
- O'Donnell, K., Nirenberg, H. I., Aoki, T., Cigelnik, E. (2000a): A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: Detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience*, 41: 61–78.
- O'Donnell, K., Sutton, D. A., Rinaldi, M. G., Gueidan, C., Crous, O. W., Geiser, D. M. (2009): Novel multilocus sequence typing scheme reveals high genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium incarnatum*–*F. equiseti* and *F. chlamydosporum* species complexes within the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 47: 3851–3861.
- O'Donnell, K., Sutton, D. A., Rinaldi, M. G., Sarver, B. A., Balajee, S. A., Schroers, H. J., Summerbell, R. C., Robert, V. A., Crous, P. W., Zhang, N., Aoki, T., Jung, K., Park, J., Lee, Y. H., Kang, S., Park, B., Geiser, D. M. (2010): An internet-accessible DNA sequence database for identifying Fusaria from human and animal infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 48: 3708–3718.
- O'Donnell, K., Ward, T. J., Aberra, D., Kistler, H. C., Aoki T., Orwig, N., Kimura, M., Bjonnstad, A., Klemsdal, S. S. (2008): Multilocus genotyping and molecular phylogenetics resolve a novel head blight pathogen within the *Fusarium graminearum* species complex from Ethiopia. *Fungal Genetics and Biology*, 45: 1514–1522.
- O'Donnell, K., Ward, T. J., Geiser, D. M., Kistler, C. H., Aoki, T. (2004): Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. *Fungal Genetics and Biology*, 41: 600–623.
- O'Donnell, K. (2000): Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca*–*Fusarium solani* species complex. *Mycologia*, 92: 919–938.
- Onyike, N. B. N., Nelson, P. E. (1992): *Fusarium* species associated with sorghum grain from Nigeria, Lesotho and Zimbabwe. *Mycologia*, 84: 452–458.
- Panić, M., Arsenijević, M. (1966): Contribution to the study of *Pseudomonas syringae* van Hall as a parasite of *Sorghum* spp. in Yugoslavia. Prilog proučavnju *Pseudomonas syringae* van Hall kao parazita *Sorghum* spp. u Jugoslaviji. Arhiv za poljoprivredne nauke, Beograd, 64: 151–166.
- Parry, D. W., Pettitt, T. R., Jenkinson, P., Lees, A. K. (1994): The cereal *Fusarium* complex. In: Blakeman, J. P., Williamson, B. (eds) *Ecology of Plant Pathogens* CAB International, Wallingford, U.K., 301–320.
- Parry, D.W., Jenkinson, P., McLeod, L. (1995): *Fusarium* ear blight (scab) in small grains—a review. *Plant Pathology*, 44: 207–238.

- Paulitz, T. C. (1996): Diurnal release of ascospores by *Gibberella zeae* in inoculated wheat plots. *Plant Disease*, 80: 674–678.
- Pažoutová, S., Bogo, A. (2001): Rediscovery of *Claviceps sorghi* (Ascomycotina: Clavicipitaceae) in India. *Mycopathologia*, 153: 99–101.
- Pažoutová, S., Kolínská, R. (2003): Relationship of *Cerebella* to *Epicoccum* and their closest relatives among Dothideales. *Czech Mycology*, 54: 155–160.
- Penčić, V., Lević, J. (1994): Pregled identifikovanih gljiva na semenu i zrnu kukuruza u Jugoslaviji. *Selekcija i semenarstvo*, 1: 173–177.
- Petrović, T., Walsh, J. L., Burgess, L. W., Summerell, B. A. (2009): *Fusarium* species associated with stalk rot of grain sorghum in the northern grain belt of eastern Australia. *Australasian Plant Pathology*, 38: 373–379.
- Pettitt, T., Xu, X., Parry, D. (2003): Association of *Fusarium* species in the wheat stem rot complex. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 769–774.
- Pitt, J. I., Hocking, A. D. (1997): *Fungi and food spoilage*. Second edition, Published by Blackie Academic and Professional. Gjertsen, P., Trolle B., and Anderson, K. (1963). *Journal of the Institute of Brewing*, 291.
- Pitt, J. I., Hocking, A. D. (2009): *Fungy and Food Spoilage*, 3rd Edition. Dordrecht, Springer, 1–519.
- Pitt, J. I., Hocking, A. D., Miscamble, B. F., Dharmaputra, O. S., Kuswanto, K. R., Rahayu, E. S., Sardjono (1998): The mycoflora of food commodities from Indonesia. *Journal of Food Microbiology*, 1: 41–60.
- Porter, J. K., Bacon, C. W., Norred, W. P., Wray, E. M., Kuldau, G. A., Glenn, A. E., Leslie, J. F. (2002): Mycotoxins from fungal–infected sorghum: *Claviceps* vs. *Fusarium* and the *Striga* connection. In J. F. Leslie (ed.), *Sorghum and Millets Pathology*. Iowa State Press, Ames, Iowa, 229–235.
- Porter, J. K., Bacon, C. W., Wray, E. M., Kuldau, G. A., Leslie, J. F. (2000): Fusaric acid (FA), other alkylpyridinecarboxylic acids (APAs), and fumonisin (FB1) by *Fusarium thapsinum* and *F. moniliforme*: GC/MS analysis. In W. J. de Koe, R. A. Samson, H. P. van Egmond, J. Gilbert, and M. Sabino (eds.), *Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millennium*. W. J. de Koe, Wageningen, The Netherlands, 41–47.
- Prom, L. K., Waniska, R. D., Kollo, A. I., Rooney, W. L. (2003): Response of eight sorghum cultivars inoculated with *Fusarium thapsinum*, *Curvularia lunata*, and a mixture of the two fungi. *Crop Protection*, 22: 623–628.

- Purss, G., S. (1969): The relationship between strains of *Fusarium graminearum* Schwabe causing crown rot of various gramineous hosts and stalk rot of maize in Queensland. *Australian Journal of Agricultural Research*, 20: 257–264.
- Purss, G., S. (1971): Pathogenic specialization in *Fusarium graminearum*. *Australian Journal of Agricultural Research*, 22: 553–561.
- Rahjoo, V., Zad, J., Javan–Nikkhah, M., Mirzadi Gohari, A., Okhovvat, S. M., Bihamta, M. R., Razzaghian, J., Klemsdal, S. S. (2008): Morphological and molecular identification of *Fusarium* isolated from maize ears in Iran. *Journal of Plant Pathology*, 90: 463–468.
- Ristić, D., Vučurović, A., Stanković, I., Nikolić, D., Berenji, J., Krstić, B., Bulajić, A. (2011): Molekularna identifikacija izolata *Fusarium graminearum*, patogena sirka u Srbiji. *Ratarstvo i povrtarstvo*, 48: 347–352.
- Rooney, W. L., Smith, C. W. (2000): Techniques for developing new cultivars. In: Smith, C. W., Frederiksen, R. A. (eds), *Sorghum: Origin, History, Technology, and Production*. John Wiley & Sons Inc., New York, 689–729.
- Rossmann, A. Y., Samuels, G. J., Rogerson, C. T., Lowen, R. (1999): Genera of Bionectriaceae, Hypocreaceae, and Nectriaceae (Hypocreales, Ascomycetes). *Studies in Mycology*, 42: 1–248.
- Ryley, M. J., Persley, D. M., Jordan, D. R., Henzell, R. G. (2002): Status of sorghum and pearl millet diseases in Australia. In ‘Sorghum and Millets Diseases’. (Ed. Leslie, J. F.). (Iowa State University Press: Ames, Iowa, USA), 441–448.
- Sampietro, D. A., Marín, P., Iglesias, J., Presello, D. A., Vattuone, M. A., Catalan, C. A. N., Gonzalez Jaen, M. T. (2010): A molecular based strategy for rapid diagnosis of toxigenic *Fusarium* species associated to cereal grains from Argentina. *Fungal Biology*, 114: 74–81.
- Samuels, G. J., Nirenberg, H. I., Seifert, K. A. (2001): Perithecial species of *Fusarium*. In: Summerell, B. A., Leslie, J. F., Backhouse, D., Bryden, W. L., Burgess, L. W. (eds). *Fusarium: Paul E. Nelson memorial symposium*. St. Paul, Minnesota: APS Press, 1–14.
- Sangalang, A. E., Burgess, L. W., Backhouse, D., Duff, J., Wurst, M. (1995): Micogeography of *Fusarium* species in soils from tropic, arid and mediterranean regions of Australia. *Mycological Research*, 99: 523–528.
- Schilling, A. G., Moller, E. M., Geiger, H. H. (1996): Polymerase chain reaction–based assays for species-specific detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, and *F. avenaceum*. *Phytopathology*, 86: 515–522.

- Schmale, D. G., III, Leslie, J. F., Zeller, K. A., Saleh, A. A., Shields, E. J., Bergstrom, G. C. (2006): Genetic structure of Atmospheric populations of *Gibberella zeae*. *Phytopathology* 96: 1021–1026.
- Schmale, D. G., Shah, A. A., Bergstrom, G. C. (2005): Spatial patterns of viable spore depositions of *Gibberella zeae* in wheat fields. *Phytopathology*, 95: 472–479.
- Schmale, D. G., Shields, E. J., Bergstrom, G. C. (2002): Airborne populations of *Gibberella zeae*: spatial and temporal dynamics of spore deposition in a localized fusarium head blight epidemic [online]. In 2002 National Fusarium Head Blight Forum Proceedings. 7–9 December 2002, Holiday Inn Cincinnati Airport, Erlanger, Ky. Compiled by S.M. Canty, J. Lewis, L. Siler, and R. Ward, Michigan State University, East Lansing, Mich. Organized by US Wheat and Barley Scab Initiative. Printed by Kinko's, Okemos, Mich. Available from http://www.scabusa.org/pdfs/forum_02_proc.pdf [accessed October 2004], 178.
- Schol-Schwarz, M. B. (1959): The genus *Epicoccum* Link. *Transactions of the British Mycological Society*, 42: 149–173.
- Scott, J. B., Chakraborty, S. (2006): Multilocus sequence analysis of *Fusarium pseudograminearum* reveals a single phylogenetic species. *Mycological Research*, 110: 1413–1425.
- Seefelder, W., Gossmann, M., Humpf, H. U. (2002): Analysis of fumonisin B1 in *Fusarium proliferatum*-infected asparagus spears and garlic bulbs from Germany by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 2778–2781.
- Seifert, K. A. (1995): Notes on the typification of *Gibberella zeae*. *Sydowia*, 48: 83–89.
- Seifert, K. A., Lévesque, C. A. (2004): Phylogeny and molecular diagnosis of mycotoxigenic fungi. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 449–471.
- Shukla, A., Sharma, R. L. (2000): Incidence of soft rot of bell pepper in Himachal Pradesh. *Journal of Mycology and Plant Pathology*, 30:107–109.
- Sikora, V. (2005): Varijabilnost germplazme sirka metlaša. *Bilten za hmelj, sirak i lekovito bilje*, 37: 6–99.
- Sikora, V. (2006): Varijabilnost germplazme sirka metlaša. *Bilten za hmelj, sirak i lekovito bilje* 38: 6–105.
- Sikora, V., Berenji, J. (2005): Perspektiva gajenja sirka za zrno u nas. *Zbornik radova Instituta za ratarstvo i povrtarstvo Novi Sad*, 41: 451–458.

- Sikora, V., Berenji, J. (2006): Variability in germplasm of broomcorn. XX International Conference of the EUCARPIA Maize and sorghum section, Budapest, Hungary, 119.
- Sikora, V., Berenji, J. (2007): Formiranje jezgra kolekcije sirka metlaša. Bilten za hmelj, sirak i lekovito bilje 39: 5–15.
- Sikora, V., Berenji, J. (2010): Razvoj sortimenta sirka metlaša u Institutu za ratarstvo i povrtarstvo Novi Sad. Ratarstvo i Povrtarstvo / Field and Vegetable Crops Research, 47: 363–369.
- Sikora, V., Berenji, J. (2011): Sirak za zrno i sirak metlaš kao alternativne kulture. Zbornik referata, 45 Savetovanje agronoma Srbije, 30.01–05.02.2011. Zlatibor, 171–180.
- Singh, K., Frisvad, J. C., Thrane, U., Mather, S. B. (1991): An Illustrated Manual on Identification of Some Seed-borne *Aspergillus*, *Fusaria*, *Penicillium* and their mycotoxins. Jordbugsforlaget Frederiksberg, Denmark, 133.
- Singh, S. D., Navi, S. S. (2001): An in vitro screening technique for the identification of grain mold resistance in sorghum. Indian Phytopathology, 54: 35–39.
- Stanković, S., Lević, J., Petrović, T., Logrieco, A., Moretti, A. (2007): Pathogenicity and mycotoxin production by *Fusarium proliferatum* isolated from onion and garlic in Serbia. European Journal of Plant Pathology, 118: 165–172.
- Stanković, S., Lević, J., Tančić, S., Kovačević, T., Bočarov–Stančić, A. (2006): Učestalost toksikogenih vrsta roda *Fusarium* i fuzariotoksina u zrnu pšenice. Zbornik rezimea III simpozijuma o zaštiti bilja u BiH, Neum, BiH, 64–65.
- Starčević, Lj., Berenji, J. (1994): Mesto i uloga prosolikih žita u proizvodnji hrane. Savremena poljoprivreda, 42: 7–11.
- Starkey, D. E., Ward, T. J., Aoki, T., Gale, L. R., Kistler, C. H., Geiser, D. M., Suga, H., Toth, Beata, Varga, J., O'Donnell, K. (2007): Global molecular surveillance reveals novel *Fusarium* head blight species and trichothecene toxin diversity. Fungal genetics and biology, 44: 1191–1204.
- Steenkamp, E. T., Wingfield, B. D., Coutinho, T. A., Wingfield, M. J., Marasas, W. F. O. (1999): Differentiation of *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* by histone gene sequence data. Applied and Environmental Microbiology, 65: 3401–3406.
- Steenkamp, E. T., Wingfield, B. D., Coutinho, T. A., Zeller, K. A., Wingfield, M. J., Marasas, W. F. O., Leslie, J. F. (2000): PCR-based identification of MAT–1 and MAT–2 in the *Gibberella fujikuroi* species complex. Applied and Environmental Microbiology, 66: 4378–4382.

- Stepień, L., Gromadzka, K., Chełkowski, J. (2012): Polymorphism of mycotoxin biosynthetic genes among *Fusarium equiseti* isolates from Italy and Poland. *Journal of Applied Genetics*, 53: 227–236.
- Summerell, B. A., Leslie, J. F. (2011): Fifty years of *Fusarium*: how were 9 species ever enough? *Fungal Diversity*, 50: 135–144.
- Summerell, B. A., Salleh, B., Leslie, J. F. (2003): A utilitarian approach to *Fusarium* identification. *Plant Disease*, 87: 117–128.
- Sutton, J. (1982): Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 4: 195–209.
- Takamatsu, S., Kano, Y. (2001): PCR primers useful for nucleotide sequencing of rDNA of the powdery mildew fungi. *Mycoscience*, 42: 135–139.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011): MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731–2739.
- Tančić, S., Stanković, S., Lević, J. (2009): Varijabilnost patogenih svojstava *Fusarium* spp. poreklom iz zrna kukuruza i pšenice. *Pesticidi i fitomedicina*, 24: 259–269.
- Taylor, J. W., Jacobson, D. J., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, D. M., Hibbett, D. S., Fisher, M. C. (2000): Phylogenetic species recognition and species concepts in Fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 31: 21–31.
- Tesso, T., Claflin, L. E., Tuinstra, M. R. (2004): Estimation of combining ability for resistance to *Fusarium* stalk rot in grain sorghum. *Crop Science*, 44: 1195–1199.
- Tesso, T., Ochanda, N., Little, C. R., Claflin, L. E., Tuinstra, M. R. (2010): Analysis of host plant resistance to multiple *Fusarium* species associated with stalk rot disease in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Field Crops Research*, 118: 177–182.
- Thompson, J., Higgins, D., Gibson, T. (1994): ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673–4690.
- Toit, L. J., Inglis, D. A., Pelter, G. Q. (2003): *Fusarium proliferatum* pathogenic on onion bulbs in Washington. *Plant Disease*, 87: 750.
- Toler, R. W. (1985): Maize dwarf mosaic, the most important virus disease of sorghum. *Plant Disease*, 69: 1011–1015.

- Toler, R. W., Giorda, L. M. (1992): Detection and identification of viruses and virus diseases of sorghum. In: Sorghum and millets diseases, a second world review. Ed.: de Milliano, W. A. J., Frederiksen, R. A. and Bengston, G. D. ICRISAT, Patancheru, Andhra Pradesh, India, 153–159.
- Tooley, P. W., Bandyopadhyay, R., Carras, M. M., Pažoutová, S. (2006): Analysis of *Claviceps africana* and *C. sorgi* from India using AFLPs, EF-1a gene intron 4, and b-tubulin gene intron 3. *Mycological Research*, 110: 441–451.
- Tooley, P. W., Carras, M. M., Sechler, A., Rajasab, A. H. (2010): Real-time PCR Detection of Sorghum Ergot Pathogens *Claviceps africana*, *Claviceps sorghi* and *Claviceps sorghicola*. *Journal of Phytopathology*, 158: 698–704.
- Trail, F., Xu, H., Loranger, R., Gadoury, D. (2002): Physiological and environmental aspects of ascospore discharge in *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*). *Mycologia*, 94: 181–189.
- Tripathi, M. N., Shukla, D. N., Dwivedi, B. K. (1999): Effect of aqueous extracts of leaves of some medicinal plants on spore germination of *Fusarium* spp. *Bioved*, 10: 43–44.
- Tschanz, A. T., Horst, R. K., Nelson, P. E. (1976): The effect of environment on sexual reproduction of *Gibberella zeae*. *Mycologia*, 68: 327–340.
- Tsukiboshi, T., Shimanuki, T., Uematsu, T. (1999): *Claviceps sorghicola* sp. nov., a destructive ergot pathogen of sorghum in Japan. *Mycological Research*, 103: 1403–1408.
- Tuite, J. (1969): Plant pathological methods. Fungi and Bacteria. Burgess Publishing Company, Minneapolis, MN, 239.
- United States Department of Agriculture National Agricultural Statistics Service (2011): USDA–NASS Quick Stats. <http://quickstats.nass.usda.gov/> (accessed June 23, 2011).
- USDA (2009): United States Department of Agriculture), World Agricultural Production. Available:<http://ffas.usda.gov/wap/circular/2008/08-09/toc.asp> [30 September 2009].
- Vesonder, R. F., Golinski, P. (1989): Metabolites of *Fusarium*. 1–39. Chelkowski, J. (ed.), *Fusarium – Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity*. Elsevier, Amsterdam–Oxford–New York–Tokyo, 492.
- Vilmoš, M. (1991): Osetljivost sirka *Sorghum bicolor* (L.) Moench. prema prouzročivaču antraknoze *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Doktorska disertacija. Univerzitet, Novi Sad.

- Vogelgsiang, S., Widmer, F., Jenny, E., Enkerli, J. (2009): Characterization of novel *Fusarium graminearum* microsatellite markers in different *Fusarium* species from various countries. *European Journal of Plant Pathology*, 123: 477–482.
- Waalwijk, C., de Koning, J. R. A., Baayen, R. P., Gams, W. (1996): Discordant groupings of *Fusarium* spp. from *Elegans*, *Liseola* and *Dlaminia* based on ribosomal ITS1 and ITS2 sequences. *Mycologia*, 88: 361–368.
- Waalwijk, C., Kastelein, P., de Vries, I., Kerenyi, Z., van der Lee, T., Hesselink, T., Kohl, J., Kema, G. (2003): Major changes in *Fusarium* spp. in wheat in the Netherlands. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 743–754.
- Walsh, J. L., Laurence, M. H., Liew, E. C. Y., Sangalang, A. E., Burgess, L. W., Summerell, B. A., Petrovic, T. (2010): *Fusarium*: two endophytic novel species from tropical grasses of northern Australia. *Fungal Diversity*, 44: 149–159.
- Wang, Y., Guo, L. D. (2004): Morphological and molecular identification of an endophytic fungus *Epicoccum nigrum*. *Mycosystema*, 23: 474–479.
- Ward, T. J., Bielawski, J. P., Kistler, H. C., Sullivan, E., O'Donnell, K. (2002): Ancestral polymorphism and adaptive evolution in the trichothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic *Fusarium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 9278–9283.
- White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S., Taylor, J. (1990): Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. *In: PCR Protocols: A guide to methods and application*. Eds., Innis, M. A., Gelfrand, D. H., Sninsky, J. J. and White, T. J. Academic Press, San Diego, California, 315–322.
- Windels, C. E. (1992): *Fusarium*. In *Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi*. Singleton, L. L., Mihail, J. D., Rush, C. M. (eds.) APS Press, St. Paul, MN. 115–128.
- Windels, C. E. (2000): Economic and social impacts of *Fusarium* head blight: Changing farms and rural communities in the northern Great Plains. *Phytopathology*, 90: 17–21.
- Wiśniewska, H., Perkowski, J., Kaczmarek, Z. (2004): Scab response and deoxynivalenol accumulation in spring wheat kernels of different geographical origins following inoculation with *Fusarium culmorum*. *Journal of Phytopathology*, 152: 613–621.
- Wollenweber, H. W., Reinking, O. A. (1935): *Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung*. Berlin: Paul Parey, 355.
- Worker, G. F., Marble, V. L. (1968): Comparisons of growth stages of sorghum forage types as to yield and chemical compositions. *Agronomy Journal*, 60: 669.

- Yassin, M. A., El-Samawaty, A. R., Bahkali, A., Moslem, M., Abd-Elsalam, K. A., Hyde, K. D. (2010): Mycotoxin-producing fungi occurring in sorghum grains from Saudi Arabia. *Fungal Diversity*, 44: 45–52.
- Yli-Mattila, T., Gagkaeva, T., Ward, J. T., Aoki, T., Kistler, H. C., O'Donnell, K. (2009): A novel Asian clade within the *Fusarium graminearum* species complex includes a newly discovered cereal head blight pathogen from the Russian Far East. *Mycologia*, 101: 841–852.
- Yli-Mattila, T., Paavanen-Huhtala, S., Parikka, P., Konstantinova, P., Gagkaeva, T. (2004): Molecular and morphological diversity of *Fusarium* species in Finland and northwestern Russia. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 573–585.
- Zapater, R. C., Arrechea, A. (1975): Mycotic keratitis by *Fusarium*. A review and report two cases. *Ophthalmologica*, 170: 1–12.
- Zeller, K. A., Bowden, R. L., Leslie, J. F. (2004): Population differentiation and recombination in wheat scab populations of *Gibberella zeae* from United States. *Molecular Ecology*, 13: 563–571.
- Zeller, K. A., Geiser, D. M. (2003): Molecular identification of *Fusarium*. KSU Laboratory Workshop on *Fusarium*, Kansas State University Manhattan, KS, USA, June 22–27.
- Zeller, K. A., Summerell, B. A., Bullock, S., Leslie, J. F. (2003): *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium konzum*) sp. nov. from prairie grasses, a new species in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 95: 943–954.

BIOGRAFIJA

Ristić Danijela rođena je 15. avgusta 1977. godine u Trsteniku. Osnovnu školu završila je u Medveđi, a Hemijsko–tehnološku školu u Kruševcu. Poljoprivredni fakultet, Odsek za zaštitu bilja i prehrambenih proizvoda, Univerziteta u Beogradu završila je 2004. godine. Odbranila je diplomski rad pod nazivom: „Efikasnost novijih fungicida u suzbijanju *Uncinula necator* (Schw.) Burr., prouzrokovača pepelnice vinove loze”.

Poslediplomske studije na istom fakultetu, na grupi Fitopatologija, upisala je 2005/06, a magistarski rad pod nazivom: „Proučavanje kompleksa čađave mrljavosti i tačkaste zonalne pegavosti plodova jabuke u Srbiji”, odbranila je 2009. godine.

Na Institutu za zaštitu bilja i životnu sredinu u Beogradu 16.03.2012. izabrana je u zvanje istraživač–saradnik. Član je Društva za zaštitu bilja Srbije, Srpskog mikrobiološkog društva i Društva virusologa Srbije.

Do sada je objavila i saopštila ukupno 40 naučnih radova, od čega 12 objavljenih u međunarodnim časopisima, 8 u nacionalnim časopisima, 19 saopštenih na međunarodnim i domaćim skupovima, a jedan literaturni navod je magistarski rad.

Prilog 1.

Sekvence ITS regiona rDNK, proteinskih gena (TEF-1 α , β -tubulin i calmodulin) i mtSSU rDNK vrsta kompleksa *G. fujikuroi* korišćene za filogenetske analize

Vrsta	Domaćin	Poreklo	Kolekcija ^a	GenBank pristupni broj ^b				
				ITS	TEF-1 α	β -tubulin	calmodulin	mtSSU
<i>F. acutatum</i>	/	Indija	NRRL 13308	¹ U34573	³ AF160276	² U34431	³ AF158329	² U34515
<i>F. anthophilum</i>	<i>Hippeastrum</i> sp.	Nemačka	NRRL 13602	² U61671	³ AF160292	² U61541	³ AF158345	² U61593
<i>F. bactridioides</i>	<i>Cronartium conigenum</i>	SAD	NRRL 20476	¹ U34576	³ AF160290	² U34434	³ AF158343	² U34518
<i>F. begoniae</i>	<i>Begonia elatior</i>	Nemačka	NRRL 25300	² U61673	³ AF160293	² U61543	³ AF158346	² U61595
<i>F. brevicatenulatum</i>	<i>Striga asiatica</i>	Madagaskar	NRRL 25446	² U61675	³ AF160265	² U61545	³ AF158318	² U61597
<i>F. bulbicola</i>	<i>Nerine bowdenii</i>	Holandija	NRRL 13618	² U61676	³ AF160294	² U61546	³ AF158347	² U61598
<i>F. circinatum</i>	<i>Pinus radiata</i>	SAD	NRRL 25331	² U61677	³ AF160295	² U61547	² AF158348	² U61599
<i>F. concentricum</i>	<i>Musa sapientium</i>	Kostarika	NRRL 25181	² U61678	³ AF160282	² U61548	³ AF158335	² U61600
<i>F. denticulatum</i>	<i>Ipomoea batatas</i>	SAD	NRRL 25302	² U61680	³ AF160269	² U61550	³ AF158322	² U61602
<i>F. dlamini</i>	<i>Zea mays</i>	Južna Afrika	NRRL 13164	¹ U34572	³ AF160277	² U34430	/	² U34514
<i>F. fujikuroi</i>	<i>Oryza sativa</i>	Tajvan	NRRL 13566	¹ U34557	³ AF160279	² U34415	³ AF158332	² U34499
<i>F. guttiforme</i>	<i>Ananas comosus</i>	Engleska	NRRL 22945	¹ U34562	³ AF160297	² U34420	³ AF158350	² U34504
<i>F. globosum</i>	<i>Zea mays</i>	Južna Afrika	NRRL 26131	/	³ AF160285	² U61557	³ AF158338	² U61609
<i>F. inflexum</i>	<i>Vicia faba</i>	Nemačka	NRRL 20433	¹ U34577	³ AF008479	² U34435	³ AF158366	² U34519
<i>F. lactis</i>	<i>Ficus carica</i>	SAD	NRRL 25200	² U61681	³ AF160272	² U61551	³ AF158325	² U61603
<i>F. napiforme</i>	<i>Pennisetum typhoides</i>	Južna Afrika	NRRL 13604	¹ U34570	³ AF160266	² U34428	³ AF158319	² U34512
<i>F. nygamai</i>	<i>Sorghum bicolor</i>	Australija	NRRL 13488	¹ U34568	³ AF160273	² U34426	³ AF158326	² U34510
<i>F. oxysporum</i>	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	SAD	NRRL 22902	¹ U34566	³ AF160312	² U34424	³ AF158365	² U34508
<i>F. phyllophilum</i>	<i>Dracaena deremensis</i>	Italija	NRRL 13617	¹ U34574	³ AF160274	² U34432	³ AF158327	² U34516
<i>F. proliferatum</i>	<i>Cattleya</i> sp.	Nemačka	NRRL 22944	¹ U34558	³ AF160280	² U34416	³ AF158333	² U34500
<i>F. pseudoanthophilum</i>	<i>Z. mays</i>	Zimbabve	NRRL 25206	² U61683	³ AF160264	² U61553	/	² U61605
<i>F. pseudocircinatum</i>	<i>Solanum</i> sp.	Gana	NRRL 22946	¹ U34569	³ AF160271	² U34427	³ AF158324	² U34511
<i>F. pseudonygamai</i>	<i>Pennisetum typhoides</i>	Nigerija	NRRL 13592	¹ U34563	³ AF160263	² U34421	³ AF158316	² U34505
<i>F. ramigenum</i>	<i>Ficus carica</i>	SAD	NRRL 25208	² U61684	³ AF160267	² U61554	³ AF158320	² U61606
<i>Fusarium</i> sp.	drvo	Venecuela	NRRL 25195	² U61688	³ AF160298	² U61558	³ AF158351	² U61610
<i>Fusarium</i> sp.	palma	Venecuela	NRRL 25204	² U61689	³ AF160299	² U61559	³ AF158352	² U61611
<i>Fusarium</i> sp.	<i>Z. mays</i>	Zimbabve	NRRL 25221	² U61690	³ AF160268	² U61560	³ AF158321	² U61612
<i>Fusarium</i> sp.	<i>Mangifera indica</i>	Indija	NRRL 25226	² U61691	³ AF160281	² U61561	³ AF158334	² U61613
<i>Fusarium</i> sp.	<i>O. sativa</i>	Japan	NRRL 25303	² U61692	³ AF160283	² U61562	³ AF158336	² U61614

<i>Fusarium</i> sp.	<i>Triticum aestivum</i>	Japan	NRRL 25309	² U61693	³ AF160284	² U61563	³ AF158337	² U61615
<i>Fusarium</i> sp.	<i>Ipomoea batatas</i>	Peru	NRRL 25346	² U61694	³ AF160296	² U61564	³ AF158349	² U61616
<i>Fusarium</i> sp.	<i>O. sativa</i>	Nigerija	NRRL 25615	³ AF158308	³ AF160304	³ AF160320	³ AF158357	³ AF158295
<i>Fusarium</i> sp.	<i>Z. mays</i>	Južna Afrika	NRRL 25622	³ AF158306	³ AF160301	³ AF160317	³ AF158354	³ AF158292
<i>Fusarium</i> sp.	mango	Južna Afrika	NRRL 25623	³ AF158305	³ AF160300	³ AF160316	³ AF158353	³ AF158291
<i>Fusarium</i> sp.	šumsko zemljište	Australija	NRRL 25807	² U61672	³ AF160305	² U61542	³ AF158358	² U61594
<i>Fusarium</i> sp.	<i>Striga hermonthica</i>	Madagaskar	NRRL 26061	/	³ AF160303	³ AF160319	/	³ AF158294
<i>Fusarium</i> sp.	<i>S. bicolor</i>	Tanzanija	NRRL 26064	³ AF158307	³ AF160302	³ AF160318	³ AF158355	³ AF158293
<i>Fusarium</i> sp.	<i>Striga hermonthica</i>	Nigerija	NRRL 26152	³ AF158309	³ AF160306	³ AF160321	/	³ AF158296
<i>Fusarium</i> sp.	šumsko zemljište	Nova Gvineja	NRRL 26427	³ AF158302	³ AF160286	³ AF160313	³ AF158339	³ AF158288
<i>Fusarium</i> sp.	ukrasna trava	Južna Afrika	NRRL 26756	³ AF158310	³ AF160307	³ AF160322	³ AF158360	³ AF158297
<i>Fusarium</i> sp.	ukrasna trska	Južna Afrika	NRRL 26757	³ AF158311	³ AF160308	³ AF160323	³ AF158361	³ AF158298
<i>Fusarium</i> sp.	<i>S. hermonthica</i>	Sudan	NRRL 26793	³ AF158312	³ AF160309	³ AF160324	³ AF158362	³ AF158299
<i>Fusarium</i> sp.	<i>Cymbidium</i> sp.	Japan	NRRL 26794	³ AF158303	³ AF160287	³ AF160314	³ AF158340	³ AF158289
<i>Fusarium</i> sp.	<i>Cymbidium</i> sp.	Japan	NRRL 28852	³ AF158304	³ AF160288	³ AF160315	³ AF158341	³ AF158290
<i>Fusarium</i> sp.	<i>Bidens pilosa</i>	SAD	NRRL 29123	³ AF158313	³ AF160310	³ AF160325	³ AF158363	³ AF158300
<i>Fusarium</i> sp.	<i>B. pilosa</i>	SAD	NRRL 29124	³ AF158314	³ AF160311	³ AF160326	³ AF158364	³ AF158301
<i>F. sacchari</i>	<i>Saccharum officinarum</i>	Indija	NRRL 13999	¹ U34556	/	² U34414	³ AF158331	² U34498
<i>F. subglutinans</i>	<i>Z. mays</i>	SAD	NRRL 22016	¹ U34559	³ AF160289	² U34417	/	² U34501
<i>F. succisae</i>	<i>Succisa pratensis</i>	Nemačka	NRRL 13613	¹ U34561	³ AF160291	² U34419	³ AF158344	² U34503
<i>F. thapsinum</i>	<i>S. bicolor</i>	Južna Afrika	NRRL 22045	¹ U34560	³ AF160270	² U34418	³ AF158323	² U34502
<i>F. udum</i>	/	Nemačka	NRRL 22949	¹ U34575	³ AF160275	² U34433	³ AF158328	² U34517
<i>F. verticillioides</i>	<i>Z. mays</i>	Nemačka	NRRL 22172	¹ U34555	³ AF160262	² U34413	³ AF158315	² U34497
<i>F. proliferatum</i>	<i>S. bicolor</i>	Srbija	297a-09	⁴ JQ412110	⁴ JQ412103	⁴ JQ412112	⁴ JQ412114	⁴ JQ717203
<i>F. proliferatum</i>	<i>S. bicolor</i>	Srbija	13-10	/	⁴ JQ412102	/	/	/
<i>F. proliferatum</i>	<i>S. bicolor</i>	Srbija	521-10	/	⁴ JQ412104	/	/	/
<i>F. proliferatum</i>	<i>S. bicolor</i>	Srbija	522-10	/	⁴ JQ412105	/	/	/
<i>F. proliferatum</i>	<i>S. bicolor</i>	Srbija	530-10	/	⁴ JQ412106	/	/	/
<i>F. thapsinum</i>	<i>S. bicolor</i>	Srbija	808-11	⁴ JQ717206	⁴ JQ717205	⁴ JQ717207	⁴ JQ717208	⁴ JQ717209

^aSkraćenice kolekcije kultura: NRRL–National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, Illinois, USA

^bIstraživanja gde su objavljene DNK sekvence: ¹O'Donnell and Cigelnik (1997); ²O'Donnell *et al.* (1998a); ³O'Donnell *et al.* (2000a); i ⁴Ova istraživanja

Prilog 2.

Sekvence ITS regiona rDNK vrsta kompleksa *F. graminearum* korišćene za filogenetske analize

Vrsta	Domaćin	Poreklo	GenBank pristupni broj ^b	
			Kolekcija ^a	ITS
<i>F. acaciae-mearnsii</i>	<i>Acacia mearnsii</i>	Južna Afrika	NRRL 26752	¹ DQ459849
<i>F. acaciae-mearnsii</i>	<i>A. mearnsii</i>	Južna Afrika	NRRL 26754	¹ DQ459850
<i>F. acaciae-mearnsii</i>	<i>A. mearnsii</i>	Južna Afrika	NRRL 26755	¹ DQ459851
<i>F. acaciae-mearnsii</i>	zemljište	Australija	NRRL 34197	¹ DQ459852
<i>F. acaciae-mearnsii</i>	zemljište	Južna Afrika	NRRL 34461	¹ DQ459853
<i>F. acaciae-mearnsii</i>	zemljište	Australija	NRRL 34207	¹ DQ459854
<i>F. asiaticum</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	Japan	NRRL 6101	¹ DQ459833
<i>F. asiaticum</i>	<i>H. vulgare</i>	Japan	NRRL 13818	¹ DQ459834
<i>F. asiaticum</i>	<i>Triticum</i> spp.	Kina	NRRL 26156	¹ DQ459835
<i>F. asiaticum</i>	<i>Z. mays</i>	Nepal	NRRL 28720	¹ DQ459836
<i>F. austroamericanum</i>	pečurka	Brazil	NRRL 2903	¹ DQ459837
<i>F. austroamericanum</i>	puzavica	Venecuela	NRRL 28585	¹ DQ459839
<i>F. austroamericanum</i>	<i>Zea mays</i>	Brazil	NRRL 28718	¹ DQ459838
<i>F. boothii</i>	<i>Z. mays</i>	Južna Afrika	NRRL 29020	¹ DQ459847
<i>F. boothii</i>	<i>Z. mays</i>	Južna Afrika	NRRL 26916	¹ DQ459845
<i>F. boothii</i>	/	Južna Afrika	NRRL 29011	¹ DQ459846
<i>F. boothii</i>	<i>Z. mays</i>	Nepal	NRRL 29105	¹ DQ459848
<i>F. brasiliicum</i>	<i>Avena sativa</i>	Brazil	NRRL 31238	¹ DQ459860
<i>F. brasiliicum</i>	<i>Avena sativa</i>	Brazil	NRRL 31281	¹ DQ459861
<i>F. cortaderiae</i>	<i>Cortaderia selloana</i>	Novi Zeland	NRRL 29306	¹ DQ459855
<i>F. cortaderiae</i>	<i>C. selloana</i>	Novi Zeland	NRRL 29297	¹ DQ459856
<i>F. cortaderiae</i>	<i>C. selloana</i>	Novi Zeland	NRRL 31205	¹ DQ459857
<i>F. cortaderiae</i>	<i>C. selloana</i>	Novi Zeland	NRRL 31171	¹ DQ459858
<i>F. cortaderiae</i>	<i>C. selloana</i>	Novi Zeland	NRRL 31185	¹ DQ459859
<i>F. gerlachii</i>	<i>Triticum</i> spp.	Minesota, SAD	NRRL 36905	¹ DQ459862
<i>F. gerlachii</i>	<i>Arundo donax</i>	Viskonsin, SAD	NRRL 38380	¹ DQ459863
<i>F. gerlachii</i>	<i>Triticum</i> spp.	Dakota, SAD	NRRL 38405	¹ DQ459864
<i>F. graminearum</i>	<i>Z. mays</i>	Ohajo, SAD	NRRL 5883	¹ DQ459817
<i>F. graminearum</i>	<i>Z. mays</i>	Mičigen, SAD	NRRL 28063	¹ DQ459818
<i>F. graminearum</i>	<i>Panicum milliaceum</i>	Mađarska	NRRL 6394	¹ DQ459819
<i>F. graminearum</i>	<i>Triticum</i> spp.	Ohajo, SAD	NRRL 28336	¹ DQ459820
<i>F. graminearum</i>	<i>Z. mays</i>	Iran	NRRL 13383	¹ DQ459821
<i>F. graminearum</i>	<i>Triticum</i> spp.	Kanzas, SAD	NRRL 29169	¹ DQ459822
<i>F. graminearum</i>	<i>Z. mays</i>	Mičigen, SAD	NRRL 31084	¹ DQ459823
<i>F. graminearum</i>	<i>Triticum</i> spp.	Minesota, SAD	NRRL 34097	¹ DQ459824
<i>F. graminearum</i>	<i>Triticum</i> spp.	Luizijana, SAD	NRRL 38369	¹ DQ459825
<i>F. graminearum</i>	<i>Triticum</i> spp.	Luizijana, SAD	NRRL 38381	¹ DQ459826
<i>F. graminearum</i>	<i>Triticum</i> spp.	Luizijana, SAD	NRRL 38395	¹ DQ459827
<i>F. graminearum</i>	<i>Triticum</i> spp.	Luizijana, SAD	NRRL 38383	¹ DQ459828
<i>F. graminearum</i>	<i>Triticum</i> spp.	Luizijana, SAD	NRRL 38393	¹ DQ459829
<i>F. graminearum</i>	<i>Triticum</i> spp.	Luizijana, SAD	NRRL 38371	¹ DQ459830

<i>F. graminearum</i>	<i>Rumohra adiantiformis</i>	Florida, SAD	NRRL 28439	¹ DQ459831
<i>F. graminearum</i>	<i>R. adiantiformis</i>	Florida, SAD	NRRL 29149	¹ DQ459832
<i>F. meridionale</i>	narandža	Nova Kaledonija	NRRL 28436	¹ DQ459840
<i>F. meridionale</i>	zemljište	Južna Afrika	NRRL 29010	¹ DQ459841
<i>F. meridionale</i>	<i>Zea mays</i>	Nepal	NRRL 28723	¹ DQ459842
<i>F. mesoamericanum</i>	<i>Musa sapientium</i>	Honduras	NRRL 25797	¹ DQ459843
<i>F. mesoamericanum</i>	bršljan	Pensilvanija	NRRL 29148	¹ DQ459844
<i>F. vorosii</i>	<i>Triticum</i> spp.	Mađarska	NRRL 37605	¹ DQ459865
<i>F. vorosii</i>	<i>Triticum</i> spp.	Japan	NRRL 38208	¹ DQ459866
<i>F. vorosii</i>	<i>Triticum</i> spp.	Japan	NRRL 38207	¹ DQ459867
<i>F. cerealis</i>	zemljište	Kolumbija	NRRL 25805	¹ DQ459869
<i>F. culmorum</i>	<i>H. vulgare</i>	Danska	NRRL 25475	¹ DQ459870
<i>F. lunulosporum</i>	<i>Citrus paradisi</i>	Južna Afrika	NRRL 13393	¹ DQ459868
<i>F. pseudograminearum</i>	<i>H. vulgare</i>	Australija	NRRL 28062	¹ DQ459871
<i>Fusarium</i> sp.	/	/	NRRL 29380	¹ DQ459872
<i>Fusarium</i> sp.	/	/	NRRL 29298	¹ DQ459873
<i>F. graminearum</i>	<i>S. bicolor</i>	Srbija	535–10	² JQ412111

^aSkraćenice kolekcije kultura: NRRL–National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, Illinois, USA; ^bIstraživanja gde su objavljene DNK sekvence: ¹Starkey *et al.* 2007 i ²Ova istraživanja

Prilog 3.

Sekvence proteinskih gena (TEF-1 α i β -tubulin) vrsta kompleksa *F. graminearum* korišćene za filogenetske analize

Vrsta	Domaćin	Poreklo	GenBank pristupni broj ^b		
			Kolekcija ^a	TEF-1 α	β -tubulin
<i>F. acaciae-mearnsii</i>	<i>Acacia mearnsii</i>	Južna Afrika	NRRL 26752	² AF212447	² AF212741
<i>F. acaciae-mearnsii</i>	<i>A. mearnsii</i>	Južna Afrika	NRRL 26754	² AF212448	² AF212742
<i>F. acaciae-mearnsii</i>	<i>A. mearnsii</i>	Južna Afrika	NRRL 26755	² AF212449	² AF212743
<i>F. asiaticum</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	Japan	NRRL 6101	² AF212450	² AF212744
<i>F. asiaticum</i>	<i>H. vulgare</i>	Japan	NRRL 13818	² AF212451	² AF212745
<i>F. asiaticum</i>	<i>Triticum</i> spp.	Kina	NRRL 26156	² AF212452	/
<i>F. asiaticum</i>	<i>Z. mays</i>	Nepal	NRRL 28720	² AF212453	² AF212746
<i>F. austroamericanum</i>	pečurka	Brazil	NRRL 2903	² AF212438	² AF212733
<i>F. austroamericanum</i>	puzavica	Venecuela	NRRL 28585	² AF212439	² AF212734
<i>F. austroamericanum</i>	<i>Zea mays</i>	Brazil	NRRL 28718	² AF212440	² AF212735
<i>F. boothii</i>	<i>Z. mays</i>	Južna Afrika	NRRL 29020	² AF212443	² AF212737
<i>F. boothii</i>	<i>Z. mays</i>	Južna Afrika	NRRL 26916	² AF212444	² AF212738
<i>F. boothii</i>	/	Južna Afrika	NRRL 29011	² AF212445	² AF212739
<i>F. boothii</i>	<i>Z. mays</i>	Nepal	NRRL 29105	² AF212446	² AF212740
<i>F. meridionale</i>	narandža	Nova Kaledonija	NRRL 28436	² AF212435	² AF212730
<i>F. meridionale</i>	<i>Zea mays</i>	Nepal	NRRL 28723	² AF212436	² AF212731
<i>F. meridionale</i>	zemljište	Južna Afrika	NRRL 29010	² AF212437	² AF212732
<i>F. meridionale</i>	<i>Z. mays</i>	Nepal	NRRL 28721	² AF212454	² AF212747
<i>F. mesoamericanum</i>	<i>Musa sapientium</i>	Honduras	NRRL 25797	² AF212441	¹ AF006364
<i>F. mesoamericanum</i>	bršljan	Pensilvanija	NRRL 29148	² AF212442	² AF212736
<i>F. graminearum</i>	<i>Z. mays</i>	Ohajo, SAD	NRRL 5883	² AF212455	/
<i>F. graminearum</i>	<i>Panicum milliaceum</i>	Mađarska	NRRL 6394	² AF212456	² AF212748
<i>F. graminearum</i>	<i>Z. mays</i>	Iran	NRRL 13383	² AF212457	/
<i>F. graminearum</i>	<i>Z. mays</i>	Mičigen, SAD	NRRL 28063	² AF212458	/
<i>F. graminearum</i>	<i>Triticum</i> spp.	Ohajo, SAD	NRRL 28336	² AF212459	² AF212749
<i>F. graminearum</i>	<i>Rumohra adiantiformis</i>	Florida, SAD	NRRL 28439	² AF212460	² AF212750
<i>F. graminearum</i>	<i>Triticum</i> spp.	Kansas, SAD	NRRL 29169	² AF212461	² AF212751
<i>F. cerealis</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Poljska	NRRL 13721	² AF212464	/
<i>F. cerealis</i>	<i>Iris hollandica</i>	Holandija	NRRL 25491	² AF212465	¹ AF006360
<i>F. cerealis</i>	zemljište	Kolumbija	NRRL 25805	² AF212466	¹ AF006361
<i>F. culmorum</i>	/	/	NRRL 3288	² AF212462	/
<i>F. culmorum</i>	<i>H. vulgare</i>	Danska	NRRL 25475	² AF212463	¹ AF006362
<i>F. lunulosporum</i>	<i>Citrus paradisi</i>	Južna Afrika	NRRL 13393	² AF212467	¹ U85571
<i>F. pseudograminearum</i>	<i>H. vulgare</i>	Australija	NRRL 28062	² AF212468	² AF107867
<i>F. pseudograminearum</i>	<i>Medicago</i> sp.	Južna Afrika	NRRL 28065	² AF212469	² AF107870
<i>F. pseudograminearum</i>	<i>Medicago</i> sp.	Južna Afrika	NRRL 28334	² AF212470	² AF107880
<i>F. pseudograminearum</i>	zemljište	Australija	NRRL 28338	² AF212471	² AF107882
<i>F. graminearum</i>	<i>Sorghum bicolor</i>	Srbija	532-10	³ JQ412107	/
<i>F. graminearum</i>	<i>S. bicolor</i>	Srbija	535-10	³ JF747146	³ JQ412113
<i>F. graminearum</i>	<i>S. bicolor</i>	Srbija	536-10	³ JQ412108	/
<i>F. graminearum</i>	<i>S. bicolor</i>	Srbija	14-11	³ JQ862471	/

^aSkraćenice kolekcije kultura: NRRL–National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, Illinois, USA

^bIstraživanja gde su objavljene DNK sekvence: ¹O'Donnell *et al.* 1998b; ²O'Donnell *et al.* 2000b i ³Ova istraživanja

Prilog 4.

Sekvence proteinskog gena TEF-1 α vrste *F. equiseti* korišćene za filogenetske analize

Oznaka izolata	Domaćin	Poreklo	GenBank pristupni broj ¹	
			Kolekcija	TEF-1 α
<i>F. equiseti</i>				
EQU1	<i>Hordeum vulgare</i>	Španija	H3SA.042	JF496568 ^j
EQU2	<i>H. vulgare</i>	Španija	C1SA.060	JF496569 ^j
EQU3	<i>H. vulgare</i>	Španija	C1SA.063	JF496570 ^j
EQU4	<i>H. vulgare</i>	Španija	C3RA.065	JF496571 ^j
EQU5	<i>H. vulgare</i>	Španija	C1SA.073	JF496568-1 ^j
EQU6	<i>H. vulgare</i>	Španija	D24SZ.090	JF496572 ^j
EQU7	<i>H. vulgare</i>	Španija	C1SA.102	JF496573 ^j
EQU8	<i>H. vulgare</i>	Španija	C3SH.103	JF496574 ^j
EQU9	<i>Triticum durum</i>	Španija	H2-2-5B	JF496575 ^a
EQU10	<i>T. durum</i>	Španija	L1-2-2	JF496575-1 ^a
EQU11	<i>T. durum</i>	Španija	L3-1-2J	JF496576 ^a
EQU12	<i>T. durum</i>	Španija	U6-1-1	JF496577 ^a
EQU13	zemljište	Malta	VI01066	AJ543571 ^b
EQU14	<i>Beta vulgaris</i>	Danska	VI01067	AJ543558 ^b
EQU15	<i>H. vulgare</i>	Švedska	VI01068	AJ543557 ^b
EQU16	<i>Allium cepa</i>	Danska	VI01069	AJ543561 ^b
EQU17	<i>A. cepa</i>	Danska	VI01070	AJ543562 ^b
EQU18	<i>Triticum</i> spp.	Danska	VI01071	AJ543563 ^b
EQU19	<i>H. vulgare</i>	Danska	VI01072	AJ543559 ^b
EQU20	<i>Triticum</i> spp.	Norveška	VI01079	AJ543564 ^b
EQU21	<i>Avena sativa</i>	Norveška	VI01084	AJ543565 ^b
EQU22	<i>Triticum</i> spp.	Norveška	VI01087	AJ543570 ^b
EQU23	<i>H. vulgare</i>	Norveška	VI01093	AJ543566 ^b
EQU24	<i>H. vulgare</i>	Norveška	VI01095	AJ543560 ^b
EQU25	<i>H. vulgare</i>	Norveška	VI01096	AJ543567 ^b
EQU26	<i>Triticum</i> spp.	Norveška	VI01104	AJ543568 ^b
EQU27	<i>A. sativa</i>	Norveška	VI01105	AJ543569 ^b
EQU30	zemljište	Kanada	11_ZP_2	DQ842055
EQU31	<i>Macrochloa tenacissima</i>	Španija	34/2.1.1	DQ854854 ^c
EQU33	<i>Triticum</i> spp.	Kanada	DAOM194187	DQ842084
EQU35	<i>H. vulgare</i>	Kanada	DAOM232362	DQ842096
EQU36	<i>Triticum</i> spp.	Kanada	DAOM236361	DQ842099
EQU38	<i>Glycine max</i>	Kanada	G4_2_QC_ND	DQ842101
EQU43	ginseng – zemljište	Kanada	11_ZP_1	DQ842054
EQU44	<i>Triticum</i> spp.	Kanada	16_ZP_2	DQ842058
EQU46	slama	Kanada	22_ZP_2	DQ842061
EQU48	slama	Kanada	2_ZP_2	DQ855945
EQU49	ginseng – koren	Kanada	7_ZP_1	DQ842078

EQU50	<i>B. vulgaris</i>	Francuska	60	FJ939674 ^d
EQU52	<i>B. vulgaris</i>	SAD	113	FJ939678 ^d
EQU53	<i>B. vulgaris</i>	Švedska	90	FJ939675 ^d
EQU58	<i>B. vulgaris</i>	Nemačka	157	FJ939684 ^d
EQU60	<i>B. vulgaris</i>	Nemačka	149	FJ939680 ^d
EQU61	<i>B. vulgaris</i>	Italija	174	FJ939686 ^d
EQU62	<i>Triticum</i> spp.	Kanada	DAOM194188	DQ842085
EQU64	<i>Zea mays</i>	Kanada	DAOM215463	DQ842094
EQU65	<i>Triticum</i> spp.	Kanada	DAOM232364	DQ842098
EQU66	<i>Oryza sativa</i>	Italija	GLS2	GQ848542 ^c
EQU68	<i>B. vulgaris</i>	Čile	NRRL20697	GQ505594 ^f
EQU69	zemljište	Nemačka	NRRL26419	GQ505599 ^f
EQU70	/	/	NRRL36136	GQ505644 ^f
EQU71	zemljište	Holandija	NRRL36321	GQ505647 ^f
EQU72	<i>Solanum tuberosum</i>	Danska	NRRL36466	GQ505356 ^f
EQU73	/	SAD	NRRL43636	GQ505663 ^f
286–09	<i>S. bicolor</i>	Srbija	/	JQ412101 ^k
<i>F. scirpi</i>				
SCI1	pašnjak	Australija	NRRL36478	GQ505654 ^f
SCI2	pašnjak	Australija	NRRL29134	GQ505605 ^f
SCI3	zemljište	Francuska	NRRL26922	GQ505601 ^f
SCI4	šumsko zemljište	Australija	NRRL13402	GQ505592 ^f
<i>F. graminearum</i>				
GRA1	<i>Triticum</i> spp.	SAD	NRRL29169	AF212461 ^g

¹Istraživanja gde su objavljene DNK sekvence: ^aJurado *et al.* 2006; ^bKristensen *et al.* 2005; ^cMaciá–Vicente *et al.* 2008; ^dNitschke *et al.* 2009; ^eAmatulli *et al.* 2010; ^fO'Donnell *et al.* 2009; ^gO'Donnell *et al.* 2000b; ^hNalim *et al.* 2009; ⁱO'Donnell *et al.* 2010; ^jMarín *et al.* 2012 i ^kOva istraživanja

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Danijela Ristić

broj indeksa _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Karakterizacija vrsta roda *Fusarium* patogena sirka [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] u
Srbiji i utvrđivanje osetljivosti genotipova

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

Potpis doktoranta

U Beogradu, 08.10.2012. godine

Ristić Danijela

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Danijela Ristić

Broj indeksa _____

Studijski program Poljoprivredne nauke

Naslov rada Karakterizacija vrsta roda *Fusarium* patogena sirka [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] u Srbiji i utvrđivanje osetljivosti genotipova

Mentor prof. dr Aleksandra Bulajić, vanredni profesor

Potpisani/a Danijela Ristić

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

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

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

Potpis doktoranta

U Beogradu, 08.10.2012. godine

Ristić Danijela

Izjava o korišćenju

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

Karakterizacija vrsta roda *Fusarium* patogena sirka [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] u Srbiji i utvrđivanje osetljivosti genotipova

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

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

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

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranta

U Beogradu, 08.10.2012. godine

Ristić Danijela