

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Mira M. Vojvodić

**DIVERZITET VRSTA RODA *RHIZOCTONIA*
U SRBIJI**

doktorska disertacija

Beograd, 2021.

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Mira M. Vojvodić

**DIVERZITET VRSTA RODA *RHIZOCTONIA*
U SRBIJI**

doktorska disertacija

Beograd, 2021.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE

Mira M. Vojvodić

**DIVERSITY OF SPECIES WITHIN THE GENUS
RHIZOCTONIA IN SERBIA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021.

Komisija za ocenu i odbranu:

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

Članovi komisije:

dr Ivana Vico, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Poljoprivredni fakultet

dr Brankica Tanović, naučni savetnik
Institut za pesticide i zaštitu životne sredine, Beograd

dr Petar Mitrović, viši naučni saradnik
Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad

dr Goran Aleksić, naučni savetnik
Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd

Datum odbrane: _____

ZAHVALNICA

Izuzetnu zahvalnost dugujem svom mentoru, dr Aleksandri Bulajić, redovnom profesoru čije je poverenje, strpljenje i razumevanje bilo od presudnog značaja. Njena posvećenost, nesebična pomoć, zalaganje, znanje i iskustvo, doprineli su nastanku ove doktorske disertacije. Podrška i saveti, tokom izrade, realizacije ogleđa i pisanja rada za mene su bili od neprocenjive vrednosti.

Zahvalna sam dr Ivani Vico, redovnom profesoru, koja me je uvela u osnove fitopatologije kroz priliku za izradu diplomskog rada, kao i na korisnim savetima i podršci koju mi je pružila tokom celokupnog perioda izrade doktorske disertacije.

Zahvalna sam i dr Brankici Tanović, naučnom savetniku, na prilici za izradu master rada i brojnim korisnim savetima, kao i na izuzetnoj pomoći, podršci i uloženom iskustvu u toku izrade doktorske disertacije.

Zahvalna sam dr Petru Mitroviću, višem naučnom saradniku na pomoći prilikom obilaska terena i uloženom praktičnom iskustvu prilikom odabira useva za uzorkovanje, kao i na finansijskoj podršci tokom izrade ove doktorske disertacije.

Zahvalna sam dr Goranu Aleksiću, naučnom savetniku na podršci i korisnim savetima datim u završnim fazama izrade doktorske disertacije.

Na podršci se posebno zahvaljujem i dr Branki Krstić, redovnom profesoru, dr Ivani Stanković, redovnom profesoru i dr Ani Vučurović, asistentu sa doktoratom, kao i kolegama dr Katarini Zečević, naučnom saradniku, Dragani Đurić, tehničkom saradniku, mr Dragutinu Antonijeviću, stručnom saradniku, Dragani Milošević, tehničkom saradniku, kao i dr Dušanu Nikoliću, Nikoli Radoviću, i Branki Petrović na prijateljstvu, podršci i pomoći koje su mi pružili tokom stvaranja ove disertacije.

Zahvalna sam dr Dejanu Laziću i kompaniji East Diagnostics doo iz Beograda, na pomoći, podršci i prilici za istraživanja primenom novih, naprednih tehnika u mikologiji u Srbiji, kao i na finansijskoj podršci tokom izrade jednog dela eksperimenata.

Veliku zahvalnost dugujem i svom izabraniku Stefanu i njegovoj porodici koji su bili uz mene kada je to bilo potrebno.

Neizmernu zahvalnost na bezrezervnoj podršci, ljubavi i razumevanju dugujem svojoj porodici koja je uvek uz mene.

DIVERZITET VRSTA RODA *RHIZOCTONIA* U SRBIJI

Rezime: U periodu 2013-2020. godine, pregledom 22 useva na 15 lokaliteta i šest partija krompira u Srbiji, ustanovljena je pojava nekroze i truleži korena različitih biljaka. Sakupljeno je 330 uzoraka i dobijeno 177 izolata *Rhizoctonia* spp., koji su morfološki i molekularno razdvojeni u 11 anastomoznih grupa (AG). Rezultati su potvrđeni sekvenciranjem ITS regiona rDNA, kao i LSU, *rpb2*, *tef-1a*, *atp6* i β -*tubulin* genskih markera. Detaljno su okarakterisana 64 izolata i generisano je 77 sekvenci koje su omogućile prvi uvid u diverzitet i strukturu populacije *Rhizoctonia* spp. u Srbiji. Kao prouzrokovani bolesti u Srbiji javljaju se dvojedarne *Rhizoctonia* spp. AG-A na jagodi, AG-G na paradajzu, trešnji i pasulju, AG-F na paprici, AG-U na jabuci i *Poa* sp., a od višejedarnih *R. solani* potvrđeno je prisustvo AG-2-1 na paprici, AG-2-2 na šećernoj repi, AG-3 na krompiru, AG-4 HGI na mrkvi, paprici, uljanoj repici i kupusu, AG-4 HGII na jabuci, AG-6 na malini, kao i *Waitea circinata* var. *zeae* na kupusu i uljanoj repici. Od toga, osam AG dokazano je u Srbiji prvi put ili prvi put na novom domaćinu u Srbiji, a osam AG je prvi put opisano na novim domaćinima u svetu. Filogenetske analize ukazale su na njihove međuodnose, na moguće puteve introdukcije i postojanje varijabilnosti u okviru roda *Rhizoctonia* u Srbiji. Razvijen je protokol za direktnu detekciju AG primenom specifičnih prajmera, kao i qPCR protokol za specifičnu detekciju *R. solani* AG-2-2. Ustanovljena je različita virulentnost i krug domaćina pojedinih AG inokulacijama 14 biljaka iz osam familija. Identifikovan je izolat *Trichoderma harzianum* sa agresivnošću prema različitim AG u *in vitro* i *in vivo* eksperimentima. Dobijeni rezultati pokazuju da su vrste roda *Rhizoctonia* veoma značajna i raznovrsna grupa patogena u Srbiji.

Ključne reči: dvojedarna *Rhizoctonia* spp., višejedarna *Rhizoctonia solani*, *Waitea circinata* var. *zeae*, morfologija, molekularna identifikacija, specifični prajmeri, qPCR, filogenetske analize, virulentnost, biološka kontrola.

Naučna oblast: Biotehničke nauke

Uža naučna oblast: Fitopatologija

UDK: 632.4.063.8(497.11)(043.3)

DIVERSITY OF SPECIES WITHIN THE GENUS *RHIZOCTONIA* IN SERBIA

Abstract: During 2013-2020, 22 different crops at 15 localities, as well as six lots of potatoes, were surveyed in Serbia for the presence of root rot and necrosis. From a total of 330 samples 177 isolates of *Rhizoctonia* spp. were obtained and separated into 11 anastomosis groups (AGs) based on morphology and sequencing of the ITS rDNA region, as well as LSU, *rpb2*, *tef-1a*, *atp6* and β -*tubulin* markers. A total of 64 isolates were fully characterized and 77 sequences were generated, providing the first insight into the diversity and population structure of *Rhizoctonia* spp. in Serbia. Binucleate *Rhizoctonia* spp. AG-A on strawberry, AG-G on tomato, cherry and bean, AG-F on pepper, AG-U on apple and *Poa* sp., and multinucleate *R. solani* AG-2-1 on pepper, AG-2-2 on sugar beet, AG-3 on potato, AG-4 HGI on carrot, pepper, oilseed rape and cabbage, AG-4 HGII on apple, AG-6 on raspberry, as well as *Waitea circinata* var. *zeae* on cabbage and oilseed rape were confirmed as pathogens in Serbia. Among them, eight AGs have been detected for the first time in Serbia, while eight AGs have been detected on new hosts in the world. Phylogenetic analysis revealed their relationships, the possible routes of introduction and the existence of variability within the population of *Rhizoctonia* spp. in Serbia. A protocol for direct detection of various AGs has been developed using specific primers, as well as a protocol for specific detection of *R. solani* AG-2-2 using qPCR. Different aggressiveness of the AGs and an experimental host range on 14 plants from eight families have been established. *Trichoderma harzianum* have been isolated with aggressiveness against different AGs and tested *in vitro* and *in vivo*. Results show that *Rhizoctonia* species are a very important and diverse group of pathogens in Serbia.

Keywords: binucleate *Rhizoctonia* spp., multinucleate *Rhizoctonia solani*, *Waitea circinata* var. *zeae*, morphology, molecular identification, specific primers, qPCR, phylogenetic analysis, virulence, biological control.

Scientific field: Biotechnical Science

Scientific discipline: Phytopathology

UDC: 632.4.063.8(497.11)(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	2
2.1. Opšte odlike roda <i>Rhizoctonia</i>	2
2.2. Istorijski osvrt na taksonomiju vrsta roda <i>Rhizoctonia</i>	3
2.3. Metode identifikacije vrsta roda <i>Rhizoctonia</i>	4
2.4. Klasifikacija na osnovu hifalnih anastomoza	4
2.5. Taksonomija teleomorfa <i>Rhizoctonia</i> vrsta.....	6
2.6. Važeća klasifikacija vrsta roda <i>Rhizoctonia</i>	6
2.6.1. Klasifikacija dvojedarnih <i>Rhizoctonia</i> (teleomorf <i>Ceratobasidium</i>).....	7
2.6.2. Klasifikacija višjedarnih vrsta roda <i>Rhizoctonia</i> (teleomorf <i>Thanatephorus</i> i <i>Waitea</i>) ..	10
2.7. Suzbijanje bolesti koje izazivaju vrste roda <i>Rhizoctonia</i>	13
2.8. Proučavanja vrsta roda <i>Rhizoctonia</i> u Srbiji	15
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	16
4. MATERIJAL I METODE	17
4.1. Pregled terena i sakupljanje uzoraka	17
4.2. Izolacija patogena i dobijanje izolata vrha hifa.....	19
4.3. Provera patogenosti	19
4.4. Ispitivanje morfoloških osobina	21
4.4.1. Anastomozno uparivanje na PDA	22
4.4.2. Inicijacija teleomorfno stadijuma	22
4.5. Ispitivanje molekularnih osobina	23
4.5.1. Ekstrakcija DNA.....	23
4.5.2. Lančana reakcija polimeraze	24
4.5.3. Vizuelizacija i analiza produkata.....	26
4.5.4. Sekvenciranje PCR produkata	26
4.5.5. BLAST analize sekvenci <i>Rhizoctonia</i> spp.	29
4.5.6. Molekularna karakterizacija	29
4.6. Razvijanje brzih protokola za specifičnu detekciju pojedinih AG <i>Rhizoctonia</i> spp.	33
4.6.1. Ispitivanje direktne detekcije AG korišćenjem specifičnih prajmera.....	33
4.6.2. Razvijanje qPCR protokola za detekciju <i>Rhizoctonia solani</i> AG-2-2.....	34
4.7. Ispitivanje kruga domaćina i virulentnosti odabranih <i>Rhizoctonia</i> spp	35
4.7.1. Ispitivanje virulentnosti <i>Rhizoctonia</i> spp. na sejancima.....	35
4.7.2. Virulentnost ispitivanih izolata na lisnim peteljka jagode.....	36
4.7.3. Ispitivanje virulentnosti <i>Rhizoctonia</i> spp. na isečcima stabla krompira.....	37
4.8. Ispitivanje međuodnosa izolata <i>Trichoderma</i> spp. i odabranih izolata <i>Rhizoctonia</i> spp.	37
4.8.1. Identifikacija izolata <i>Trichoderma</i> sp.	37
4.8.2. Ispitivanje međuodnosa <i>Trichoderma</i> sp. i odabranih izolata različitih AG <i>Rhizoctonia</i> spp. <i>in vitro</i>	38
4.8.3. Ispitivanje međuodnosa <i>Trichoderma</i> sp. i odabranih izolata različitih AG <i>Rhizoctonia</i> spp. <i>in vivo</i>	39
5. REZULTATI	41
5.1. Simptomi bolesti i izolovane <i>Rhizoctonia</i> spp.	41
5.2. Patogenost <i>Rhizoctonia</i> spp. na različitim biljkama.....	47
5.3. Morfološke odlike i brzina porasta izolata <i>Rhizoctonia</i> spp.	51
5.3.1. Pripadnost izolata <i>Rhizoctonia</i> spp. anastomoznim grupama.....	65
5.3.2. Teleomorfni stadijum.....	68
5.4. Molekularne karakteristike izolata <i>Rhizoctonia</i> spp.	68
5.4.1. Molekularna identifikacija.....	68
5.4.2. Filogenetski međuodnosi izolata <i>Rhizoctonia</i> spp.	73
5.5. Direktna detekcija anastomoznih grupa <i>Rhizoctonia</i> spp.	80
5.5.1. Protokol za detekciju primenom specifičnih prajmera	80

5.5.2. qPCR protokol za specifičnu detekciju <i>Rhizoctonia solani</i> AG-2-2	82
5.6. Krug domaćina i virulentnost	83
5.8. Biološka kontrola izolatom 167-17 <i>Trichoderma harzianum</i>	90
5.8.1. Morfološke i molekularne odlike izolata 167-17 <i>Trichoderma</i> sp. iz Srbije.....	90
5.8.2. <i>In vitro</i> efekti delovanja <i>Trichoderma harzianum</i> na ispitivane izolate <i>Rhizoctonia</i> spp.	91
5.8.3. <i>In vivo</i> efekti delovanja <i>Trichoderma harzianum</i> na <i>Rhizoctonia</i> spp.	95
6. DISKUSIJA	100
6.1. Pojava i simptomi bolesti izazvanih izolatima <i>Rhizoctonia</i> spp. u Srbiji	100
6.2. Patogenost ispitivanih izolata <i>Rhizoctonia</i> spp.	104
6.3. Morfološka karakterizacija i AG uparivanje ispitivanih izolata <i>Rhizoctonia</i> spp. iz Srbije .	106
6.4. Molekularne karakteristike <i>Rhizoctonia</i> spp. i njihova primena.....	108
6.4.1. Molekularna identifikacija i analize sekvenci ispitivanih izolata.....	108
6.4.2. Filogenetske analize i taksonomska pozicija ispitivanih izolata	111
6.4.3. Pogodnost primene specifičnih prajmera u detekciji AG	112
6.4.4. Pogodnost qPCR protokola za specifičnu detekciju <i>Rhizoctonia solani</i> AG-2-2.....	113
6.5. Virulentnost i krug domaćina ispitivanih izolata <i>Rhizoctonia</i> spp.....	114
6.6. Mogućnost biološke kontrole <i>Rhizoctonia</i> spp. primenom <i>Trichoderma harzianum</i>	117
7. ZAKLJUČAK	119
8. LITERATURA	123
BIOGRAFIJA	144
Izjava o autorstvu	145
Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada	146
Izjava o korišćenju	147

1. UVOD

Vrste roda *Rhizoctonia* predstavljaju anamorfnu rod fitopatogenih gljiva, koje se održavaju u zemljištu i koje prouzrokuju trulež korena i propadanje različitih vrsta biljaka. Spadaju u široko rasprostranjene i veoma značajne patogene, a njihova kontrola je veoma otežana zbog održavanja u zemljištu, diverziteta i širokog kruga domaćina. Taksonomija i status vrsta u okviru roda *Rhizoctonia* različita je u poređenju sa velikom većinom drugih rodova fitopatogenih gljiva. Rod *Rhizoctonia* obuhvata varijabilne genotipove klasifikovane u veći broj nižih taksonomskih jedinica-anastomoznih grupa (AG) (**Carling et al.**, 1999). Imaju vrlo širok krug domaćina uključujući povrtarske, ratarske, voćarske i ukrasne biljke, kao i razne vrste šumskih biljaka (**Garcia et al.**, 2006). Štete koje prouzrokuju mogu biti i kvantitativne i kvalitativne, jer izazivaju nekrozu korenovog vrata i korena i propadanje sejanaca, ali i ugrožavaju tržišnu vrednost delova biljke koji se koriste za ishranu (**Vilgalys and Cubeta**, 1994). Naročito su značajne kao patogeni šećerne repe, soje i uljane repice kod kojih izazivaju trulež korena, a patogeni su i velikog broja povrtarskih biljaka na kojima prouzrokuju nekrozu i sušenje kako odraslih biljaka, tako i sejanaca. Kao prouzročivač crne krastavosti krtola krompira ističe se naročito *Rhizoctonia solani* AG-3.

U Srbiji do danas nema dovoljno podataka o prisustvu i diverzitetu vrsta roda *Rhizoctonia*, iako se oboljenja redovno javljaju. Do sada su u Srbiji detektovane *Rhizoctonia* spp. AG-A i AG-I na jagodi, *R. solani* AG-2-2IV na lucerki i krompiru, *R. solani* AG-1 IA na soji, i *R. solani* AG-2-2IIIB, AG-2-2IV i AG-4 HGII na šećernoj repi (**Vico**, 1994a; **Vico**, 1994b; **Vico**, 1997; **Stojšin et al.**, 2011). Uzimajući u obzir širok krug domaćina ovih vrsta i veliki broj osetljivih domaćina koji se u Srbiji često gaje, može se očekivati da ih je značajno više. U svetu se stalno detektuju novi domaćini ovih vrsta. Zato su u okviru ove disertacije u toku sedam godina pregledani brojni domaćini, sakupljeni izolati i obavljena je njihova identifikacija i karakterizacija primenom polifaznog pristupa, proučavanjem morfoloških, patogenih, bioloških i molekularnih karakteristika. Kako je precizna i brza dijagnoza preduslov za uspešnu kontrolu bolesti koje izazivaju *Rhizoctonia* spp. razvijena su dva protokola za brzu detekciju specifičnih AG. U okviru uspostavljanja održivih i ekološki prihvatljivih mera suzbijanja, testirani su i agensi biološke kontrole, da se i konkretno doprinese poboljšanju mera suzbijanja ovih patogena u Srbiji i svetu.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Opšte odlike roda *Rhizoctonia*

Anamorfní rod *Rhizoctonia* (carstvo Fungi, razdeo Basidiomycota, klasa Agaricales, red Cantharellales, familija Ceratobasidiaceae) predstavlja raznoliku grupu gljiva koje se međusobno razlikuju po mnogim osobinama, kao što su teleomorf i morfologija (Vilgalys and Cubeta, 1994). Vrste roda *Rhizoctonia* rasprostranjene su širom sveta i obuhvataju značajne biljne patogene, koji se održavaju u zemljištu, patogene poplavljenih useva i patogene nadzemnih delova biljaka, takođe znatan broj *Rhizoctonia* vrsta su saprobi i mikorizne vrste (Carling et al., 1999). Različite ekološke niše koje naseljavaju vrste roda *Rhizoctonia* ilustruju njihovu raznolikost. Klasifikovanje ovog izuzetno heterogenog roda u niže taksonomske kategorije, olakšalo je proučavanje i određivanje vrsta, tako da su klasifikovane na osnovu međusobnih hifalnih anastomoza i broja jedara u hifama (Sneh et al., 1991). Na osnovu hifalnih anastomoza podeljene su na niže jedinice - anastomozne grupe (AG), dok su na osnovu broja jedara u ćelijama mladih hifa podeljene na jednojedarne, dvojedarne i višejedarne. U okviru višejedarnih vrsta trenutno je opisano 14 AG, imenovanih kao AG-1 do AG-13, a prepoznaje se i grupa AG-Bi (premošćujući izolati, eng. bridging isolates) koja obuhvata izolate koji se uparuju sa više različitih AG (Sneh et al., 1991; Carling et al., 1999). U okviru dvojedarnih vrsta trenutno su opisane 23 AG, klasifikovane od AG-A do AG-W (Sneh et al., 1991; Yang et al., 2015a). Vrste roda *Rhizoctonia* imaju teleomorfni stadijum koji se svrstava u rodove *Ceratobasidium*, *Thanatephorus* i *Waitea* (Talbot, 1970; Stalpers and Andersen, 1996).

Uobičajani simptomi koje izazivaju *Rhizoctonia* spp. obuhvataju trulež korena i stabla, sušenje listova, propadanje celih biljaka, palež klijanaca i trulež semena. Simptomi mogu varirati zavisno od biljne vrste, uzrasta biljke i spoljnih uslova (Guleria et al., 2007). Pri povoljnim uslovima spoljašnje sredine, na zaraženim biljkama mogu se javiti i tamne sklerocije, što je karakteristično za anamorfní stadijum, ili bela micelijska navlaka, sa bazidima i bazidiosporama, što je karakteristično za teleomorfni stadijum.

Uobičajeno se navodi da vrste roda *Rhizoctonia* imaju vrlo širok krug domaćina uključujući povrtarske, neke ratarske, voćarske i ukrasne biljke, kao i razne vrste šumskih biljaka. Međutim, kod različitih AG razlikuje se broj domaćina, tako da postoje AG koje su usko specijalizovane, kao i one sa izuzetno širokim krugom domaćina (Garcia et al., 2006).

Iako imaju relativno mali broj morfoloških karakteristika koje bi se mogle koristiti za identifikaciju, vrste roda *Rhizoctonia* ispoljavaju značajnu varijabilnost. Boja kolonije varira od bež do smeđe. Hife imaju karakterističan način grananja, granaju se pod pravim uglom, u blizini mesta grananja nalazi se suženje, a neposredno posle i septa. Kod mnogih AG, zadebljvanjem hifa nastaju moniliformne ćelije. Većina vrsta ovog roda obrazuje sklerocije, otporne, bespolne tvorevine koje omogućavaju preživljavanje u zemljištu duži niz godina, ali takođe predstavljaju i izvor inokuluma (Roberts, 1999). Pri povoljnim uslovima, sklerocije klijaju i zaražavaju koren i stablo biljaka. Posle ostvarenih primarnih infekcija, bolest se u zemljištu širi kružno oko mesta infekcije. Vrste roda *Rhizoctonia* se šire kišom, vodom za zalivanje, oruđem, zaraženim sadnim materijalom, dok glavni izvor inokuluma predstavlja zemljište u kome se nalaze tvorevine ovih gljiva. Prezimljavaju micelijom i sklerocijama u raznim vrstama zemljišta, u zaraženim biljnim ostacima ili materijalu za sadnju, dok se kod nekih domaćina održava u semenu (Agrios, 2005). Kod većine AG optimalna temperatura za ostvarivanje infekcije je od 15 do 18°C. Pri povoljnim uslovima spoljašnje sredine koji podrazumevaju relativnu vlažnost vazduha u opsegu od 40 do 100% i temperaturu od 20 do 30°C može se formirati teleomorfni stadijum u vidu bazida sa bazidiosporama (Kotila, 1945, 1947 loc. cit. Garcia et al., 2006). Međutim, veliki broj izolata u prirodi retko formira teleomorfni stadijum (Garcia et al., 2006), koji se često teško formira i u laboratorijskim uslovima. Bazidiospore se šire vetrom i zaražavaju nadzemne delove biljaka. Smatra se da one omogućavaju

brže širenje patogena, kao i da polno razmnožavanje povećava genetički diverzitet što pomaže u prevazilaženju otpornosti biljaka domaćina (Agrios, 2005).

Vrste roda *Rhizoctonia* ekonomski su veoma značajne i izazivaju štete na skoro svim vrstama povrtarskih biljaka, zatim na ukrasnim biljkama i na više ratarskih vrsta biljaka. Štete se ogledaju u slabijem nicanju (palež klijanaca), kao i proređenosti useva, zatim kržljivosti i usporenom porastu biljaka. Prinos zaraženih biljaka je gotovo uvek umanjen, a procenjene štete kreću se od 10 do 100% u zavisnosti od biljne vrste, jačine napada, kao i uslova spoljašnje sredine (Zhang et al., 2012). Banville (1989) navodi da je prosečni godišnji gubitak prinosa izazvan vrstama *Rhizoctonia* spp. procenjen na 30%. Na krtolama krompira štetnost je znatno veća, jer dolazi do kvantitativnih promena, koje se odnose na direktne štete, odnosno smanjenje prinosa, kao i kvalitativnih promena, odnosno smanjenje tržišne vrednosti krtola zbog prisustva sklerocija (Zhang et al., 2016).

2.2. Istorijski osvrt na taksonomiju vrsta roda *Rhizoctonia*

Koncept roda *Rhizoctonia* prvi put navodi švajcarski mikolog De Canolle 1815. godine, a zasniva se na tipičnoj vrsti *R. croccorum*, prouzrokovajući truleži korena i stabljike šafrana (Tewoldmehin et al., 2006). Kao osnovni kriterijumi za članove ovog roda navode se obrazovanje sklerocija uniformne strukture, izgrađene od hifa i povezanost ovih patogena sa krenom biljaka (Parmeter and Whitney, 1970). Proučavanje morfoloških karakteristika vegetativnih hifa je značajno, jer vrste roda *Rhizoctonia* ne obrazuju bespolne spore. Ovaj nedostatak kriterijuma doveo je u prošlosti do zajedničkog klasifikovanja taksonomski udaljenih vrsta (Moore, 1987 loc. cit. Garcia et al., 2006). Prema Parmeter and Whitney (1970) za uključivanje određenog taksona u rod *Rhizoctonia* potrebno je da izolat poseduje sledeće karakteristike: smeđe pigmentirane hife, grananje pod približno pravim uglom blizu septe kod mladih vegetativnih hifa, suženje hife i formiranje septe nedaleko od mesta grananja, dolipor septalni aparat i višejedarne ćelije u mladim hifama. Postoje i druge karakteristike koje nisu prisutne u celom kompleksu, ali jesu kod velikog broja vrsta, kao što je prisustvo moniformnih ćelija, prisustvo sklerocija i brz porast u kulturi. Oko 120 epiteta dodeljeno je vrstama kompleksa *Rhizoctonia*, dok je broj taksonomskih karakteristika 37 (Anderson and Stalpers, 1994) ili 49 (Roberts, 1999), u zavisnosti od autora (Garcia et al., 2006). Nakon saznanja da mogu da formiraju teleomorfni stadijum, značajne taksonomske karakteristike postale su i boja, oblik i veličina polnih struktura (Ogoshi, 1975). Nekoliko različitih teleomorfni rodova kao što su *Botryobasidium* Donk, *Ceratobasidium* D.P. Rogers, *Thanatephorus* Donk, *Waitea* Warcup and Talbot, *Tulasnella* J. Schroter i *Uthatabasidium* Donk povezani su sa vrstama koje imaju anamorf koji je svrstan u rod *Rhizoctonia* (Talbot, 1970; Stalpers and Andersen, 1996). Međutim, neredovno formiranje teleomorfno stadijuma, dovelo je do toga da se pri klasifikovanju vrsta roda *Rhizoctonia* primenjuju samo anamorfne karakteristike (Garcia et al., 2006).

Najviše proučavana vrsta u okviru roda *Rhizoctonia* je *R. solani*. Prvi opis ove vrste dao je Julius Kühn 1858. godine (loc. cit. Sneh et al. 1991), a dopunjen je istraživanjima Parmeter and Whitney (1970) i Sneh et al. (1991). Ogoshi (1975) je odlike vrste *R. solani* pripisao celom rodu tako da su: 1) grananje pod približno pravim uglom, 2) suženje hife i formiranje septe na manjoj udaljenosti od mesta grananja, 3) prisustvo dolipor septalnog aparata, 4) odustvo konidija i kljunastih izraštaja (klamp konekcija), 5) prisustvo sklerocija kod kojih nisu diferencirani tvrdi korteks i meki centralni deo (rind i medula) prihvaćene kao značajne taksonomske karakteristike ovog roda. Stalpers et al. (1998) predložili su da vrsta *R. solani* bude tipična vrsta roda *Rhizoctonia*, što je i odobreno 2005. godine na Internacionalnom Botaničkom Kongresu (Vienna Code) (McNeill et al., 2006).

2.3. Metode identifikacije vrsta roda *Rhizoctonia*

Značaj mnogih vrsta roda *Rhizoctonia*, kao i veoma mali broj morfoloških karakteristika za determinaciju doveo je do razvoja više različitih metoda za identifikovanje specifičnih grupa. Ove metode značajno se razlikuju u odnosu na one koje se koriste u identifikaciji većine ostalih fitopatogenih gljiva i pseudogljiva. Najčešće korišćene metode uključuju proučavanje morfologije kolonija, određivanje jedarnog statusa (jednojedarne, dvojedarne i višejedarne) i grupisanje na osnovu anastomozne reakcije (Rovira et al., 1986; Ogoshi, 1987; Ogoshi et al., 1990). Do sada je razrađeno nekoliko metoda koje omogućavaju bojenje jedara i njihovo lakše posmatranje pod mikroskopom, uključujući korišćenje konvencionalnih (šafanin O, anilinsko plavo i HCl-Giems) i fluorescentnih boja (Herr, 1979; Kronland and Stanghellini, 1998; Sharon et al., 2006; Barreara et al., 2014). Izolati *Rhizoctonia* mogu se podeliti na jednojedarne, dvojedarne i višejedarne grupe na osnovu broja jedara u ćelijama mladih vegetativnih hifa (Flentje et al., 1963; Parmeter et al., 1967; Yang et al., 1994). Predstavnici jednojedarnih i dvojedarnih grupa imaju teleomorf u rodu *Ceratobasidium*, dok višejedarnoj grupi pripadaju vrste *R. solani* koje imaju teleomorf u rodu *Thanatephorus* i vrste *R. zae* i *R. oryzae* koje imaju teleomorf u rodu *Waitea* (Hietala et al., 1994; Kuninaga, 2002; Sharon et al., 2008). Anastomozne grupe mogu se u određenoj meri prepoznati i na osnovu odgajivačkih i morfoloških karakteristika, kao što su brzina porasta, boja i tekstura micelije, prisustvo koncentričnih prstenova, boja, veličina i broj sklerocija, kao i lokacija i vreme potrebno za njihovo formiranje (Sneh et al., 1996; Jeon et al., 2010; Jaffaar et al., 2016). Anastomozno grupisanje zasniva se na karakterizaciji hifalnih anastomoza u kulturi. Pored konvencionalnog uparivanja u dualnim kulturama, danas se za identifikaciju anastomoznih grupa sve više koriste molekularne metode (Vilgalys and Gonzalez, 1990; Cubeta et al., 1991; Carling et al., 2002a). Neke anastomozne grupe dalje su podeljene na podgrupe na osnovu: patogenosti (Roberts and Sivasithamparam, 1986; Ogoshi, 1987), analize izoenzima (Neate and Warcup, 1985; Neate et al., 1988), sastava masnih kiselina (Stevens-Johnk and Jones, 1993; Priyatmojo et al., 2001a), seroloških reakcija (Thronton et al., 2004), sekvenci ITS regiona rDNA (Carling et al., 2002a) i morfoloških karakteristika (Sneh et al., 1991; Carling and Sumner, 1992).

2.4. Klasifikacija na osnovu hifalnih anastomoza

Pojava hifalne anastomoze između kompatibilanih izolata *R. solani* odavno je opisana (Matsumoto, 1921; Matsumoto et al., 1932 loc. cit. Carling, 1996). Međutim, tek od 1970. godine hifalna anastomoza postaje opšteprihvaćena kao koristan metod za podelu izolata *R. solani* u homogenije, a samim tim i jasnije grupe (Carling, 1996). Grupisanje po hifalnim anastomozama ne odgovara uvek grupisanju po patogenosti, morfologiji kolonije, ili drugim karakteristikama. Anastomozna grupa (AG) je skup blisko povezanih izolata, grupisanih na osnovu njihove sposobnosti da se spajaju jedni sa drugima, na osnovu bliskih genetičkih odnosa (Carling, 1996). Značaj koncepta anastomoznih grupa ogleda se u tome što se svaka anastomozna grupa može smatrati zasebnom evolutivnom jedinicom, jer je genetski izolovana i ne može se hibridizovati sa drugom anastomoznom grupom (Anderson, 1982).

Konvencionalne metode grupisanja na osnovu hifalnih anastomoznih reakcija. Anastomozne grupe se određuju posmatranjem hifalne reakcije između nepoznatog i referentnog izolata poznate anastomozne grupe (Tewoldemedhin et al., 2006). Da bi se okarakterisale ove reakcije stvorena je različita terminologija. Različiti autori kategorisali su navedene reakcije na različite načine (Matsumoto et al., 1932 loc. cit. Carling, 1996; Flentje et al., 1963; Parmeter et al., 1969). U pokušaju da se prevaziđu razlike i nedostaci pri definisanju reakcija stvoren je sistem od četiri kategorije (C3-C0), pri čemu C3 označava najviši stepen genetičke sličnosti kada upareni izolati formiraju savršene anastomoze, a C0 označava nepostojanje genetičke srodnosti (Carling et al., 1988; MacNish et al., 1993). Ogoshi (1987) je uveo novi termin intraspecijske grupe kao naziv za

anastomozne podgrupe. Pored toga, postoje izolati koji su izgubili sposobnost anastomoze sa izolatima iste AG, kao i sami sa sobom i označavaju se kao samoinkompatibilni (eng. selfincompatible). U svetu su detektovani takvi izolati AG-2-2 sa šećerne repe, koji nisu imali mogućnost anastomoze sami sa sobom, za koje su pretpostavili da imaju nedostatak genetičkih faktora koji bi im omogućili sposobnost međusobne anastomoze (**Hyakumachi and Ui**, 1987). Sa druge strane, postoje izolati koji imaju sposobnost anastomoze sa sobom, kao i sa izolatima drugih AG, koji se označavaju kao premošćujući izolati (eng. bridging) (**Sneh et al.**, 1996).

Molekularne metode za identifikaciju anastomoznih grupa. Kako je jednostavnije, brže i sigurnije, u savremenim istraživanjima za identifikaciju anastomoznih grupa sve više se koriste molekularne metode (**Vilgalys and Gonzalez**, 1990; **Cubeta et al.**, 1991; **Carling et al.**, 2002a; **Veldre**, 2011). Molekularne analize rasvetlile su neke od genetskih i taksonomskih međuodnosa *Rhizoctonia* izolata, što je omogućilo bolje razumevanje ovog kompleksa vrsta (**Gonzalez et al.**, 2001). Na osnovu brojnih molekularnih istraživanja ustanovljeno je da većina anastomoznih grupa i podgrupa predstavlja genetski razdvojene grupe; da su određene AG polifiletičke; kao i da AG ne predstavlja najosnovniju evolutivnu jedinicu u okviru roda *Rhizoctonia* (**Gonzalez**, 1992; **Kuninaga et al.**, 1997; **Salazar et al.**, 1999, 2000; **Gonzalez et al.**, 2001; **Garcia et al.**, 2006; **Sharon et al.**, 2006, 2008). Identifikacija primenom prajmera za specifičnu detekciju svake od 14 višejedarnih i velikog broja dvojedarnih anastomoznih grupa i podgrupa dala je doprinos bržoj karakterizaciji vrsta ovog roda (**Johanson et al.**, 1998; **Matsumoto et al.**, 2002; **Lees et al.**, 2002; **Toda et al.**, 2004; **Sayler Yang et al.**, 2007; **Okubara et al.**, 2008; **Godoy-Lutz et al.**, 2008; **Budge et al.**, 2009a; **Arakawa and Inagaki**, 2014). Dizajniranje specifičnih prajmera za određene podgrupe AG veoma je značajan metod za detekciju i razdvajanje podgrupa u okviru AG (**Johanson et al.**, 1998; **Lees et al.**, 2002; **Matsumoto**, 2002; **Justesen et al.**, 2003; **Toda et al.**, 2004; **Sayler and Yang**, 2007; **Godoy-Lutz et al.**, 2008; **Okubara et al.**, 2008). Pored proučavanja AG i podgrupa, primenom specifičnih prajmera moguće je i izvršiti detekciju konkretne AG u biljnim i zemljišnim uzorcima (**Lee et al.**, 2002; **Budge et al.**, 2009a). Specifični prajmeri dizajnirani i bazirani na ITS regionu rDNA, razvijeni su za detekciju i identifikaciju *Rhizoctonia* izolata koji su uključeni u kompleks bolesti pirinča, uključujući *R. solani*, *R. oryzae*, i *R. oryzae-sativae* (**Johanson et al.**, 1998), za razdvajanje *R. oryzae* od AG-8 (**Mazzola et al.**, 1996), za detekciju podgrupa AG-1 (**Matsumoto**, 2002), za sve podgrupe AG-2 (**Salazar et al.**, 2000; **Carling et al.**, 2002a), kao i za razdvajanje podgrupa AG-3 (**Matthew et al.**, 1995; **Kuninaga et al.**, 2000a).

Nekoliko molekularnih metoda, kao što su RAPD (Random amplification of polymorphic DNA) (**Toda et al.**, 2004), RFLP (Restriction fragment length polymorphism) (**Pannecouque and Hofte**, 2009), AFLP (Amplified fragment length polymorphism) (**Lopez-Olmos et al.**, 2005; **Meza-Moller et al.**, 2011; **El Fiky et al.**, 2011), kao i SLST i MLST (Single locus sequence typing i Multilocus sequence typing) (**Ciampi et al.**, 2008, 2009; **Gonzalez et al.**, 2016) razvijene su za detekciju i analizu intraspecijskih grupa, kao i nižih jedinica. Navedene molekularne metode razlikuju se po načinu izvođenja i efikasnosti utvrđivanja genetičkih odnosa i raznolikosti između izolata (**Unal et al.**, 2014), a pored proučavanja strukture populacije, koriste se i za proučavanje geografske rasprostranjenosti grupa.

Analiza sekvenci i filogenetske analize. Sekvenciranje različitih genskih regiona i analize sekvenci predstavljaju najprihvaćeniji metod za utvrđivanje taksonomskih i filogenetskih veza kod vrsta roda *Rhizoctonia* (**Sharon et al.**, 2006) i imaju veliki značaj zbog ukazivanja na evolutivne međuodnose i promene, kao i na mogućnost proučavanja filogeografije, odnosno puteva širenja. Filogenetskim analizama za izolate *W. circinata* var. *zeae* utvrđeno je da potiču sa severnoameričkog kontinenta i da su se odatle proširile na druge kontinente (**Aydin et al.**, 2013). Region 5.8S ribozomalne DNA smatra se konzervativnim za vrstu *R. solani* (**Kuninaga et al.**, 1997), dok postoje prilične nukleotidne varijacije sekvenci ITS1 i ITS2 regiona između izolata različitih AG i njihovih podgrupa (**Kuninaga et al.**, 1997; **Kuninaga**, 2002). Analiza sekvenci ITS rDNA jasno je podelila na podgrupe sledeće AG: AG-1 (**Kuninaga et al.**, 1997; **Toda et al.**, 2004), AG-3 (**Kuninaga et al.**, 2000a), kod koje su **Dass et al.** (2013) detektovali nekoliko ITS-tipova, na osnovu razlike u

sekvenci navedenog regiona, AG-4 (**Kuninaga et al.**, 1997) i AG-6 (**Pope and Carter**, 2001). Procenat nukleotidne sličnosti sekvenci u okviru podgrupa i anastomoznih grupa koje nisu podeljene na niže taksonomske jedinice je visok (94-100%), izuzev AG-7, AG-11 i AG 1-IB (91-100%), što govori o tome da se u okviru ovih AG verovatno nalaze podgrupe. Kod AG koje su izdvojene na nekoliko podgrupa procenat nukleotidne sličnosti je značajno niži: AG-1 (91-100%), AG-2 (81-100%), AG-4 (88-97%) i *R. circinata* (89-100%). Procenat sličnosti sekvenci između višejedarnih izolata varira između 78-90%, izuzev slučajeva srodnijih grupa kao što su: AG-10 sa AG-1 (61-88%), AG-5 sa AG-6 ili AG-7 ili AG-8 (91-92%) i kod podgrupa koje su međusobno srodnije, a razlikuju se od ostalih grupa (90-98%). *R. circinata* se značajno razlikuje od ostalih višejedarnih grupa 63-70% (**Sharon et al.**, 2006). Filogenetska stabla rekonstruisana su za različite *Rhizoctonia* izolate (**Manici and Bonora**, 2007; **Sharon et al.**, 2008; **Aydin et al.**, 2013; **Yang et al.**, 2015a; **Gonzalez et al.**, 2016), kao i za mikorizne AG-6 i AG-12, pri čemu su izolati ove dve AG svrstani u različite klastere što govori o tome da imaju odvojenu evolutivnu istoriju. Filogenetske analize pokazale su da se izolati AG-6 sa južne hemisfere značajno razlikuju od izolata sa severne hemisfere (**Pope and Carter**, 2001; **Sharon et al.**, 2006).

2.5. Taksonomija teleomorfa *Rhizoctonia* vrsta

Vrste koje ispoljavaju karakteristične osobine roda *Rhizoctonia* veoma su raznorodne, a njihova klasifikacija je složena i još uvek nedovoljno usaglašena. Ove vrste svrstavaju se u carstvo fungi, podcarstvo Dikarya, razdeo Basidiomycota, klasu Agaricomycetes, u dva reda Cantharellales i Corticiales, kao i dve familije Ceratobasidiaceae i Corticiaceae (www.ncbi.nlm.nih.gov), sve vrste roda *Rhizoctonia* svrstavaju se u tri glavna teleomorfna roda. Kompleks poznat kao dvojedarne *Rhizoctonia* vrste imaju teleomorf u rodu *Ceratobasidium* Rogers. Višejedarne *Rhizoctonia solani* Kuhn obuhvataju vrste sa teleomorfom, koji se svrstava u rod *Thanatephorus* (Frenk) Donk. Teleomorf višejedarnih *R. zae* Voorhees i *Rhizoctonia oryzae* Riker and Gooch i drugih srodnih vrste predstavljaju grupu sa teleomorfom koji se svrstava u rod *Waitea* Warcup and Talbot (**Carling and Sumner**, 1992). Pored ovoga, filogenetske analize su pokazale da su rodovi *Tulasnella* (anamorf *Epulorhiza*), *Botryobasidium* (anamorf *Allescheriella*, *Alysidium* i *Haplotrichum*) i *Uthatabasidium* povezani sa anamorfom *Rhizoctonia*. Svi pomenuti teleomorfni rodovi svrstavaju se zajedno u red Cantharellales (Tabela 1) koji obuhvata taksone sa značajnim razlikama u načinu života i morfologiji (**Moncalvo et al.**, 2006; **Hibbett et al.**, 2007, 2014). U okviru familije Ceratobasidiaceae nalaze se rodovi *Ceratobasidium*, *Thanatephorus* i *Uthatabasidium*, ali su odnosi između ovih rodova i dalje nedovoljno razjašnjeni (**Gonzalez et al.**, 2016). Između navedenih rodova i roda *Waitea* postoje morfološke razlike, ali i udaljeni filogenetski odnosi. To je potvrđeno filogenetskim analizama gde se *Waitea* spp. ne grupiše zajedno sa *Thanatephorus-Ceratobasidium* kompleksom (**Johanson et al.**, 1998; **Gonzalez et al.**, 2001; **Sharon et al.**, 2008), što potvrđuje da ovaj rod ne pripada familiji Ceratobasidiaceae već familiji Corticiaceae u okviru reda Corticiales (**Larsson**, 2007; **Veldre et al.**, 2013).

2.6. Važeća klasifikacija vrsta roda *Rhizoctonia*

Vrste roda *Rhizoctonia* podeljene su na niže taksonomske kategorije na osnovu jedarnog statusa i međusobnih hifalnih reakcija. U okviru dvojedarnih i višejedarnih vrsta, postoji dalja podela na osnovu hifalnih anastomoznih reakcija na anastomozne grupe koje imaju teleomorf koji se svrstava u rod *Ceratobasidium* (jednojedarne i dvojedarne vrste *Rhizoctonia* spp.), *Thanatephorus* (višejedarne *R. solani*) i *Waitea* (višejedarne *R. zae*, *R. circinata* i *R. oryzae*) (**Rovira et al.**, 1986; **Ogoshi**, 1987; **Ogoshi et al.**, 1990; **Hietala et al.**, 1994; **Kuninaga**, 2002; **Sharon et al.**, 2008).

Tabela 1. Taksonomski sinopsis roda *Rhizoctonia* - trenutno prihvaćeni anamorfni i teleomorfni rodovi (Garcia et al., 2006)

Anamorf	Tipična vrsta	Bazionim	Teleomorf	Tipična vrsta	Bazionim
<i>Ascorhizoctonia</i> Yang & Korf	<i>A. praecox</i> Yang & Korf	<i>A. praecox</i> Yang & Korf, Mycotaxon 23 (1985)	<i>Tricharina</i> Eckblad	<i>T. gilva</i> (Boud. In Cooke) Eckblad	<i>T. gilva</i> (Boud. In Cooke) Eckblad, Nytt. Mag. Bot. 15 (1968): 60
<i>Ceratorhiza</i> R.T. Moore	<i>C. goodyerae</i> <i>repentis</i> (Constantin) R.T. Moore	<i>Rhizoctonia</i> <i>Goodyerae</i> <i>repentis</i> Constantin, Rev. Gèn. Bot. 32 (1920): 533	<i>Ceratobasidium</i> D.P. Rogers	<i>C. calosporum</i> D.P. Rogers	<i>C. calosporum</i> D.P. Rogers, Univ. Iowa Stud. Nat. Hist. 17 (1935): 4
<i>Chrysorhiza</i> Andersen & Stalpers	<i>C. zaeae</i> (Voorhees) Andersen & Stalpers	<i>R. zaeae</i> Voorhees, Phytopathology 24 (1934): 1929	<i>Waitea</i> Warcup & Talbot	<i>W. circinata</i> Warcup & Talbot (Sin = <i>Chrysorhiza</i> <i>zaeae</i> Stalpers & Anders en)	<i>W. circinata</i> Warcup & Talbot, Trans. Br. mycol. Soc. 45 (1962): 503
<i>Epulorhiza</i> R.T. Moore emend Andersen & R.T. Moore	<i>E. repens</i> (Bernard) R.T. Moore emend R.T. Moore (Sin = <i>Tulasnella</i> <i>calospora</i> (Boud) Juel)	<i>R. repens</i> Bernard, Ann. Sci. nat. IX, ser.9 (1909): 31	<i>Tulasnella</i> Schröeter	<i>T. violea</i> (Quél.) Bourd. & Galzin	<i>T. violea</i> (Quél.) Bourd. & Galzin, Bull. Soc. Myc. fr.25(1909): 15
<i>Opadorhiza</i> Andersen & R.T. Moore	<i>O. globularis</i> (Saksena & Vartaja) Andersen & R.T. Moore (Sin = <i>Sebacina</i> sp.)	<i>R. globularis</i> Saksena & Vartaja, Can. J. Bot. 38 (1960): 939	<i>Sebacina</i> Tul.	<i>S. vermifera</i> Oberwinkler	<i>S. vermifera</i> Oberwinkler, Nova Hedwigia 7 (1964): 489
<i>Moliniopsis</i> Ruhland. (Sin. = <i>Rhizoctonia</i> D.C.)	<i>M. aderholdii</i> Ruhland. (Sin = <i>Moliniopsis</i> <i>solani</i> (Kühn) R.T. Moore	<i>R. solani</i> J.G. Kühn, Die Krankheiten der Kulturgewächse: 224 (1858)	<i>Thanatephorus</i> Donk. (Sin = <i>Botryobasidium</i> Donk p.p.)	<i>T. cucumeris</i> (Frank) Donk	<i>Hypochnus</i> <i>cucumeris</i> Frank, Ver. Deutsch BotGes. 1 (1833): 62 (Sin = <i>H. solani</i> Prill. & Delacr.)
<i>Tanatophytum</i> Nees	<i>T. croccorum</i> (Pers.: Fr.) R.T. Moore	<i>Sclerotium</i> <i>croccorum</i> Pers., Syn. Meth. Fung. (1801): 119 (Syn = <i>R. croccorum</i> (Pers.: Fr.) D.C.	<i>Helicobasidium</i> Pat.	<i>H. purpureum</i> Pat	<i>H. purpureum</i> Pat., Bull. Soc. Bot. France 32: 172 (1885)

2.6.1. Klasifikacija dvojedarnih *Rhizoctonia* (teleomorf *Ceratobasidium*)

Varijabilni dvojedarni *Rhizoctonia* spp. izolati istorijski se grupišu u anastomozne grupe na različite načine (Lipps and Herr, 1982; Burpee et al., 1980a, 1980b). Sneh et al. (1991) klasifikuje dvojedarne *Rhizoctonia* izolate na osnovu koncepta hifalne reakcije, dok za podgrupe uključuje i morfološke karakteristike kolonija, što je trenutno prihvaćeno. Anastomozne grupe označene su slovima abecede i prvo su bile priznate anastomozne grupe AG-A do AG-S. Nakon toga, opisano je postojanje dodatnih i to AG-T do AG-W, tako da je trenutno opisano ukupno 23 AG (Ogoshi et al.,

1979, 1983a, 1983b; **Sneh et al.**, 1998; **Hyakumachi et al.**, 2005; **Dong et al.**, 2017; **Yang et al.**, 2015a). Iako su dvojedarne *Rhizoctonia* vrste prisutne širom sveta, o rasprostranjenosti pojedinih grupa ima malo podataka. Oboljenja prouzrokovana patogenim dvojedarnim *Rhizoctonia* izolatima uključuju pege na žitaricama, trulež korena jagode, šećerne repe, povrtarskih biljaka i mnogih drugih domaćina (**Carling and Sumner**, 1992). Ove vrste imaju teleomorf koji je svrstan u rod *Ceratobasidium*. **Rogers** (1935; loc. cit. **Garcia et al.**, 2006) prvi je predložio rod *Ceratobasidium* (Ceratobasidiaceae, Ceratobasidiales, Basidiomycota) koji je obuhvatio četiri vrste i to *C. calosporum* Rogers, kao tipičnu vrstu, *C. kukuruzigerum* (Bourd.) Rogers, *C. sterigmaticum* (Bourd.) Rogers i *C. obscurum* Rogers. Neke od ovih vrsta deo su kompleksne mešavine starih rodova *Corticium* ili *Hipochnum*. **Martin** (1948; loc. cit. **Garcia et al.**, 2006) svrstava rod *Ceratobasidium* u familiju Ceratobasidiaceae. Karakteristika teleomornog roda *Ceratobasidium* je da formira uniformne loptaste bazide u grupama, sa 2 do 8 sterigmi (**Gonzalez et al.**, 2016), direktno na bazalnim hifama (**Rogers**, 1935 loc. cit. **Garcia et al.**, 2006). Somatske hife *Ceratobasidium* roda su uže (oko 10 µm u prečniku) od somatskih hifa roda *Thanathephorus* (**Garcia et al.**, 2006). Rod *Ceratobasidium* poseduje jedinstven doliporseptalni aparat sa neprekidnim parentosomama, dok svi ostali rodovi imaju parentosome sa prekidima (**Oberwinkler et al.**, 2013). Obuhvata saprobne, simbiotske, pa čak i parazitske vrste. Većina vrsta su opisane kao saprobi u zemljištu ili na biljnim ostacima, ili su sastavni deo gljivične komponente mikoriza. Mali broj taksona su paraziti zeljastih biljaka, ali su neki od njih od velikog ekonomskog interesa (**Garcia et al.**, 2006). Postoji mali broj jednojedarnih vrsta koje se ne mogu svrstati ni u jednu anastomoznu grupu. **Hietala et al.** (2001) opisali su patogenu jednojedarnu vrstu izolovanu sa korena četinarara. Kasnije su molekularne metode povezale ovu jednojedarnu vrstu sa teleomorfom *Ceratobasidium* i to sa vrstom *C. bicorne*. **Otero et al.** (2002) opisali su mikoriznu grupu predstavnika roda *Rhizoctonia*, sa jednojedarnim i dvojedarnim izolatima koja je pripala rodu *Ceratobasidium*, a nije srodna sa ranije opisanim jednojedarnim izolatima.

Klasifikacija u okviru kompleksne dvojedarne vrste *Rhizoctonia* spp. Izolati *Rhizoctonia* spp. u literaturi se navode zbirno sa zajedničkim anamorfnim imenom, a dalje su na osnovu njihove anastomozne reakcije grupisani u 23 anastomozne grupe: od AG-A do AG-S (**Sneh et al.**, 1991), uključujući AG-T i AG-U (**Hyakumachi et al.**, 2005), AG-V (**Dong et al.**, 2017) i AG-W (**Yang et al.**, 2015b; **Zhao et al.**, 2019a).

Rhizoctonia spp. AG-A predstavlja rasprostranjenu grupu izolata koja prouzrokuje trulež korena i propadanje većeg broja biljaka domaćina, među kojima se izdvajaju jagoda, šećerna repa, suncokret i veliki broj povrtarskih biljaka. Izolati iz ove grupe mogu biti i mikorizni (**Mazzola**, 1997; **Sneh et al.**, 1998). Na jagodi su pored ove AG još značajne i AG-G i AG-I, koje su po nekim autorima zajedno sa AG-A odvojene u zasebnu vrstu *Rhizoctonia fragariae* (**Martin**, 2000; **Sharon et al.**, 2007; **Fang et al.**, 2013).

Rhizoctonia spp. AG-B obuhvata prouzrokovače pegavosti i propadanja uglavnom trava i na osnovu morfoloških karakteristika podeljena je na tri podgrupe AG-Ba, AG-Bb i AG-Bc (**Sneh et al.**, 1998).

Rhizoctonia spp. AG-C predstavlja slabo zastupljenu i manje značajnu grupu izolata, koji mogu živeti i mikorizno. Mogu se javiti na šećernoj repi, detelini i pšenici, ali se ne smatraju značajnim patogenima (**Sneh et al.**, 1998; **Hayakawa et al.**, 1999).

Rhizoctonia spp. AG-D obuhvata grupu prouzrokovača dijamantskih pega, snežne plesni, truleži korena i stabla, lezija na stablu, kao i propadanja biljaka koje se može uočiti u vidu proređenih mesta u usevima. Uglavnom mogu zaražavati trave i povrtarske biljke. Podeljena je na osnovu razlike u ITS regionu DNA na tri podgrupe AG-DI, AG-DII i AG-DIII (**Sneh et al.**, 1998; **Hayakawa et al.**, 2006).

Rhizoctonia spp. AG-E predstavlja slabije rasprostranjenu grupu izolata koja uključuje patogene i nepatogene, kao i simbiotske izolate. Opisuju se kao prouzrokovači mrežavosti i propadanja

sejanaca. Napadaju veliki broj povrtarskih biljaka, zatim šećernu repu, rododendron, bor i raž (**Sneh et al.**, 1998).

Rhizoctonia spp. AG-F predstavlja rasprostranjenu grupu koja je dalje podeljena na osnovu nukleotidnih razlika u ITS regionu DNA na dve podgrupe AG-Fa i AG-Fb. Prouzrokuju trulež korena, a mogu se javiti i na povrtarskim biljkama, pamuku, jagodi i šećernoj repi (**Demirci and Doken**, 1995; **Sneh et al.**, 1998; **Eken and Demirci**, 2004; **Sharon et al.**, 2007; **Woodhall et al.**, 2020b).

Rhizoctonia spp. AG-G predstavlja veoma rasprostranjenu grupu koja izaziva propadanje i trulež korena velikog broja biljaka među kojima su povrtarske biljke, ali i jagoda i suncokret (**Mazzola**, 1997; **Sneh et al.**, 1998; **Leclerc et al.**, 1999; **Fenille et al.**, 2005; **Molaei et al.**, 2014; **Jiang et al.**, 2015). Nepatogeni predstavnici ove grupe opisani su kao biološki agensi u zaštiti mladih sejanaca pasulja od truleži korena koju prouzrokuje *R. solani* AG-4 (**Leclerc et al.**, 1999).

Rhizoctonia spp. AG-H predstavljaju malo rasprostranjenu grupu izolata sa mikoriznim načinom života (**Hayakawa et al.**, 1999).

Rhizoctonia spp. AG-I prouzrokuju trulež korena i opisane su na jagodi, šećernoj repi, pšenici i jabuci. Pojedini predstavnici javljaju se u mikorizama (**Mazzola**, 1997; **Sneh et al.**, 1998; **Ravanlou and Banhashemi**, 2002).

Rhizoctonia spp. AG-J obuhvata izolate za koje je utvrđeno da se morfološki razlikuju od ostalih *Rhizoctonia* spp. po tome što formiraju klamp konekcije, kao strukture koje nisu karakteristične za rod *Rhizoctonia*. Zbog toga se ovi izolati više ne svrstavaju u rod *Rhizoctonia* već u familiju Tulasnellaceae (**Sneh et al.**, 1998).

Rhizoctonia spp. AG-K predstavljaju malo rasprostranjenu grupu koja prouzrokuje manje štete na povrtarskim biljkama, jagodi i šećernoj repi (**Demirci**, 1998; **Sneh et al.**, 1998; **Ravanlou and Banhashemi**, 2002). U istraživanjima **Veldre** (2011) utvrđeno je da je AG-K podgrupa AG-A, tako da je i ova AG danas reklasifikovana.

Rhizoctonia spp. anastomoznih grupa AG-L, AG-N, AG-O, AG-Q nisu opisane kao patogeni, već sadrže mikorizne izolate (**Mazzola**, 1997; **Sneh et al.**, 1998).

Rhizoctonia spp. AG-P predstavljaju manje zastupljenu i slabije rasprostranjenu grupu koja prouzrokuje crnu trulež nekih ukrasnih biljaka (**Sneh et al.**, 1998; **Yang et al.**, 2006a; **Jiang et al.**, 2015).

Rhizoctonia spp. AG-R predstavljaju malo rasprostranjenu grupu koja prouzrokuje sužavanje i prelamanje stabla povrtarskih biljaka i đumbira (**Sneh et al.**, 1998; **Yang et al.**, 2006a; **Yang et al.**, 2008; **Jiang et al.**, 2015).

Rhizoctonia spp. AG-S predstavljaju malo zastupljenu i slabo patogenu grupu koja može da prouzrokuje propadanje korena trava (**Demirci**, 1998; **Sneh et al.**, 1998).

Rhizoctonia spp. AG-T i AG-U su dve grupe koje su prvobitno opisane kao prouzrokovači truleži stabla i korena minijaturnih ruža, a AG-U i kao patogen krompira, luka i mrkve (**Hyakumachi et al.**, 2005; **Yang et al.**, 2014). U istraživanjima **Sharon et al.** (2008) utvrđeno je da AG-T pripada AG-A, tako da je reklasifikovana.

Rhizoctonia spp. AG-V predstavlja nedavno opisanu grupu koja izaziva propadanje ukrasnih biljaka i đumbira (**Dong et al.**, 2017).

Rhizoctonia spp. AG-W je nedavno opisana grupa koja izaziva propadanje stabla krompira i trulež i propadanje sejanaca šećerne repe (**Yang et al.**, 2015a; **Zhao et al.**, 2019b).

2.6.2. Klasifikacija višejedarnih vrsta roda *Rhizoctonia* (teleomorf *Thanatephorus* i *Waitea*)

Višejedarne vrste roda *Rhizoctonia* su na osnovu anastomoznih reakcija klasifikovane u 14 AG gde pripada vrsta *R. solani* koja ima teleomorf u rodu *Thanatephorus* i u pet varijeteta gde pripadaju vrste *R. zaeae*, *R. circinata* i *R. oryzae* koje imaju teleomorf u rodu *Waitea*. **Donk**, 1956 (loc. cit. **Roberts**, 1999) opisao je rod *Thanatephorus* (Ceratobasidiaceae, Ceratobasidiales, Basidiomycota) koji obuhvata teleomorfne faze vrste *R. solani*. Prihvaćeno je da se *Thanatephorus* odnosi na mnoge parazitne gljive sa karakterističnim želatinoznim basidiomatama i himenijumom sastavljenim od nekoliko slojeva bazida (**Roberts**, 1999). Rod *Thanatephorus* karakteriše prisustvo kratkih sterigmi na bazidima koje nose ovalne ili široke, prozirne bazidiospore (**Mordue**, 1974 loc. cit. **Gonzalez et al.**, 2006). Zbog malog broja morfoloških osobina pogodnih za identifikaciju, u literaturi se tokom istorije javljalo više sinonima roda *Thanatephorus*, kao što su rodovi *Ipsilonidium* Donk, *Cejpomices* Svrcek i Pouzr, *Akuathanatephorus* K. Z. Tu i Kimbr. i *Tofispora* G. Langer (**Garcia et al.**, 2006). Anamorfni rod *Moniliopsis* Ruhland bio je predložen za vrste slične *Rhizoctonia* spp. sa teleomorfima koji pripada rodu *Thanatephorus* i *Waitea* (**Moore**; 1987 loc. cit. **Garcia et al.**, 2006). Teleomorfni rod *Waitea* (anamorfi *R. zaeae* i *R. oryzae*) obuhvata vrste koje imaju parazitni i saprobni način života, prvi put opisan u Australiji 1962. godine sa vrstom *Waitea circinata* Warcup and Talbot (**Gurkanli et al.**, 2016). Karakterišu ih hife bez klamp konekcija i grananje pod pravim uglom. Subhimenialne i himenijalne hife imaju tanke zidove, himenijum je zadebljao i sastoji se od bazida. Na njima se prvo formiraju probazidijalna bočna proširenja sa kratkim sterigmama, na kojima se formiraju bazidiospore sa poprečnim pregradama (**Roberts**, 1999). Ontogeneza i morfologija ovog teleomorfa razlikuje se od *Thanatephorus-Ceratobasidium* kompleksa.

Klasifikacija u okviru kompleksne višejedarne vrste *Rhizoctonia solani* - Izolati *Rhizoctonia solani* u literaturi se navode zbirno sa zajedničkim anamornim imenom, a dalje su na osnovu njihove anastomozne reakcije grupisani u 14 anastomoznih grupa: od AG-1 do AG-10 uključujući i AG BI (premošćujući izolati, eng. bridging isolates) (**Sneh et al.**, 1991), AG-11 (**Carling et al.**, 1994), AG-12 (**Carling et al.**, 1999) i AG-13 (**Carling et al.**, 2002b).

R. solani AG-1 obuhvata izolati koji su rasprostranjeni širom sveta i ispoljavaju sposobnost hifalne anastomoze samo sa drugim izolatima AG-1. U okviru ove grupe izolati su podeljeni na osnovu morfologije kolonije, patogenosti i DNA homologije na sedam podgrupa od IA do IG (**Sneh et al.**, 1991).

- ❖ Izolati *R. solani* AG-1 IA izazivaju simptome koji uključuju sušenje listova, mrežavost, trulež prizemnog dela stabla, a sve to prati proređenost useva. Izolati ove podgrupe karakteriše širok krug domaćina, uključujući povrtarske biljke i veliki broj trava. Izolati podgrupe *R. solani* AG-1 IA karakteriše formiranje sklerocija dimenzija 1 do 3 mm, ispoljavanje niskog nivoa sličnosti u ITS regionu DNA sa članovima AG-1 IB grupe i za razvoj zahtevaju višu temperaturu u poređenju sa izolatima AG-1 IB grupe. Ova grupa napada uglavnom nadzemne delove biljaka (**Anderson**, 1982; **Carling and Sumner**, 1992; **Sneh et al.**, 1998; **Fenille et al.**, 2002; **Naito**, 2004; **Bernardes de Assis et al.**, 2008; **Hua et al.**, 2014).
- ❖ Izolati *R. solani* AG-1 IB izazivaju sušenje listova, mrežavost, trulež korena i propadanje biljaka. Ugrožavaju veliki broj povrtarskih i ukrasnih biljaka, kao i trave, a izolovani su i iz borova i čempresa. Članove ove grupe karakteriše obrazovanje sklerocija (prečnika oko 1 mm) i tendencija zaražavanja nadzemnih delova biljaka (**Carling and Sumner**, 1992; **Sneh et al.**, 1998; **Naito**, 2004).
- ❖ Izolati *R. solani* AG-1 IC izazivaju simptome sušenja, propadanja i truleži korena. Napadaju veliki broj različitih biljaka, među kojima se izdvajaju šećerna repa, mrkva, heljda, lan, soja, pasulj, kupus, ananas, proso, spanać i rotkvica. Formiraju sitne sklerocije (**Ogoshi**, 1987; **Sneh et al.**, 1991; **Carling and Sumner**, 1992; **Sneh et al.**, 1998; **Naito**, 2004).
- ❖ Izolati *R. solani* AG-1 ID su slabo rasprostranjeni i prouzrokuju pegavost, a do sada su opisani samo na kafi i kupusu (**Priyatmojo et al.**, 2001b; **Hua et al.**, 2014).

- ❖ Izolati *R. solani* AG-1 IE prouzrokuju sušenje biljaka, slabo su proučeni i rasprostranjeni. Opisani su samo kao patogeni pasulja (**Godoy-Lutz et al.**, 2008). Po novijim istraživanjima čak se svrstavaju u podgrupu *R. solani* AG-1 IA (**Veldre**, 2011).
- ❖ Izolati *R. solani* AG-1 IF zajedno sa *R. solani* AG-1 IE predstavljaju malo zastupljenu grupu i takođe prouzrokuju sušenje biljaka pasulja (**Godoy-Lutz et al.**, 2008).
- ❖ Izolati *R. solani* AG-1 IG predstavlja grupu koja je opisana nedavno sa malo podataka, osim da su patogeni kupusa, gde izazivaju pege na glavicama (**Hua et al.**, 2014).

R. solani AG-2 široko je rasprostranjena anastomozna grupa podeljena na pet podgrupa od AG-2-1 do AG-2-4 i AG-2-Bi, od kojih su neke heterogene i dalje podeljene na manje podjedinice (**Sneh et al.**, 1996; **Carling et al.**, 2002a). Članovi ove grupe imaju sposobnost hifalne anastomoze sa članovima AG-2 i AG-BI, kao i nekim od članova AG-8. AG-2 je poznata kao heterogena grupa i utvrđeno je da nije monofiletička. Podgrupe AG-2-1 i AG-2-2 su monofiletičke (**Gonzalez et al.**, 2016).

- ❖ Izolati *R. solani* AG-2-1 održavaju se u zemljištu i izazivaju propadanje biljaka, sušenje listova, trulež korena, trulež prizemnog dela stabla i propadanje pupoljaka. Napadaju veliki broj biljaka domaćina među kojima su i povrtarske i industrijske biljke (**Satoh et al.**, 1997; **Sneh et al.**, 1998; **Rollins et al.**, 1999; **Naito**, 2004; **Stodart et al.**, 2007; **Pannecouque and Höfte**, 2009; **Budge et al.**, 2009b).
- ❖ Izolati *R. solani* AG-2-2 dalje se svrstavaju u četiri odgajivačka tipa (eng. cultural types), odnosno niže taksonomske jedinice (2-2 IIIB, 2-2 IV, 2-2 LP, 2-2 WB) na osnovu patogenosti i morfoloških karakteristika (**Ogoshi**, 1987; **Hyakumachi et al.**, 1998; **Godoy-Lutz et al.**, 2008). AG-2-2 IIIB je patogen podzemih i nadzemnih organa biljaka i izaziva trulež korena, crnu krastavost, prstenastu trulež i sušenje stabla velikog broja ukrasnih i industrijskih biljaka i trava. Bolest se često manifestuje kao proređenost useva (**Sneh et al.**, 1998; **Naito**, 2004). AG-2-2 IV obuhvata patogene podzemnih i nadzemnih organa, a izazivaju sušenje listova, trulež korena i propadanje stabla (**Carling and Sumner**, 1992; **Carling et al.**, 2002a; **Sneh et al.**, 1998; **Naito**, 2004). Napada uglavnom povrtarske i industrijske biljke i trave. AG-2-2 LP ima sposobnost hifalne anastomoze sa članovima AG-2-IIIB i AG-2-2IV i predstavlja patogena koji prouzrokuju formiranje ogolelih mesta u usevima trava (**Hyakumachi et al.**, 1998). AG-2-2WB predstavlja malo rasprostranjenu grupu, koja je opisana samo na pasulju i izaziva sušenje lišća (**Godoy-Lutz et al.**, 2008).
- ❖ Izolati *R. solani* AG-2-3 su slabo zastupljena grupa, koja izaziva sušenje lišća i trulež korena soje i ječma (**Naito and Kanematsu**, 1994; **Sumner et al.**, 2003a).
- ❖ Izolati *R. solani* AG-2-4 takođe su malo zastupljena grupa koja izaziva trulež i propadanje kukuruza, šećerne repe i povrtarskih biljaka (**Sumner**, 1985; **Carling et al.**, 2002a; **Sumner et al.**, 2003b).
- ❖ Izolati *R. solani* AG-2BI obuhvataju nepatogene premošćujuće izolate koji imaju sposobnost anastomoze sa više anastomoznih grupa uključujući AG-2, AG-3, AG-6 i AG-8. Ustanovljeno je da se javljaju na susamu, slačici, jagorčevini, karanfilu, boraniji, bobu i rotkvici, gde uglavnom ne prouzrokuju štete (**Carling and Sumner**, 1992; **Carling et al.**, 2002b).

R. solani AG-3 predstavlja grupu veoma rasprostranjenih patogenih izolata koji se održavaju u zemljištu, tolerantni su na niske temperature i izazivaju crnu krastavost, lisne pege, koncentrične lisne pege i propadanje biljaka. AG-3 je podeljena na tri podgrupe na osnovu kruga domaćina: AG-3 PT koja napada krompir, AG-3 TM koja napada paradajz, AG-3 TB koja napada duvan. AG-3 se još može javiti i na šećernoj repi i pšenici (**Anderson**, 1982; **Carling and Sumner**, 1992; **Sneh et al.**, 1998; **Lehtonen et al.**, 2008; **Ferrucho et al.**, 2012; **Kankam et al.**, 2016).

R. solani AG-4 označava rasprostranjenu grupu patogena koji se održavaju u zemljištu i izazivaju trulež korena, trulež plodova, nekrozu stabla i sušenje biljaka. AG-4 se može javiti na velikom broju

biljaka, a podeljena je na tri podgrupe (HGI - HGIII) na osnovu izgleda sklerocija na PDA i sličnosti određenih fragmenata DNA. AG-4 HGIII proizvodi tamno smeđe sklerocije na PDA, dok podgrupe AG-4 HGI i AG-4 HGII, proizvode sklerocije svetlije boje (Baird, 1996; Sneh et al., 1998; Stevens-Johnk and Jones, 2001; Fenille et al., 2002; Ravanlou and Banihashemi, 2002; Kuramae et al., 2003; Naito, 2004; Sun et al., 2015; Pizolotto et al., 2020).

R. solani AG-5 predstavlja homogenu, manje rasprostranjenu grupu patogena koji se održavaju u zemljištu i izazivaju trulež korena, propadanje i crnu krastavost biljaka i proređivanje useva. Mogu se javiti na industrijskim, ratarskim i povrtarskim biljkama i predstavljaju vrlo značajne patogene bele lupine, soje, duvana, šećerne repe, krompira, pasulja, jagode i jabuke (Demirci, 1998; Sneh et al., 1998; Ravanlou and Banihashemi, 2002; Eken and Demirci, 2004; Naito, 2004).

R. solani AG-6 obuhvata izolate sa različitim načinom života, mada se ranije smatralo da ovu AG sačinjavaju samo mikorizni i nepatogeni izolati (Kuninaga et al., 1979; Kuninaga et al., 1997). Neki od novijih rezultata pokazali su da izolati AG-6 izazivaju trulež korena jabuke, pšenice, mrkve i karanfila, a podeljeni su na pet podgrupa HGI, GVI, GVII, GVIII, GVIV na osnovu razlika u homologiji DNA sekvenci (Mazzola, 1997; Sneh et al., 1998; Carling et al., 1999; Pope and Carter, 2001; Naito, 2004; Sharon et al., 2006; Jiang et al., 2015).

R. solani AG-7 predstavlja grupu slabo rasprostranjenih i manje značajnih patogena koji se održavaju u zemljištu. Mogu prouzrokovati trulež korena i propadanje različitih vrsta povrtarskih biljaka, kao što su krompir i lubenica (Carling and Sumner, 1992; Baird and Carling, 1995; Carling, 1996; Abd-Elsalam et al., 2009).

R. solani AG-8 obuhvata patogene koji se održavaju u zemljištu i koji izazivaju proređivanje i ogolela mesta u usevima žitarica. AG-8 je podeljena na podgrupe od AG 8-ZG1 do AG 8-ZG5 na osnovu razlika zimograma proteinskih profila (Naito and Kanematsu, 1994; Carling, 1996; Sneh et al., 1998; Priyatmojo et al., 2001a; Carling et al., 2002b; Naito, 2004; Jaffar et al., 2016).

R. solani AG-9 obuhvata slabo rasprostranjene patogene koji se održavaju u zemljištu i koji izazivaju crnu krastavost uglavnom krompira, kupusnjača, pšenice i ječma. Prema razlici u homologiji ITS regiona DNA i zahtevima za tiaminom podeljena je na dve podgrupe AG-9 TP (tiaminski prototrof) i AG-9 TX (tiaminski autotrof) (Carling and Sumner, 1992; Sneh et al., 1998; Naito, 2004).

R. solani AG-10 predstavlja malo rasprostranjenu i slabo patogenu grupu izolata, pre svega patogene ječma, pšenice i uljane repice (MacNish et al., 1995; Sneh et al., 1998; Schroeder and Paulitz, 2012). Neki izolati su hipovirulentni ili nepatogeni i proučavaju se za potencijalnu upotrebu u biološkoj kontroli (Sneh et al., 1998).

R. solani AG-11 predstavlja malo rasprostranjenu grupu i koja izaziva propadanje i trulež hipokotila trava i pasulja (Carling et al., 1994; Kumar et al., 2002; Woodhall et al., 2020a). U ovoj grupi opisani su i premošćujući izolati, koji imaju mogućnost anastomoze sa pripadnicima drugih anastomoznih grupa, kao što su AG-2-1, AG-2 BI, AG-8 (Carling, 1996).

R. solani AG-12 predstavlja mikoriznu i malo rasprostranjenu grupu izolata koja može prouzrokovati male štete na ukrasnom bilju, ali krompiru i ječmu (Carling et al., 1999; Pope and Carter, 2001; Kumar et al., 2002).

R. solani AG-13 je malo rasprostranjena grupa izolata koja retko izaziva štete na pamuku, salati i krompiru (Carling et al., 2002b).

Klasifikacija u okviru višejedarnih vrsta *Rhizoctonia zaeae*, *R. circinata*, *R. oryzae* i srodnih – Anamorfne vrste *Rhizoctonia zaeae*, *R. circinata*, *R. oryzae* imaju teleomorf u okviru rodu *Waitea* i danas se češće označavaju teleomorfim imenima. Teleomorfni rod *Waitea*, odnosno tipska vrsta *Waitea circinata* Warcup and Talbot prvi put je izolovana iz zemljišta u Australiji 1962. godine (Gurkanli et al., 2016), dok je anamorfni stadijum opisan ranije. Voorhees (1934) je opisao kao prouzrokovala sklerocijske truleži kukuruza u Floridi i imenovao ga kao *R. zaeae* Voorhees.

Nekoliko godina kasnije u Luizijani **Ryker and Gooch** (1938) su na pirinču opisali vrstu *R. oryzae*. Za ove dve vrste na osnovu hifalnih anastomoznih reakcija određene su dve AG: WAG-Z i WAG-O (**Oniki et al.**, 1985). **Gunnell** (1986) je opisao podelu vrste *W. circinata* na tri varijeteta: *circinata*, *zeae* i *oryzae*. Nakon toga opisana su dva dodatna varijeteta *agrotis* i *prodigus*, za koje nije opisan anamorfnu stadijum (**Toda et al.**, 2007; **Kammerer et al.**, 2011). Svih pet navedenih varijeteta opisani su na osnovu morfologije kolonija, porasta na različitim temperaturama i kruga domaćina, a taksonomija je potvrđena na osnovu biohemijskih i molekularnih metoda, uključujući analizu masnih kiselina i filogenetske analize zasnovane na 18S-28S rDNA-ITS nukleotidnim sekvencama (**Sharon et al.**, 2006; **de la Cerda et al.**, 2007; **Toda et al.**, 2007; **Kammerer et al.**, 2011; **Aydin et al.**, 2013). Sve gljive iz roda *Waitea* predstavljaju veoma značajne patogene uglavnom monokotiledonih biljaka i malog broja dikotiledonih biljaka. Trenutno se priznaju oba načina označavanja ovih izolata, po anamorfnom stadijumu kao *R. zeae*, *R. oryzae* i *R. circinata*, ili po teleomorfnom *W. circinata* var. *zeae*, *W. circinata* var. *oryzae*, *W. circinata* var. *circinata*. Dva novija varijeteta označavaju se po teleomorfnom stadijumu kao *W. circinata* var. *agrotis* i *W. circinata* var. *prodigus*.

Waitea circinata var. *zeae* (anamorf *Rhizoctonia zeae*) predstavlja rasprostranjeni varijetet koji prouzrokuje nekrozu korena, propadanje biljaka i sejanaca, kao i pojavu ogolelih mesta u usevu. Ima veoma širok krug domaćina uključujući monokotiledone biljke, kao što su kukuruz, pšenica, ječam, različite trave u sklopu različitih travnjaka, korove, kao i luk. Pored toga, ređe je opisana i kao patogen dikotiledonih biljaka, među kojima su pasulj, soja, grašak, mrkva, šećerna repa, duvan, a izolovana je iz zemljišta gde su gajene kafa ili soja kao prethodni usev (**Sumner and Bell**, 1982; **Martin and Lucas**, 1984; **Kuznia and Windels**, 1994; **Erper et al.**, 2005, 2006, 2011; **Ohkura et al.**, 2009; **Oros et al.** 2013; **Mercado Cardenas et al.**, 2015; **Sharma-Poudyal et al.**, 2015; **Tewoldemedhin et al.**, 2015; **Blanco et al.**, 2018).

W. circinata var. *circinata* (povezan sa anamorfnom *R. circinata*) obuhvata značajne prouzrokovaoče bolesti trava i prouzrokuje trulež biljaka i pojavu ogolelih mesta u usevima monokotiledonih biljaka (**Toda et al.**, 2005).

W. circinata var. *oryzae* (povezan sa anamorfnom *R. oryzae*) predstavlja značajne prouzrokovaoče bolesti pirinča, ali i truleži korena monokotiledonih biljaka *Eremochloa ophiuroides* i *Stenotaphrum secundatum* (**Haygood and Martin**, 1990).

W. circinata var. *agrotis* je malo rasprostranjen varijetet koji prouzrokuje trulež korena. Za sada jedino detektovan kao patogen monokotiledonih biljaka *Agrotis stolonifera* i *Poa pratensis* (**Toda et al.**, 2007).

W. circinata var. *prodigus* je do sada opisan samo kao prouzrokovaoč truleži i nekroze korena monokotiledone vrste *Paspalum vaginatum* (**Kammerer et al.**, 2011).

2.7. Suzbijanje bolesti koje izazivaju vrste roda *Rhizoctonia*

Kontrola oboljenja koja prouzrokuju vrste roda *Rhizoctonia* je teška i komplikovana, pre svega zbog postojanosti tvorevina kojima se održava u zemljištu, ali i zbog širokog kruga domaćina i izraženog diverziteta. Problem u kontroli *Rhizoctonia* spp. predstavlja i nedostatak otpornih sorti i nedovoljan broj efikasnih fungicida i njihova skupa primena. Zbog svega navedenog, u suzbijanju bolesti koje prouzrokuju vrste roda *Rhizoctonia* koriste se agrotehničke, fizičke, hemijske i biološke mere. Bez dobre organizacije mera dolazi do povećanja nivoa inokuluma u zemljištu, što dovodi do značajnog smanjenja prinosa biljaka.

Agrotehničke mere. Zdrav sadni materijal, dobra aeracija površine zemljišta i biljaka u zaštićenom prostoru, kao i trogodišnji plodored predstavljaju osnovne mere borbe protiv *Rhizoctonia* spp. Važnu meru predstavlja i uništavanje zaraženih biljnih ostataka, jer je to jedan od načina njihovog održavanja (**Sneh et al.**, 1991). Mnoge korovske biljke su domaćini *Rhizoctonia* spp., tako da je neophodno njihovo suzbijanje. Posebnu pažnju neophodno je posvetiti upotrebi čiste opreme i alata,

kao i detaljnom čišćenju mehanizacije između parcela, zato što se sa ostacima zemljišta na točkovima može preneti i inokulum (**Katan**, 2000).

Fizičke mere. Sterilizacija zemljišta pregrejanom vodenom parom i solarizacija predstavljaju mere kontrole koje mogu biti pogodne u sprečavanju pojave bolesti koje prouzrokuju *Rhizoctonia* spp., ali su često neisplative na velikim površinama. Dodatni problem predstavlja i brza rekolonizacija dezinfikovanog zemljišta različitim patogenim organizmima, uključujući i *Rhizoctonia* spp. usled nedostatka konkurencije (**Tsror**, 2010). Preporučuje se i malčiranje zemljišta, koje može da spreči dospevanje inokuluma *Rhizoctonia* spp. nošenog vetrom.

Hemijske mere. Dezinfekcija zemljišta primenom različitih uglavnom hemijskih fungicida najefikasniji je način suzbijanja vrsta roda *Rhizoctonia*. Najčešće primenjivani fumigant je svakako metil bromid, koji je zbog štetnog uticaja na ozonski omotač zabranjen usvajanjem Montrealskog Protokola 1992. godine (**Watson et al.**, 1992). U svetu se mnogo pažnje poklanja iznalaženju alternativnih jedinjenja, kao što su metil izotiocijanat, 1,3 dihloropropen, dazomet, metil jodid, propargil bromid, ozon, formaldehid i anhidrisani amonijak (**Tsror**, 2010). Za suzbijanje gljiva koje se održavaju u zemljištu u Srbiji je dozvoljena samo upotreba dazometa za dezinfekciju zemljišta (**Tim priređivača**, 2020). Za kontrolu gljiva iz roda *Rhizoctonia* kod nekih vrsta povrća dostupni su fungicidi. **Utiamada et al.** (2000) utvrdili su dobru efikasnost preparata iz grupe benzimidazola na bazi tiofanat-metila u suzbijanju vrsta roda *Rhizoctonia*. **Campion et al.** (2003), **Tsror** (2010), **Muzhinji et al.** (2018) navode tolkofos metil, fludioksinil, iprodion, fluotalonil, azoksistrobin, pensikuron, fenpiklonil i imazalid kao najefikasnije fungicide u suzbijanju vrsta roda *Rhizoctonia*. Nijedna od ovih supstanci, međutim, nije registrovana za suzbijanje *Rhizoctonia* u Srbiji (**Tim priređivača**, 2020).

Biološke mere. Mogućnost primene različitih bioloških agenasa u kontroli *Rhizoctonia* spp. privlači sve više pažnje i predstavlja značajno polje istraživanja. Nekoliko kategorija mikroorganizama, kao što su gljive, bakterije, mikofagne nematode i mikovirusi parazitiraju vrste roda *Rhizoctonia*. Mikovirusi često napadaju vrste roda *Rhizoctonia* a mikovirusne infektivne dvolančane RNA se šire kroz anastomoze, sa inficiranih hipovirulentnih *Rhizoctonia* spp. do zdravih smanjujući njihovu sposobnost da prežive i izazovu oboljenje biljaka. Iako su različiti dsRNA elementi detektovani u prirodnoj populaciji *Rhizoctonia* spp., samo nekoliko mikovirusa je okarakterisano. Kod *R. solani* AG-3 detektovana su dva dsRNA molekula M1 i M2, gde je M1 je filogenetički povezan sa biljnim virusima roda *Bromovirus* i ima uticaj na povećanje virulentnosti, dok je M2 povezan sa virusima roda *Mitovirus* i ima sposobnost izazivanja hipovirulentnosti (**Jian et al.**, 1998; **Lakshman et al.**, 1998). Iz *R. solani* AG-2 i *R. solani* AG-1 IC izolovani su hipovirulentni sojevi virusa koji pripadaju familiji *Partitiviridae* (**Strauss et al.**, 2000; **Zheng et al.**, 2013).

Mogućnost primene vrsta roda *Trichoderma* u suzbijanju vrsta roda *Rhizoctonia*. U biološkoj kontroli vrsta roda *Rhizoctonia* najčešće se koriste gljive iz roda *Trichoderma*, koje predstavljaju kosmopolitski rasprostranjen rod gljiva, u okviru koga su brojne vrste ispoljile veliki potencijal kao agensi biološke kontrole. Mogu se naći u brojnim poljoprivrednim zemljištima, ali i u supstratima kao što je trulo drvo (**Druzhinina and Kubicek**, 2005). Ovaj rod proizvodi veliki broj sekundarnih metabolita i proizvodi brojne tipove interakcija sa biljnim patogenima uključujući i mikoparazitizam, što ga čini dobrim kandidatom za primenu u vidu formulisanih bioloških fungicida (**Brewer and Larkin**, 2005). Neki od metabolita koje luče gljive iz ovog roda su neorganski fosfor, indolsirćetna kiselina i siderofore. Poznato je da ove gljive luče i antibiotike, kao što su gliotoksin, glioviridin, viridin i trihoviridin. Interesantno je da poseduju sposobnost stimulisanja rasta biljaka, čime podstiču njihovu otpornost na neke patogene (**Druzhinina et al.**, 2011). Sa druge strane, interakcije sa patogenima antagonističke prirode su kompeticija za prostor i hranu (**Anees et al.**, 2011). U studijama o biološkoj kontroli ovim vrstama ističu se *Trichoderma viridae*, *T. harzianum*, *T. virens*, *T. atroviridae*, *T. asperelum*, *T. ligorum*, *T. saturnisporum* i druge. Komercijalna upotreba ovih vrsta kao biofungicida zahteva identifikaciju, kako same vrste, tako i specifičnog odnosa sa patogenom. Naročito problem može da predstavlja i često složena formulacija

preparata. Prednosti upotrebe ovih vrsta u suzbijanju fitopatogenih predstavnika su brojne. Uključuju pre svega smanjenje upotrebe hemijskih fungicida, kao i mogućnost primene u organskoj proizvodnji. Međutim, postoji i nekoliko ograničavajućih faktora u primeni biofungicida, a to su sporije delovanje, ograničena i neujednačena efikasnost, osetljivost na spoljašnje faktore i slabija postojanost u zemljištu (Abbas et al., 2017).

2.8. Proučavanja vrsta roda *Rhizoctonia* u Srbiji

U Srbiji se do danas veći broj istraživača bavio problematikom kompleksnog roda *Rhizoctonia* na nekoliko izdvojenih useva. Oboljenja koja prouzrokuju vrste roda *Rhizoctonia* redovno se javljaju na velikom broju biljaka u Srbiji, što govori o njihovom značaju, ali i potrebi za ovim istraživanjima. Neophodan je detaljniji uvid u prisustvo, rasprostranjenost i krug domaćina vrsta roda *Rhizoctonia*, kao i odgovor na brojna nerazrešena epidemiološka pitanja. Suzbijanjem vrsta roda *Rhizoctonia* na različitim vrstama povrtarskih biljaka bavili su se **Aleksić i Aleksić** (1976), **Jovićević** (1976), **Jasnić i Marić** (1978). Istraživanja **Vico** (1992; 1994a; 1994b; 1997) prva uvode koncept anastomoznih grupa za identifikaciju *Rhizoctonia* spp. u Srbiji. **Vico** (1997) i **Vico et al.** (2002) i **Vojvodić et al.** (2018a, 2018b) se u svojim istraživanjima bave dvojedarnim vrstama roda *Rhizoctonia* na jagodi, soji i lucerki, gde su detektovane dvojedarne *Rhizoctonia* spp. AG-A i AG-I na jagodi i višejedarne *R. solani* AG-2-2 IV na lucerki i krompiru i *R. solani* AG-1 IA na soji. **Vojvodić et al.** (2018a, 2018b) u svojim istraživanjima u okviru ove disertacije prvi put u Srbiji potvrđuju prisustvo *Rhizoctonia* spp. AG-A na jagodi molekularnim metodama, a takođe u filogenetskim analizama dokumentovano je i prisustvo diverziteta u okviru navedene AG. Poslednjih godina povećano je interesovanje za vrste *Rhizoctonia* koje prouzrokuju oboljenja na šećernoj repi. **Stojšin et al.** (2005, 2006), **Vico et al.** (2006), **Stojšin et al.** (2011) i **Vojvodić et al.** (2019a, 2019b, 2019c) u okviru ove disertacije navode da su višejedarne vrste *R. solani* AG-2-IIIB, AG-2-2IV i AG-4 HGII, prouzrokovaci mrke truleži korena, veoma zastupljene na poljima šećerne repe širom autonomne pokrajine Vojvodine i predstavljaju jedan od najznačajnijih prouzrokovaca bolesti šećerne repe. **Vojvodić et al.** (2019a, 2019b, 2019c) u svojim istraživanjima prvi put upotrebom qPCR metode i upotrebom specifičnih prajmera za pojedinačne AG potvrđuju prisustvo *R. solani* AG-2-2 na šećernoj repi. U Srbiji je detektovano i prisustvo *W. circinata* var. *zeae*, na kupusu i uljanoj repici, gde je izazivala nekrozu i propadanje biljaka, čime je ukazano na širenje kruga domaćina sa monokotiledonih biljaka na dikotiledone domaćine (**Vojvodić et al.**, 2020).

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

U našoj zemlji poslednjih godina učestala je pojava simptoma truleži korena i propadanja biljaka koji odgovaraju onima koje izazivaju *Rhizoctonia* spp. na brojnim domaćinima, uključujući industrijske, povrtarske i voćarske vrste. Diverzitet i postojanje brojnih AG kako dvojedarnih, tako i višejedarnih vrsta roda *Rhizoctonia*, kao i oskudni podaci iz Srbije, uglavnom starijeg datuma, koji su se odnosili na mali broj biljaka domaćina, najvažniji su razlozi istraživanja u okviru ove disertacije. Zbog toga su u okviru ove disertacije postavljeni ciljevi da se:

- prouči prisustvo ovih kompleksnih vrsta u Srbiji;
- pravilno odredi taksonomsko mesto izolata iz Srbije na osnovu anastomoznog uparivanja, morfoloških, patogenih i molekularnih osobina;
- dokaže prisustvo različitih AG, rasprostranjenost i značaj pojedinih AG prouzrokovaca truleži korena različitih biljaka u Srbiji;
- ispita rasprostranjenost ranije detektovanih AG, ali i prisustvo novih AG za Srbiju i uporedi sa njihovim prisustvom i domaćinima u svetu;
- dobije uvid u varijabilnost, virulentnost pojedinih izolata, kao i prevalenciju na teritoriji Srbije;
- prouči eksperimentalni kruga domaćina različitih AG *Rhizoctonia* spp. koji će dodatno doprineti njihovoj biološkoj karakterizaciji;
- analizom šest genskih markera izolata, dobiju prvi podaci o filogenetskim i mogućim biogeografskim međuodnosima izolata iz Srbije i ostalih delova sveta.

Ova disertacija ima i značajne praktične ciljeve koji će doprineti unapređenju gajenja brojnih domaćina vrsta roda *Rhizoctonia* među kojima su najvažniji da se:

- unaprede dijagnostičke metode i mere suzbijanja na ekološki prihvatljiv način;
- doprinese poboljšanoj dijagnostici razvojem protokola za direktnu specifičnu detekciju pojedinih AG primenom konvencionalne i qPCR metode;
- prouči mogućnost izolacije i primene biološkog agensa za suzbijanje različitih dvojedarnih i višejedarnih AG *Rhizoctonia* spp.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Pregled terena i sakupljanje uzoraka

U periodu od 2013. do 2020. godine obavljen je pregled terena i sakupljanje uzoraka zaraženih biljaka koje su ispoljavale karakteristične simptome oboljenja. Ukupno je pregledano 22 useva na 15 lokaliteta raspoređenih u sedam okruga i šest partija krompira (Slika 1). Pregledani su zasadi ili usevi različitih domaćina, voćarskih, ratarskih, povrtarskih i industrijskih biljaka u kojima je na osnovu obaveštenja proizvođača ustanovljeno prisustvo biljaka sa simptomima koji su ukazivali na zarazu vrstama roda *Rhizoctonia*, kao i šest partija krtola krompira sa zelenih pijaca. Ukupno je pregledano 13 useva jednogodišnjih biljaka i devet zasada voćaka koji su bili različite starosti i površine i sakupljeno 330 uzoraka (Tabela 2). Na svakom lokalitetu uziman je različit broj uzoraka (najčešće 3-15), u zavisnosti od raznovrsnosti simptoma i veličine useva odnosno zasada. U partijama krompira pregledano po 100 krtola po partiji, a uzimani su uzorci sa simptomima. Uzorak se sastojao od jedne biljke sa karakterističnim simptomima. Uzorci su obeležavani, pakovani u plastične kese, transportovani u ručnom frižideru do Laboratorije za biljnu virusologiju i mikologiju, Katedre za fitopatologiju, Instituta za fitomedicinu, Poljoprivrednog fakulteta - Univerziteta u Beogradu, gde su smešteni u frižider na 4°C i obrađeni najkasnije 48 h od dopremanja.



Slika 1. Geografski raspored lokaliteta obuhvaćenih istraživanjima na teritoriji Republike Srbije na kojima je dokazano prisustvo *Rhizoctonia* spp.

Tabela 2. Podaci o lokalitetima i biljkama domaćinima uključenim u istraživanja na teritoriji Republike Srbije

Godina	Okrug	Lokalitet	Biljka domaćin	Sorta
2013	Bačka	Subotica	jagoda	Camarosa
2015	Srem	Krčedin	jabuka	Greny Smith
	Srem	Vašica	šećerna repa	nepoznata
	Srem	Adaševci	šećerna repa	nepoznata
2016	Beograd	Beograd	jagoda	Asia
	Jablanički	Togočevce	paradajz	nepoznata
	Bačka	Novi Sad	jagoda	Senga Sengana
	Zaječarski	Zaječar	jabuka	Modi
	Bačka	Futog	mrkva	Bolero
	Srem	Zelena pijaca (Zemun)	krompir	nepoznata
2017	Pomoravski	Paraćin	paprika	Dukat
	Beograd	Mladenovac	trešnja	nepoznata
	Bačka	Futog	pasulj	nepoznata
	Bačka	Futog	kupus	Srpski melez
	Bačka	Rimski Šančevi	kupus	Srpski melez
	Bačka	Rimski Šančevi	uljana repica	NS-Zorica
	Bačka	Rimski Šančevi	paprika	nepoznata
2018	Srem	Zelena pijaca (Zemun)	krompir	nepoznata
	Rasinski	Kruševac	jagoda	Roxana
	Rasinski	Kruševac	malina	Polana
	Rasinski	Mačkovac	paprika	Klaudis
	Srem	Šid	jagoda	Senga Sengana
2019	Srem	Zelena pijaca (Zemun)	krompir	nepoznata
2020	Beograd	Beograd	jednogodišnja livadarka	nepoznata

4.2. Izolacija patogena i dobijanje izolata vrha hifa

Izolacija patogena obavljena je primenom standardnih fitopatoloških metoda, isecanjem fragmenata tkiva sa prelaza između zdravog i zaraženog dela korena, korenovog vrata ili stabla, u zavisnosti od biljke domaćina. Sa svakog uzorka uzimano je po deset fragmenta (prečnika 5 mm) koji su zatim ispirani mlazom česmenske vode u trajanju od 2 h. Fragmenti su površinski sterilisani potapanjem u u 2% rastvor natrijum hipohlorita (NaOCl, 1:1 komercijalna varikina) u trajanju od 1-1,5 min nakon čega su isprani u sterilnoj destilovanoj vodi, a višak vode upijen je sterilnim filter papirom. Isečci su sušeni na vazduhu u laminarnoj komori u trajanju od 20 minuta i postavljeni u Petri kutije sa sterilnom podlogom od krompir-dekstroznog agara (potato dextrose agar, PDA). Podloga je pripremana od 200 g krompira, 20 g dekstroze (Dectrose, Torlak, Institut za imunobiologiju i virusologiju, Beograd), 17 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). Zasejane Petri kutije inkubirane su u termostatu na temperaturi od 24°C, u trajanju od tri dana, u uslovima mraka. Kolonije gljiva koje su se razvile oko fragmenta biljnog tkiva, koje su morfološki odgovarale opisu *Rhizoctonia* spp., presejane su na svežu PDA. Tako dobijene čiste kulture kolonija presejavane su na vodeni agar (water agar, WA) radi dobijanja izolata vrha hife. Podloga je pripremana od 17 g agara (Agar–agar, Torlak, Institut za imunobiologiju i virusologiju, Beograd) i 1 l destilovane vode (Dhingra and Sinclair, 1986). Zasejane WA inkubirane su na temperaturi od 24°C u trajanju od 12 h, a potom su mlade hife posmatrane pod mikroskopom u aseptičnim uslovima. U kulturi svakog pojedinačnog izolata, odabran je i isecan vrh hifa u čijoj blizini nije uočeno prisustvo drugih hifa i presejan na svežu PDA. Dobijene kolonije izolata vrha hife (eng. hyphal-tip isolates) prebacivane su u sterilne epruvete sa zakošenom PDA i čuvane u kolekciji u frižideru na 4°C. Ponovno presejavanje ovako formirane kolekcije izolata obavljano je svakih šest meseci.

Izolati su na osnovu sličnosti u morfološkim osobinama grupisani u odgovarajuće morfološke grupe. Ukupno je formirano 11 različitih morfoloških grupa, za koje je ustanovljeno da ispoljavaju tip porasta i tip grananja hifa karakterističan za vrste roda *Rhizoctonia*. Iz svakog uzorka izdvojene su sve prisutne morfološke grupe i njihova preliminarna identifikacija potvrđena je sekvenciranjem ITS regiona ribozomalne DNA (Nuclear ribosomal internal transcribed spacer region). Na osnovu preliminarne identifikacije za dalja proučavanja odabran je najmanje po jedan izolat iz svake morfološke grupe, iz svakog useva ili zasada i sa svake biljke domaćina.

4.3. Provera patogenosti

Kako su ispitivani izolati *Rhizoctonia* spp. dobijeni sa različitih biljaka domaćina, izolovanih u različitim fenofazama razvoja, patogenost svakog izolata proverena je veštačkim inokulacijama na način koji je najbolje prilagođen prirodnim zarazama. Tako su veštačke inokulacije obavljene na pet različitih načina i to: inokulacijama sejanaca ili mladih vegetativno razmnoženih biljaka, inokulacijom odsečenih listova, inokulacijama lisnih peteljki i/ili inokulacijama fragmenata stabla ili celih krtola krompira. Za sve inokulacije korišćene su kolonije odabranih izolata starosti sedam dana, odgajene na PDA na temperaturi od 24°C, u uslovima mraka. Patogenost svih izolata testirana je primenom jedne ili češće više navedenih metoda, uz korišćenje odgovarajućih kontrola, odnosno odgovarajućih biljnih delova inkulisanih ili postavljenih u sterilne PDA. Radi zadovoljenja Koch-ovih postulata, bez obzira na primenjeni način provere patogenosti, kod svih inkulisanih test biljaka koje su razvile simptome izvršena je reizolacija korišćenjem istih metoda kao pri izolaciji.

Patogenost na sejancima različitih biljaka. Za 14 odabranih izolata dobijenih iz biljaka domaćina koje se mogu razmnožavati semenom, provera patogenosti obavljena je inokulacijom sejanaca. Korišćeno je seme paprike (*Capsicum annuum*) za odabrane izolate 137-17, 303-17, 190G-18 poreklom sa paprike, seme paradajza (*Lycopersicon esculentum*) za odabrani izolat 140-16 poreklom sa paradajza, seme pasulja (*Phaseolus vulgaris*) za odabrani izolat 296-17 poreklom sa

pasulja, seme šećerne repe (*Beta vulgaris*) za odabrane izolate 270-15 i 271-15 poreklom sa šećerne repe, seme uljane repice (*Brassica napus*) za odabrane izolate 300-17, 301-17 poreklom sa uljane repice, seme kupusa (*Brassica oleracea*) za odabrane izolate 299-17, 297-17 poreklom sa kupusa i seme mrkve (*Daucus carota*) za odabrane izolate 433-16, 443-16, 456-16 poreklom sa mrkve. Semena svih navedenih biljaka površinski su sterilisana potapanjem u 2% rastvor natrijum hipohlorita (NaOCl, 1:1 komercijalna varikina) u trajanju od 2 min nakon čega su isprani u sterilnoj destilovanoj vodi. Višak vode upijen je sterilnim filter papirom, a semena prosušena na vazduhu u laminarnoj komori u trajanju od 10 minuta. U epruvete 20x200 mm sa zakošenom sterilnom PDA (30 ml) postavljano je po jedno sterilno seme na sredinu površine zakošenog dela podloge i inkubirano 4-7 dana, u zavisnosti od vremena potrebnog za klijanje. Kada su sejanci biljaka dostigli fenofazu kotiledona sa vidljivim začetkom prvog pravog lista, na zakošenu podlogu, na udaljenost od 2 cm od sejanca, postavljen je fragment (prečnika 10 mm) kolonije odgovarajućeg izolata (modifikovana metoda **Mesiaen et al.**, 1959). Epruvete su u uspravnom položaju inkubirane sedam dana na 24°C. Kao negativna kontrola poslužili su sejanci inokulisani na isti način sterilnom PDA. Na sličan način rađena je provera patogenosti kod izolata poreklom sa biljaka jabuke. Za dva odabrana izolata 238-15 i 314-16, naklijavano je seme jabuke (*Malus domestica*) po metodi **Dolovac** (2011). Iz zrelih plodova sorte Crveni Delišes izdvajano je seme i na sobnoj temperaturi sušeno pet dana. Nakon sušenja, seme je pomešano sa vlažnim perlitom i inkubirano u zatvorenoj posudi na temperaturi od 4°C. Nakon perioda jarovizacije u trajanju od 60 dana, semena su na prethodno opisani način postavljana u epruvete na naklijavanje. Ceo ogled sa svim biljkama domaćinima izveden je u pet ponavljanja i ponovljen dva puta. Pojava simptoma posmatrana je svakodnevno, a pozitivnom reakcijom smatrana je pojava simptoma u vidu nekroze na korenu i stablu klijanaca.

Patogenost na živićima jagode. Patogenost odabranih izolata poreklom sa jagode (107-13, 101-16, 293-16, BJ4-18) proveravana je po metodi **Manici and Bonora** (2007) na zdravim živićima jagode (*Fragaria x ananassa*) sorte Senga Sengana, starosti tri nedelje, poreklom iz rasadnika sadnog materijala. Živići su pojedinačno zasađeni u sterilni supstrat u saksije (prečnike 20 cm) i gajeni u uslovima staklenika, uz redovne mere nege i zalivanja. Prilikom sadnje, u blizinu korena biljaka postavljana je kolonija izolata starosti sedam dana odgajena na PDA. U zonu korena živića koji su poslužili kao negativna kontrola postavljana je sterilna PDA. Nakon 40 dana od inokulacije očitavani su simptomi, gde je pozitivnom reakcijom smatrana pojava nekroze i truleži korena, korenovih žilica i korenovog vrata, a iz svih biljaka sa simptomima obavljena je reizolacija. Ogled je izveden u tri ponavljanja i ponovljen dva puta.

Patogenost na biljkama livadarke. Patogenost izolata poreklom sa livadarke jednogodišnje (*Poa* sp.) (16G-20) proveravana je po modifikovnoj metodi **Manici and Bonora** (2007) na zdravim biljkama jednogodišnje livadarke. Mladi busenovi zdravih biljaka nabavljeni od proizvođača posađeni su u sterilan supstrat u saksije (prečnika 15 cm) i gajeni u uslovima staklenika, uz redovne mere nege i zalivanja. Prilikom sadnje, u blizinu korena biljaka postavljana je kolonija izolata starosti sedam dana odgajenog na PDA. U zonu korena biljaka koje su poslužile kao negativna kontrola postavljana je sterilna PDA. Nakon 21 dan od inokulacije očitavani su simptomi, gde je pozitivnom reakcijom smatrana pojava nekroze, truleži korena i korenovih žilica, a iz svih biljaka sa simptomima obavljena je reizolacija. Ogled je postavljen u dva ponavljanja i ponovljen dva puta.

Patogenost na listovima i lisnim peteljka maline, jabuke i trešnje. Patogenost izolata koji potiču sa biljaka maline, jabuke i trešnje, testirana je na dva načina, inokulacijama zdravih listova, kao i lisnih peteljki vrsta biljaka sa kojih potiču.

Na listovima maline (*Rubus idaeus*) (sorte Willamette), jabuke (sorte Crveni Delišes) i trešnje (*Prunus avium*) (sorte Regina) proveravana je patogenost za izolate 251G-18 sa maline, 314-16 i 238-15 sa jabuke, 163-17 sa trešnje. Listovi korišćeni za inokulacije odsecani su na dan inokulacija i detaljno ispirani česmenskom vodom, a zatim prosušeni. Listovi su u aseptičnim uslovima inokulisani nanošenjem kapi suspenzije fragmenata hifa u sterilnoj destilovanoj vodi zapremine 20

ul, na mesto prethodno povređeno sterilnom iglom. Za svaki izolat inokulisano je po 10 listova. Inokulisani listovi inkubirani su u vlažnim uslovima pet dana. Pojava nekroze na i oko mesta inokulacije smatrana je pozitivnom reakcijom. Kontrolni listovi inokulisani su na isti način nanošenjem kapi sterilne vode. Iz listova sa simptomima obavljena je reizolacija.

Patogenost istih izolata proveravana je i na lisnim peteljka maline (sorte Willamette), jabuke (sorte Crveni Delišes) i trešnje (sorte Regina). Peteljke listova maline, jabuke i trešnje korišćene za inokulacije odsecane su na dan inokulacija. Lisne peteljke dužine 20 mm površinski su sterilisane potapanjem u 2% rastvor natrijum hipohlorita (NaOCl, 1:1 komercijalna varikina) u trajanju od 1 minut nakon čega su isprane u sterilnoj vodi, a višak vode upijen je sterilnim filter papirom. Peteljke su sušene na vazduhu u laminarnoj komori u trajanju od 15 minuta i postavljene uspravno zaronjene jednim krajem u kolonije izolata starosti sedam dana. Za svaki ispitivani izolat postavljano je po osam peteljki. Kontrolne peteljke pripremane su na isti način, samo što su zaronjene jednim vrhom u sterilnu PDA. Tako postavljene peteljke inkubirane su sedam dana na 24°C. Nakon pet dana posmatrana je pojava nekroze. Iz peteljki sa simptomima obavljena je reizolacija.

Patogenost na krtolama krompira. Patogenost četiri izolata sa krompira (*Solanum tuberosum*) (98-16, 14G-18, 252G-18, 2G-19) proveravana je inokulacijom krtola krompira, a simptomi su očitavani na formiranim biljkama krompira. U plastične saksije prečnika 20 mm zasađena je po jedna zdrava krtola krompira, koja je prilikom sadnje obmotavana sedam dana starom kolonijom odgovarajućeg izolata, odgajenom na PDA. Saksije su zatim dopunjene zemljom i održavane u uslovima staklenika, uz redovne mere nege i zalivanja, po metodi **Manici and Bonora** (2007). Pojava nekroze na korenovom vratu i korenu posmatrana je 30 dana od inokulacije. Nakon toga, biljke su ponovo prekrivane zemljom i ostavljene su još 90 dana u istim uslovima, do pojave novih krtola, na kojima je očitavana pojava sklerocija. Kao negativna kontrola poslužile su biljke inokulisane sterilnom PDA na isti način. Iz biljaka sa simptomima obavljena je reizolacija. Inokulacije za svaki ispitivani izolat obavljene su u tri ponavljanja, a ceo eksperiment ponavljen je dva puta.

4.4. Ispitivanje morfoloških osobina

Za ispitivanje makroskopskih i mikroskopskih morfoloških osobina odabrano je ukupno 64 izolata, poreklom sa 13 različitih biljaka domaćina, sa 15 lokaliteta. Za identifikaciju vrsta roda *Rhizoctonia* od makroskopskih osobina taksonomski značaj imaju izgled i osobine kolonije, a od malobrojnih raspoloživih mikroskopskih osobina specifični način granjanja hifa (**Sneh et al.**, 1996).

Ispitivanje makroskopskih osobina obuhvatilo je proučavanje izgleda i boje kolonije, brzine porasta, prisustva koncentričnih prstenova i sklerocija na PDA. Ocenjivanje makroskopskih osobina obavljeno je na kolonijama starosti 15 dana, odgajenim na 24°C u mraku. Porast je meren nakon 48 h i 72 h, a prosek je računat na osnovu merenja unakrsnih prečnika kolonija u pet ponavljanja. Ogled je ponavljen dva puta. Vrednosti brzine porasta transformisane su korišćenjem formule \sqrt{x} , a transformisani podaci obrađeni su analizom varijanse pomoću softverskog paketa Statistica 7 (StatSoft, USA). Značajnost razlika testirana je Dankanovim testom (**Sokal and Rohlf**, 1995).

Mikroskopske osobine - način grananja hifa, prisustvo i vreme pojave moniliformnih ćelija i određivanje broja jedara u ćelijama mladih hifa, proučavane su u kolonijama starim tri dana odgajenim na 24°C na PDA i WA. Nativni preparati za ispitivanje mikroskopskih osobina pripremani su od kultura odabranih izolata starih tri dana, odgajenim na 24°C u uslovima smanjivanja svetlosti i tame u intervalima od 12 h. Preparati su direktno posmatrani uz pomoć optičkog mikroskopa (Olympus CX41), pod uvećanjima od 40x. Slike su napravljene uz pomoć mikroskopske kamere Olympus 5B08713.

Broj jedara u ćelijama određivan je po modifikovanoj tehnici **Kronland and Stranghellini** (1988) bojenjem hifa anilinskim plavim u laktofenolu (**Herr**, 1970). U tri dana stare kulture na tri mesta

nakapavana je po kap boje (0,5% anilinsko plavo u laktofenolu) pomešane sa mešavinom pripremljenom od 1 ml Tween 20 i 1 ml 85% mlečne kiseline i 1 ml destilovane vode. Preko kapi je postavljano pokrovno staklo i inkubirano 10 minuta. Tako obojena micelija nanošena je u kap sterilne vode čime su napravljeni privremeni preparati i posmatrani uz pomoć optičkog mikroskopa, na tamnom polju (DF, dark field microscopy). Određivanje broja jedara za svaki izolat vršeno je u najmanje 20 ćelija mladih hifa.

4.4.1. Anastomozno uparivanje na PDA

Sa ciljem određivanja pripadnosti nižim taksonomskim jedinicama, anastomoznim grupama, 30 izolata dobijenih u ovim istraživanjima, koji su razvrstani u 11 morfoloških grupa, uparena su međusobno u dualnim kulturama, kao i sa poznatim tester izolatima. Uparivanje je rađeno direktno na podlogama PDA i WA, kao i na predmetnim mikroskopskim pločicama. Tokom istraživanja međunarodnom razmenom oformljena je kolekcija tester izolata sa poznatom anastomoznom odrednicom, koja je korišćena u istraživanjima. Kolekcija je uključila dvojedarne AG-D (izolat R13-1) i višejedarne AG-1 1C (R62), AG-2-1 (00269), AG-2-2 (01336), AG-3 (izolati R14, 1/97, T1), AG-4 HGII (2319), AG-5 (B8), AG-6 (06-01), AG-8 (R28) i AG-9 (CBS970.96) izolate *Rhizoctonia* spp. Tester izolati dobijeni su ljubaznošću Dr James Woodhall, University of Idaho, SAD i Dr Véronique Edel-Herman, INRA, Francuska, a za potrebe istraživanja održavani su u Kolekciji Katedre za fitopatologiju, Instituta za fitomedicinu, Poljoprivrednog fakulteta – Univerziteta u Beogradu. Uparivanje izolata rađeno je po metodi **Kronland and Stanghellini** (1988). Iz sedam dana starih kultura svakog od ispitivanih izolata isecani su fragmenti kolonije zajedno sa podlogom i prenošeni na jednu polovinu površinski očišćene mikroskopske pločice, dok je na drugu polovinu postavljan fragment micelije poznatog tester izolata. Pored toga, ispitivani izolati su uparivani sami sa sobom, kao i sa izolatima iste AG iz ovih istraživanja. Tako postavljane mikroskopske pločice inkubirane su u vlažnim uslovima 24 h, nakon čega je dolazilo do kontakta hifa. Zona kontakta prekrivana je pokrovnim staklom (18 x 18 mm) i posmatrana uz pomoć mikroskopa (Olympus CX41), pod faznim kontrastom. Anastomozne reakcije klasifikovane su od C0 do C3 po skali **Carling** (1996). Pojava anastomoza tipa C3 između dva izolata označava da oni pripadaju istoj AG (dolazi do anastomoze hifa), C2 i C1 reakcije formiraju izolati iz srodnih AG (dolazi do kontakta hifa kod oba tipa reakcije, kod C2 do blage anastomoze, dok kod C1 nema anastomoze), dok C0 označava da nema reakcije između uparenih AG, odnosno to su dve potpuno genetički udaljene AG. Svaka kombinacija je zasejavana u pet ponavljanja. Kao druga metoda za anastomozno grupisanje korišćena je karakterizacija hifalnih anastomoznih reakcija u kulturi na dve podloge, PDA i WA. Po ovoj metodi, anastomozne grupe određuju se posmatranjem hifalne reakcije između nepoznatog i tester izolata poznate AG pripadnosti (**Tewoldemedhin et al.**, 2006). Korišćeni su isti tester izolati kao u metodi uparivanja na pločici, tako što su tester i nepoznati izolati zasejavane u dualne kulture. Pored toga, ispitivani izolati su uparivani međusobno, kao i sami sa sobom. Petri kutije sa sterilnom PDA odnosno WA zasejavani su istovremeno isečcima prečnika 5 mm nepoznatog i tester izolata postavljenim na suprotnim stranama podloge. Svaka kombinacija je zasejavana u pet ponavljanja i inkubirana na 24°C sedam dana uz povremeno mikroskopiranje da se zabeleže aktivnosti. Izgled mesta kontakta kolonija u dualnim kulturama posmatran je i vizuelno u cilju karakterizacije kolonija na mestu kontakta, kao i da se opišu i ocene prisustvo i izgled formirane barijere ili drugih makroskopskih promena.

4.4.2. Inicijacija teleomornog stadijuma

Ukupno 11 izolata poreklom sa devet različitih biljaka domaćina (Tabela 3), sa 11 lokaliteta, korišćeno je za iniciranje pojave teleomornog stadijuma. Inicijacija teleomorfa obavljena je zasejavanjem izolata na niskohranljive podloge 2% V8 (pripremana od 20 g Agar-agar (Torlak, Institut za imunobiologiju i virusologiju, Beograd), 20 ml soka paradajza i 1 l destilovane vode) (**Dhingra and Sinclair**, 1986) i WA. Zasejane Petri kutije inkubirane su na 24°C u trajanju od šest

nedelja. Svaki izolat postavljan je na svakoj podlozi u 10 ponavljanja. Proučavanje prisustva i osobina teleomornog stadijuma obuhvatalo je ispitivanje sposobnosti formiranja polnih tvorevina - bazida sa bazidiosporama direktnim mikroskopiranjem u kulturama ispitivanih izolata, kao i pripremom i posmatranjem nativnih preparata. Preparati su direktno posmatrani uz pomoć optičkog mikroskopa (Olympus CX41), pod uvećanjem od 40x.

Tabela 3. Izolati *Rhizoctonia* i srodnih vrsta korišćeni za inicijaciju teleomornog stadijuma

Jedarni status	<i>Rhizoctonia</i> spp. AG/ <i>Waitea circinata</i> var.	Izolat	Domaćin
dvojedarna	AG-A	107-13	jagoda
dvojedarna	AG-G	296-17	pasulj
dvojedarna	AG-F	190G-18	paprika
dvojedarna	AG-U	314-16	jabuka
višejedarna	AG-2-1	137-17	paprika
višejedarna	AG-2-2	270-15	šećerna repa
višejedarna	AG-3	98-16	krompir
višejedarna	AG-4 HGI	433-16	mrkva
višejedarna	AG-4 HGII	238-15	jabuka
višejedarna	AG-6	251G-18	malina
višejedarna	var. <i>zeae</i>	299-17	kupus

4.5. Ispitivanje molekularnih osobina

Primenom metode lančane reakcije polimeraze (polymerase chain reaction, PCR) rađeno je selektivno umnožavanje šest genskih segmenata izolata, uključujući nuklearne i mitohondrijalne konstitutivne (“housekeeping“) i proteinske lokuse. Kao najpogodniji odabrani su ITS region rDNA (Nuclear ribosomal internal transcribed spacer region), *rpb2* (RNA polymerase II gene), LSU (Large Subunit of the nuclear ribosomal RNA gene), *tef-1 α* (Translation elongation factor 1-alfa), *atp6* (ATP synthase membrane subunit 6) (**Gonzalez et al.**, 2016) i *β -tubulin* (beta tubuline) (**Gurkanli et al.**, 2016). Dobijene sekvence korišćene su za analize i poređenje sa podacima u različitim bazama podataka NCBI (National Centre for Biotechnology Information), BOLD System (Barcode of Life Data System) i Q-bank. Filogenetske analize obavljene su u cilju potpune identifikacije i karakterizacije izolata različitih *Rhizoctonia* spp. iz Srbije, određivanje njihovih međudnosa, kao i međudnosa sa izolatima iz drugih delova sveta.

Molekularna ispitivanja na osnovu ITS regiona rDNA ukupno je obuhvatilo 43 izolata poreklom sa različitih biljaka domaćina i iz različitih godina izolacije. Nakon identifikacije, na osnovu ovih sekvenci ITS regiona za amplifikaciju ostalih gena odabrani su izolati dvojedarnih i višejedarnih *Rhizoctonia* spp. kao predstavnici detektovanih AG.

4.5.1. Ekstrakcija DNA

Ekstrakcija DNA rađena je pomoću komercijalnog kita DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), po uputstvima proizvođača. Ukupne DNA ekstrahovane su iz micelije čistih kultura

patogena odgajenih na tečnoj krompir dekstroznoj čorbi (potato dextrose broth, PDB), koja je pripravljena od 200 g krompira, 20 g dekstroze i 1 l destilovane vode (**Konstantinova et al.**, 2002). U Erlenmajer kolbe zapremine 500 ml razliveno je po 150 ml podloge i nakon sterilizacije zasejano sa po tri fragmenta kolonije (1 cm²) iz kultura ispitivanih izolata starih sedam dana, odgajenih na PDA. Nakon inkubacije u trajanju od 15 dana u mraku, uz povremeno mešanje blagim horizontalnim rotiranjem, pri 24°C, proceđene su preko sloja filter papira, a micelija je sakupljena i prosušena. Osušena micelija podeljena je na isečke od 100 mg i zamrznuta na –80°C i tako čuvana do korišćenja. Proces ekstrakcije DNA počinjao je tako što je količina od 100 mg micelije svakog izolata direktno prebacivana u mikrotubice zapremine 1,5 ml, gde je, uz dodavanje tečnog azota, vršena homogenizacija pomoću sterilnih tučkova za jednokratnu upotrebu. Nakon homogenizacije u svaku mikrotubicu dodato je po 400 µl AP1 pufera i 4 µl enzima RNase A kako bi se lizirao ćelijski sadržaj i eliminisale ukupne RNA. Sadržaj tubice potom je kratko promešan na Vortex-mešalici, a mešavina je inkubirana u termobloku na 65°C u trajanju od 20 min. Tokom inkubiranja na svakih 2-3 min tubice su snažno protresane. U sledećem koraku u svaku mikrotubicu dodavano je po 130 µl P3 pufera koji je omogućio taloženje proteina i polisaharida. Sadržaj je promešan na Vortex-mešalici i inkubiran 5 min na ledu. Po završenom postupku, sadržaj je prebačen pipetom iz mikrotubice u QIAshredder Mini Spin Column koja se nalazi u kolektorskoj tubi i centrifugiran 2 min na 14000 rpm. Nakon centrifugiranja lizat koji je propušten kroz filter prebačen je u tubice zapremine 1,5 ml vodeći pri tome računa da se ne poremeti talog na dnu kolektorske tubice. U svaku tubicu dodato je po 675 µl pufera AW1 uz lagano mešanje pipetom. Prvi deo od 650 µl ove suspenzije prebačen je u DNeasy Mini spin kolone sa filterom koja se nalazi u kolektorskoj tubi i centrifugiran 1 min na 8.000 rpm. Nakon centrifugiranja 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. Na ovaj način na filter su se vezale ukupne DNA. Nakon ovog procesa u DNeasy Mini Spin kolone dodato je 500 µl AW2 pufera i centrifugirane su 1 min na 8000 rpm, potom je postupak ponovljen, a tubice su centrifugirane 2 min na 14000 rpm. Ovaj korak obavljen je u cilju ispiranja i uklanjanja nečistoća koje su se, pored DNA, vezale za filter. Nakon centrifugiranja, DNeasy Mini spin kolona sa filterom prebačena je u mikrotubicu sa poklopcem (zapremine 1,5 ml) i direktno na filter je sipano 100 µl AE pufera. Uzorci su zatim inkubirani na sobnoj temperaturi u trajanju od 5 min da bi se omogućilo oslobađanje i rastvaranje DNA sa filtera, a potom su tubice centrifugirane 1 min na 8000 rpm. Dobijena tečnost na dnu tubice predstavljala je ukupnu ekstrahovanu DNA i tako dobijeni uzorci čuvani su na -80°C do dalje upotrebe.

4.5.2. Lančana reakcija polimeraze

Korišćenjem PCR metode umožavani su ciljani segmenti DNA i to ITS regiona rDNA 43 izolata, LSU, *rpb2*, *tef-1a* i *atp6* od po jednog do dva izolata po svakoj AG i *β-tubulin* dva izolata korišćenjem odgovarajućih parova prajmera. Pregled prajmera korišćenih za amplifikaciju pojedinih genskih regiona i sekvenciranje prikazan je u Tabeli 4, dok je pregled odabranih izolata *Rhizoctonia* spp. prikazan u Tabeli 5.

Sve PCR reakcije su rađene u radnoj zapremini od 25 µl korišćenjem reakcione smeše sledećeg sastava: 12,5 µl 2 X PCR Master mixa (Fermentas, Lithuania), 9 µl RNase-free water, po 2,5 µl svakog prajmera (forward and reverse) (100 pmol/µl, Metabion International, Deutschland) i 1 µl ekstrahovane DNA uzorka. U svim reakcijama negativnu kontrolu predstavljao je uzorak u koji su dodati svi navedeni reagensi, a umesto ciljane DNA dodavana je molekularna RNase-free voda (Molecular Biology Grade Water, Eppendorf). Sve PCR reakcije izvedene su u termosajkleru 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, California) pri različitim uslovima u zavisnosti od korišćenih prajmera.

Protokol PCR sa parom univerzalnih prajmera ITS1F/ITS4 koristi se za umnožavanje ITS regiona ribozomalne DNA (**Gardes and Bruns**, 1993; **White et al.**, 1990) i amplifikuje deo sekvence 18S rRNA gena, kompletnu sekvencu ITS 1, 5.8S rRNA gena i ITS 2, kao i deo sekvence 28S rRNA

gena. Reakcija je obavljena u termosajkleru pri sledećim uslovima: inicijalna denaturacija 5 min na 95°C, zatim 35 ciklusa koji se sastoje od denaturacije 30 s na 94°C, hibridizacije (annealing) 30 s na 55°C i elongacije prajmera 1 min na 72°C praćeno finalnom elongacijom 10 min na 72°C (**Walker et al.**, 2010). Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava trake očekivane veličine oko 700 bp.

Tabela 4. Pregled prajmera korišćenih u istraživanjima različitih *Rhizoctonia* spp. u Srbiji

Ciljna sekvenca	Prajmeri	Sekvenca 5'-3'	Veličina fragmenta (bp)	Literaturni navod
ITS	ITS 1F ITS4	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA TCCTCCGCTTATTGATATGC	700	Gardes and Bruns , 1993 White et al. , 1990
LSU	LROR LR5	TACCCGCTGAACTTAAGC ATCCTGAGGGAAACTTC	900	Vilgalys and Hester , 1990
<i>tef-1a</i>	EF986F EF1567R	GCYCCYGGHCA YCGTGAYTTYAT ACHGTRCCRATACCACCRATCTT	650	Rehner and Buckley , 2005
<i>rpb2</i>	bRPB2-6F bRPB2-7.1R	TGGGGYATGGNTTGYCCYGC CCCATRGCYTYTTMCCCAT	600	Matheny , 2005
<i>atp6</i>	ATP61 ATP62	ATTAATTSWCCWTTAGAWCAATT TAATTCTANWGCATCTTTAATRTA	650	Kretzer and Bruns , 1999
β - <i>tubulin</i>	B36F B12R	CACCCACTCCCTCGGTGGTG CATGAAGAAGTGAAGACGCGGGAA	450	Thon and Royse , 1999

Protokol PCR sa parom prajmera LROR/LR5 (**Vilgalys and Hester**, 1990) omogućava amplifikaciju dela sekvence gena koji kodira LSU (eng. Large Subunit) veliku ribozomalnu podjedinicu. Reakcija je obavljena pri sledećim uslovima: inicijalna denaturacija 5 min na 95°C, zatim 35 ciklusa koji se sastoje od denaturacije 30 s na 94°C, hibridizacije (annealing) 30 s na 50°C i elongacije prajmera 1 min na 72°C praćeno finalnom elongacijom 10 min na 72°C (**Gonzalez et al.**, 2016). Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava traka očekivane veličine oko 900 bp.

Protokol PCR sa parom prajmera EF1-983F/EF1-1567R (**Rehner and Buckley**, 2005) omogućava amplifikaciju gena za *tef-1a* (eng. Translation elongation factor 1-alpha) koji kodira protein koji ima ulogu u mehanizmu translacije proteina tokom rasta i izduživanja ćelija hifa gljiva. Reakcija je obavljena pri sledećim uslovima: inicijalna denaturacija 10 min na 95°C, zatim 35 ciklusa koji se sastoje od denaturacije 30 s na 94°C, hibridizacije (annealing) 30 s na 55°C i elongacije prajmera 1 min na 72°C praćeno finalnom elongacijom 10 min na 72°C (**Walker et al.**, 2010). Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava traka očekivane veličine oko 600 bp.

Protokol PCR sa parom prajmera bRPB2-6F/bRPB2-7.1R (**Matheny**, 2005) omogućava amplifikaciju dela sekvence gena za DNA zavisnu RNA polimerazu II (eng. DNA-directed RNA polymerase II subunit, *rpb2*), koji kodira drugu najveću podjedinicu RNA polimeraze. Reakcija je obavljena pri sledećim uslovima: inicijalna denaturacija nukleinskih kiselina 5 min na 95°C, zatim 35 ciklusa koji se sastoje od denaturacije 30 s na 94°C, hibridizacije (annealing) 30 s na 60°C i elongacije prajmera 1 min na 72°C praćeno finalnom elongacijom 10 min na 72°C (**Gonzalez et al.**, 2016). Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava traka očekivane veličine oko 600 bp.

Protokol PCR sa parom prajmera ATP61/ATP62 (**Kretzer and Bruns**, 1999) omogućava amplifikaciju dela sekvence *atp6* gena (eng. Mitochondrially encoded ATP synthase membrane subunit 6) koji kodira mitohondrijsku proteinsku podjedinicu 6 (eng. ATP synthase subunit 6). Pri amplifikaciji ovog gena bilo je teškoća, zbog posebne prirode ovog genskog regiona, koji je veoma bogat adenin i timin nukleotidima. U cilju prevezilaženja problema pokušano je sa različitim

modifikacijama metode, pri čemu su rađene pojedinačne ili kombinovane promene predložene metode. Modifikacije su se sastojale od povećanja koncentracije prajmera, ili ciljane DNA uzorka, zatim dodavanja ađuvanata kao što su BSA (eng. Bovine serum albumin) i DMSO (Dimetil sulfoksid), a pokušano je i sa izmenama uslova PCR reakcije, odnosno snižavanjem temperature hibridizacije i elongacije. Promene količina prajmera i DNA uzorka, kao i dodavanje pomoćih supstanci nije dalo rezultate, već samo snižavanje temperature elongacije. Reakcija je obavljena pri sledećim uslovima: inicijalna denaturacija nukleinskih kiselina 2 min na 95°C, zatim 5 ciklusa koji se sastoje od denaturacije 35 s na 94°C, hibridizacije (annealing) 55 s na 37°C i elongacije prajmera 1,5 min na 66°C, zatim 30 ciklusa koji se sastoje od denaturacije 35 s na 94°C, hibridizacije (annealing) 55 s na 45°C elongacije prajmera 1 min (uz dodavanje po 4 s pri svakom novom ciklusu) na 66°C praćeno finalnom elongacijom 10 min na 66°C (modifikovano **Gonzalez et al.**, 2016). Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava traka očekivane veličine oko 650 bp.

Protokol PCR sa parom prajmera B36F/B12R (**Thon and Royse**, 1999) omogućava amplifikaciju dela sekvence *β -tubulin* gena koji kodira gradivni protein mikrotubula (*β -tubulin*) (eng. beta tubuline). Reakcija je obavljena pri sledećim uslovima: inicijalna denaturacija nukleinskih kiselina 5 min na 95°C, zatim 35 ciklusa koji se sastoje od denaturacije 30 s na 94°C, hibridizacije (annealing) 45 s na 58°C elongacije prajmera 1 min na 72°C praćeno finalnom elongacijom 10 min na 72°C (**Thon and Royse**, 1999). Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava traka očekivane veličine oko 450 bp.

4.5.3. Vizuelizacija i analiza produkata

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 0,4 g agaroze u 40 ml 1 x TBE pufera i zagrevanjem do temperature ključanja u mikrotalasnoj pećnici kako bi se agaroz potpuno rastvorila u puferu. Nakon rastvaranja agaroze i hlađenja do temperature od približno 60°C, gel je razliven u kalup za horizontalnu elektroforezu u koji su prethodno postavljeni separatori i češljevi. Gel je zatim inkubiran 30 minuta na sobnoj temperaturi da se ohladi i polimerizuje.

Nakon polimerizacije gela uklonjeni su češljevi, a kalup je uronjen u kadicu za horizontalnu elektroforezu sa 1 x TBE puferom (90 mM Tris; 90 mM borna kiselina i 1 mM Na₂EDTA). Uzorci su pripremljeni tako što je na parafilmu pomešano 2 μ l produkta PCR reakcije i 1 μ l boje 6x Loading dye (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania). Svaki produkt nanet je u bunarčić po odgovarajućem rasporedu. Za određivanje veličine umnoženog produkta korišćen je marker MassRuler™ DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Lithuania) sa veličinom DNA fragmenata od 100 od 1000 bp. Elektroforeza je izvedena pri konstantnoj struji od 100 V u trajanju od 30 min u aparatu za horizontalnu elektroforezu (Blue Marine 100, Serva). Amplifikovani fragmenti posmatrani su nakon bojenja u rastvoru etidijum-bromida u 0,5 μ g/ml u trajanju od 10 min u mračnoj komori pomoću UV svetla na transiluminatoru (Biometra, UK). Prisustvo DNA fragmenata očekivane dužine označeno je kao pozitivna reakcija.

4.5.4. Sekvenciranje PCR produkata

Umnoženi fragmenti ispitivanih izolata, poslani su na uslužno prečišćavanje i sekvenciranje u oba smera na ABI 3730XL Automatic Sequencer u Macrogen, Inc (<http://dna.macrogen.com>, Holandija) korišćenjem istih prajmera kao i za amplifikaciju. Dobijene sekvence obrađene su u programu FinchTV Version 1.4.0., a posle manualnog editovanja određene su konsenzus sekvence i podnete u GenBank bazu podataka u okviru National Center for Biotechnology Information (NCBI), gde im je dodeljen pristupni broj (GenBank Accession Number) (Tabela 5).

Tabela 5. Pregled pristupnih brojeva sekvenci ispitivanih izolata *Rhizoctonia* spp. iz Srbije korišćenih u ovom radu

<i>Rhizoctonia</i> spp. AG/ <i>Waitea circinata</i> var.	Izolat	Domaćin	ITS*	LSU	<i>rpb2</i>	<i>tef-1α</i>	<i>atp6</i>	<i>β-tubulin</i>
AG-A	107-13	jagoda	MH517394	MN977412	MT126788	MT063197	/	/
AG-A	101-16	jagoda	MH517393	/	/	/	/	/
AG-A	293-16	jagoda	MH517395	/	/	/	/	/
AG-A	BJ4-18	jagoda	MH517396	/	/	/	/	/
AG-A	254G-18	jagoda	MN977414	/	/	/	/	/
AG-G	140-16	paradajz	MN977418	/	/	/	/	/
AG-G	163-17	trešnja	MN977411	/	/	/	/	/
AG-G	296-17	pasulj	MN977415	MN977413	/	MT063202	/	/
AG-F	190G-18	paprika	MN977417	MN977419	MT150071	MT006340	/	/
AG-U	314-16	jabuka	MN977416	MN977420	/	MT063204	MT161363	/
AG-U	16G-20	livadarka	MT835230	/	/	/	/	/
AG-2-1	137-17	paprika	MN961109	MN970095	MT150068	MT063198	/	/
AG-2-2	270-15	šećerna repa	MK123309	/	MT150070	MT063201	/	/
AG-2-2	271-15	šećerna repa	MK123311	/	/	/	/	/
AG-3	98-16	krompir	MN962729	/	/	/	/	/
AG-3	14G-18	krompir	MN874279	MN974138	MT150067	MT063196	/	/
AG-3	252G-18	krompir	MN962730	/	/	/	/	/
AG-3	270G-18	krompir	MN960693	/	/	/	/	/
AG-3	271G-18	krompir	MN960688	/	/	/	/	/
AG-3	2G-19	krompir	MN874259	/	/	/	/	/
AG-4 HGI	433-16	mrkva	MN961154	MN970162	MN993545	MT063203	/	/
AG-4 HGI	439-16	mrkva	MN961193	/	/	/	/	/
AG-4 HGI	443-16	mrkva	MN961209	/	/	/	/	/
AG-4 HGI	446-16	mrkva	MN961248	/	/	/	/	/
AG-4 HGI	452-16	mrkva	MN961336	/	/	/	/	/
AG-4 HGI	455-16	mrkva	MN961478	/	/	/	/	/
AG-4 HGI	297-17	kupus	MN961738	/	/	/	/	/
AG-4 HGI	301-17	uljana repica	MN961153	/	/	/	/	/
AG-4 HGI	303-17	paprika	MN962737	/	/	/	/	/
AG-4 HGII	238-15	jabuka	MN966409	MN970164	MT150069	MT063199	/	/
AG-6	251G-18	malina	MN961149	MN970196	MT150072	MT063200	/	/

<i>Rhizoctonia</i> spp. AG/ <i>Waitea circinata</i> var.	Izolat	Domaćin	ITS*	LSU	<i>rpb2</i>	<i>tef-1α</i>	<i>atp6</i>	<i>β-tubulin</i>
var. <i>zeae</i>	299-17	kupus	MK817577	MN121346	MN196475	/	/	MN165454
var. <i>zeae</i>	299-17-1	kupus	MN160233	/	/	/	/	/
var. <i>zeae</i>	299-17-2	kupus	MN160232	/	/	/	/	/
var. <i>zeae</i>	299-17-3	kupus	MN160231	/	/	/	/	/
var. <i>zeae</i>	299-17-4	kupus	MN160234	/	/	/	/	/
var. <i>zeae</i>	299-17-5	kupus	MN160240	/	/	/	/	/
var. <i>zeae</i>	300-17	uljana repica	MK817602	MN121344	MN196476	/	/	MN165455
var. <i>zeae</i>	300-17-1	uljana repica	MN160252	/	/	/	/	/
var. <i>zeae</i>	300-17-2	uljana repica	MN160242	/	/	/	/	/
var. <i>zeae</i>	300-17-3	uljana repica	MN160253	/	/	/	/	/
var. <i>zeae</i>	300-17-4	uljana repica	MN160250	/	/	/	/	/
var. <i>zeae</i>	300-17-5	uljana repica	MN160251	/	/	/	/	/

*Genski regioni: ITS (ITS region ribozomalne DNA), LSU (Large Subunit), *rpb2* (DNA-directed RNA polymerase II subunit), *tef-1α* (Translation elongation factor 1-alpha), *atp6* (Mitochondrially encoded ATP sintetase membrane subunit 6), *β-tubulin* (beta-tubuline)

4.5.5. BLAST analize sekvenci *Rhizoctonia* spp.

Za molekularnu identifikaciju na osnovu sekvenci ITS regiona rDNA odabrano je ukupno 43 izolata koji pripadaju različitim AG i potiču sa različitih biljaka i lokaliteta. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) analizom i višestrukim poređenjem dobijenih sekvenci ITS rDNA sa dostupnim sekvencama u GenBank bazi podataka pomoću CLUSTAL W programa (Thompson et al., 1994), obavljena je molekularna identifikacija koja je poslužila kao potvrda identifikacije na osnovu morfoloških osobina i AG uparivanja odabranih izolata.

Molekularna identifikacija zasnovana na analizi sekvenci preostalih pet genskih regiona LSU, *tef-1a*, *rpb2*, *atp6* i β -*tubulin* obuhvatila je ukupno 12 odabranih izolata predstavnika različitih AG. Na napred opisani način, urađena je BLAST analiza i višestruko poređenje dobijenih sekvenci sa dostupnim sekvencama u GenBank bazi podataka primenom CLUSTAL W (Thompson et al., 1994), kao i dalja molekularna identifikacija ispitivanih izolata. Za sve izolate određen je stepen nukleotidne sličnosti sa raspoloživim izolatima u međunarodnim bazama podataka.

Ovako dobijene sekvence dalje su korišćene za filogenetske analize i poređenje sa podacima dostupnim u različitim bazama podataka NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), BOLD System (<http://www.boldsystems.org/>) i Q-bank (<http://www.q-bank.eu/>).

4.5.6. Molekularna karakterizacija

U cilju određivanja bliže taksonomske pozicije i međusobnog odnosa odabranih izolata iz Srbije i izolata istih i srodnih vrsta dostupnih u GenBank bazi podataka, obavljena je molekularna karakterizacija rekonstrukcijom filogenetskih stabala. Na osnovu broja jedara i preliminarne identifikacije, kao i na osnovu sekvenci ITS rDNA, svi ispitivani izolati iz Srbije podeljeni su u tri grupe tako da su rekonstruisana tri odvojena filogenetska stabla, koja obuhvataju izolate dvojedarnih *Rhizoctonia* spp., višejedarnih *R. solani* i izolate *Waitea* spp. Za proračun genetičke udaljenosti i najviši stepen nukleotidne sličnosti, nakon skraćivanja sekvenci na dužinu najkraće sekvence upotrebljen je softverski paket MEGA verzija 6.0. (Tamura et al., 2013). Filogenetska stabla rekonstruisana su korišćenjem Neighbour Joining metode, integrisane unutar programa MEGA verzija 6.0. i "bootstrap" analize sa 1000 ponavljanja (Tamura et al., 2013). Gamma Distributed Tamura-Nei model (G+I) određen Modeltest-om integrisanim u MEGA verzija 6.0. korišćen je kao najbolji model supstitucije nukleotida.

Sekvence 11 odabranih izolata dvojedarnih *Rhizoctonia* spp. iz pet različitih AG iz Srbije korišćene su za rekonstrukciju filogenetskog stabla zasnovanog na sekvencama ITS rDNA. Ove sekvence analizirane su zajedno sa ukupno 32 sekvence pet različitih AG dvojedarnih *Rhizoctonia* spp. dostupne u GenBank bazi podataka. Kao autgrupa za rutovanje stabla korišćena je sekvenca vrste *Athelia rolfsi* (Tabela 6).

Sekvence 20 odabranih izolata višejedarnih *Rhizoctonia* spp. iz šest različitih AG iz Srbije korišćene su za rekonstrukciju filogenetskog stabla zasnovanog na sekvencama ITS rDNA. Ove sekvence analizirane su zajedno sa ukupno 23 sekvence 11 različitih AG višejedarnih *Rhizoctonia* spp. dostupnih u GenBank bazi podataka. Kao autgrupa za rutovanje stabla korišćena je sekvenca vrste *Athelia rolfsi* (Tabela 7).

Sekvence 12 odabranih izolata *Waitea* spp. iz Srbije korišćene su za rekonstrukciju filogenetskog stabla zasnovanog na sekvencama ITS rDNA. Ove sekvence analizirane su zajedno sa ukupno 31 sekvencom *Waitea* spp. dostupnom u GenBank bazi podataka. Kao autgrupa za rutovanje stabla korišćena je sekvenca *Rhizoctonia solani* AG-1 IB (Tabela 8).

Tabela 6. Pristupni brojevi dvojedarnih *Rhizoctonia* spp. i srodnih vrsta iz GenBank korišćenih u filogenetskim analizama

Izolat	<i>Rhizoctonia</i> spp. AG	Domaćin	Poreklo	GenBank pristupni broj	Literaturni navod
R29	AG-A	jagoda	Italija	AY927331	Manici and Bonora, 2007
R31	AG-A	jagoda	Italija	AY927333	Manici and Bonora, 2007
R36	AG-A	jagoda	Italija	AY927335	Manici and Bonora, 2007
R38	AG-A	jagoda	Italija	AY927337	Manici and Bonora, 2007
R39	AG-A	jagoda	Italija	AY927338	Manici and Bonora, 2007
R40	AG-A	jagoda	Italija	AY927339	Manici and Bonora, 2007
R55	AG-A	jagoda	Italija	AY927347	Manici and Bonora, 2007
R59	AG-A	jagoda	Italija	AY927350	Manici and Bonora, 2007
R60	AG-A	jagoda	Italija	AY927351	Manici and Bonora, 2007
R63	AG-A	jagoda	Italija	AY927352	Manici and Bonora, 2007
R70	AG-A	jagoda	Italija	AY927356	Manici and Bonora, 2007
R74	AG-A	jagoda	Italija	AY927358	Manici and Bonora, 2007
R75	AG-A	jagoda	Italija	AY927359	Manici and Bonora, 2007
R77	AG-A	jagoda	Italija	AY927361	Manici and Bonora, 2007
R78	AG-A	jagoda	Italija	AY927362	Manici and Bonora, 2007
R79	AG-A	jagoda	Italija	AY927363	Manici and Bonora, 2007
C-662	AG-A	zemljište	Japan	AF354092	Gonzalez et al., 2001
Str22	AG-A	jagoda	Izrael	DQ102423	Sharon et al., 2006
Str36	AG-F	jagoda	Izrael	DQ102435	Gonzalez et al., 2001
SIR1	AG-F	slatki krompir	Japan	AF354085	Sharon et al., 2006
Gm1	AG-G	jagoda	SAD	DQ102395	Sharon et al., 2006
Str14	AG-G	jagoda	Izrael	DQ102402	Sharon et al., 2006
1Shi-1299	AG-G	ruža	Japan	AB196657	Sharon et al., 2008
AH-9	AG-G	kikriki	Japan	AB196646	Sharon et al., 2008
C-578	AG-U	čajna biljka	Japan	AB286941	Sharon et al., 2008
MWR-20	AG-U	ruža	Japan	AB196664	Sharon et al., 2008
Ibs1	AG-I	zemljište	Izrael	DQ102442	Sharon et al., 2006
Im1	AG-I	jagoda	SAD	DQ102443	Sharon et al., 2006
FSR-052	<i>Athelia rolfsi</i>	ljljan	Tajvan	AY684917	Sharon et al., 2008

Tabela 7. Pristupni brojevi višejedarnih AG *Rhizoctonia solani* i srodnih vrsta iz GenBank korišćenih u filogenetskim analizama

Izolat	<i>R. solani</i> AG	Domaćin	Poreklo	GenBank pristupni broj	Literaturni navod
22A	AG-2-1	bukva	Norveška	AY241673	Sharon et al., 2006
F48	AG-2-1	zemljište	Australija	AB054847	Sharon et al., 2006
B60	AG-2-2IIIB	<i>Lomandra</i> sp.	Japan	AB000013	Sharon et al., 2006
48R	AG-2-2LP	<i>Zoysia</i> sp.	Japan	AB054866	Sharon et al., 2006
87-36-1	AG-2-2IIIB	pasulj	Japan	AB054855	Sharon et al., 2006
H-13	AG-2-2IV	pasulj	Honduras	AB054860	Sharon et al., 2006
T45	AG-3	krompir	Španija	AY387530	Sharon et al., 2006
ST9710- HM	AG-3	krompir	Japan	AB019024	Sharon et al., 2006
R121	AG-3	krompir	Norveška	DQ913032	Lehtonen et al., 2008
R126	AG-3	krompir	Norveška	DQ913033	Lehtonen et al., 2008
Chr-3	AG-4 HGI	hrizantema	Japan	AB000015	Sharon et al., 2006
/	AG-4 HGI	paprika	Turska	AF478450	Sharon et al., 2006
/	AG-4 HGI	karanfil	Turska	AF478451	Sharon et al., 2006
T66	AG-4 HGI	krompir	Španija	AY387542	Sharon et al., 2006
UHBC	AG-4 HGII	šećerna repa	Japan	AB000045	Sharon et al., 2006
HI521-21	AG-4 HGII	zemljište	Japan	AB000020	Sharon et al., 2006
BR-1	AG-4 HGIII	brokoli	Brazil	AY152811	Sharon et al., 2006
EP-1	AG-4 HGIII	spanać	Brazil	AY152697	Sharon et al., 2006
NKN	AG-6GV1	zemljište	Japan	AF153782	Sharon et al., 2006
75Rs	AG-6GV2	zemljište	Japan	AF354104	Sharon et al., 2006
RSG	AG-6GV3	pšenica	Tanzanija	AF153789	Sharon et al., 2006
WDb	AG-6GV4	ostaci listova	Australija	AF153787	Sharon et al., 2006
UBU-1-A	AG-6HGI	zemljište	Japan	AF354103	Sharon et al., 2006
FSR-052	<i>Athelia rolfsi</i>	ljiljan	Tajvan	AY684917	Sharon et al., 2008

Tabela 8. Prisutpni brojevi višejedarnih *Waitea* spp. i srodnih vrsta iz GenBank korišćenih u filogenetskim analizama

Izolat	<i>Waitea</i> spp. var.	Domaćin	Poreklo	GenBank pristupni broj	Literaturni navod
CNPAF_0080	<i>zeae</i>	zemljište (kafa, Rubiaceae) *	Brazil	KM065560	Blanco et al., 2018
CNPAF_0056	<i>zeae</i>	zemljište (soja, Fabaceae)	Brazil	KM065553	Blanco et al., 2018
CNPAF_0102	<i>zeae</i>	zemljište (pasulj, Fabaceae)	Brazil	KX468798	Blanco et al., 2018
CNPAF_0105	<i>zeae</i>	zemljište (pasulj, Fabaceae)	Brazil	KX468799	Blanco et al., 2018
CNPAF_0148	<i>zeae</i>	zemljište (soja, Fabaceae)	Brazil	KX468810	Blanco et al., 2018
CNPAF_0178	<i>zeae</i>	zemljište (pasulj, Fabaceae)	Brazil	KX468814	Blanco et al., 2018
CrT21	<i>zeae</i>	zemljište (duvan, Solanaceae)	Turska	KC620580	Aydin et al., 2013
Yakakent	<i>zeae</i>	zemljište (duvan, Solanaceae)	Turska	KC620581	Aydin et al., 2013
R13	<i>zeae</i>	mrkva (Apiaceae)	SAD	EU591758	Ohkura et al., 2009
R18	<i>zeae</i>	pasulj (Fabaceae)	SAD	EU591763	Ohkura et al., 2009
HLJ-RZ1	<i>zeae</i>	šćerna repa (Chenopodiaceae)	Kina	JX073667	Zhao et al., 2019a
Hall	<i>zeae</i>	zemljište (šćerna repa (Chenopodiaceae)	SAD	KJ623715	Webb et al., 2015
CNPAF_0191	<i>zeae</i>	zemljište (luk, Alliaceae)	Brazil	KX468819	Blanco et al., 2018
YR.185	<i>zeae</i>	kukuruz (Poaceae)	Kina	HQ270169	Neobjavljeno
Hungary	<i>zeae</i>	<i>Festuca</i> sp. (Poaceae)	Mađarska	KC620583	Aydin et al., 2013
OCGC 1.1	<i>zeae</i>	<i>Festuca</i> sp. (Poaceae)	Japan	DQ900594	de la Cerda et al., 2007
SK.820.BG	<i>zeae</i>	<i>Cynodon dactylon</i> (Poaceae)	SAD	HM597142	Kammerer et al., 2011
Brazil	<i>zeae</i>	kukuruz (Poaceae)	Brazil	KC620577	Aydin et al., 2013
296	<i>zeae</i>	sirak (Poaceae)	Iran	JQ350855	Neobjavljeno
M008	<i>zeae</i>	pirinač (Poaceae)	Japan	AB213593	Toda et al., 2007
M003	<i>zeae</i>	zemljište	Turska	KC620576	Aydin et al., 2013
KAR.BFW	<i>agrotis</i>	<i>Poa pratensis</i> (Poaceae)	Japan	AB213571	Toda et al., 2007
TOU.FW	<i>agrotis</i>	<i>Poa pratensis</i> (Poaceae)	Japan	AB213572	Toda et al., 2007

Izolat	<i>Waitea</i> spp. var.	Domaćin	Poreklo	GenBank pristupni broj	Literaturni navod
Ro36	<i>oryzae</i>	pirinač (Poaceae)	Japan	AB213588	de la Cerda et al., 2007
MWC5	<i>oryzae</i>	pirinač (Poaceae)	Mjanmar	FJ766523	Neobjavljeno
KT.08.1	<i>circinata</i>	<i>Agrostis stolonifera</i> (Poaceae)	Japan	AB213581	Toda et al., 2007
HTB.A.1	<i>circinata</i>	<i>Zoysia</i> sp. (Poaceae)	Japan	AB213582	Toda et al., 2007
Ce-2	<i>circinata</i>	<i>Agrostis stolonifera</i> (Poaceae)	Španija	MK418799	Gomez de Barreara et al., 2019
GS-39	<i>circinata</i>	šećerna repa (Chenopodiaceae)	Kina	KT428732	Zhao et al., 2019
SK.HBA.W1	<i>prodigus</i>	<i>Paspalum vaginatum</i> (Poaceae)	SAD	HM597143	Kammerer et al., 2011
SK.PSA.TM4	<i>prodigus</i>	<i>Paspalum vaginatum</i> (Poaceae)	SAD	HM597146	Kammerer et al., 2011
RWB-3	AG1-IB	Ruzmarin	Koreja	KP202862	Aktaruzzaman et al., 2015

*u zagradi botanička familija i prehodni usev ako je izolat iz zemljišta

4.6. Razvijanje brzih protokola za specifičnu detekciju pojedinih AG *Rhizoctonia* spp.

U cilju doprinosa brzjoj detekciji razvijena su ili modifikovana dva protokola za detekciju pojedinih AG. Oba su zasnovana na molekularnim osobinama, primenom specifičnih prajmera u PCR reakcijama odnosno real-time PCR (qPCR) reakcijama korišćenjem SYBR Green reagenasa. Određivanje anastomoznih grupa konvencionalnim metodama je dugotrajno, a često i nedovoljno pouzdano i zahteva postojanje kolekcije referentnih izolata, što je teško ostvarivo, naročito za rutinske analize. Iz tog razloga se u cilju dijagnostike i identifikacije AG preporučuju molekularne metode primenom specifičnih prajmera, koji umnožavaju samo odgovarajuće AG.

4.6.1. Ispitivanje direktne detekcije AG korišćenjem specifičnih prajmera

U cilju razvoja brzih dijagnostičkih metoda testirana je pogodnost 10 različitih publikovanih parova prajmera (**Budge et al., 2009a**; **Arakawa and Inagaki, 2014**) (Tabela 9) da specifično detektuju različite AG prisutne u Srbiji. U istraživanja je uključeno 11 izolata dvojedarnih i višejedarnih *Rhizoctonia* spp. koji su prethodno konvencionalno i molekularno okarakterisani i svrstani u AG-A (izolat 107-13), AG-G (296-17), AG-F (190G-18), AG-U (314-14), AG-2-1 (137-17), AG-2-2 (270-15), AG-3 (98-16), AG-4 HGI (433-16), AG-4 HGII (238-15), AG-6 (251G-18), *W. circinata* var. *zeae* (izolat 299-17).

Radna zapremina (25 µl) u kojoj su obavljene PCR reakcije sastojala se od 12,5 µl 2 X PCR Master mix-a (Fermentas, Lithuania), 6,5 µl RNase-free water, po 2,5 µl svakog prajmera (forward and reverse) (100 pmol/µl, Metabion International, Deutschland) i 1 µl ekstrahovane ukupne DNA uzorka. U svim reakcijama kao negativna kontrola korišćen je uzorak u koji su dodati svi navedeni reagensi i molekularna RNase-free voda (Molecular Biology Grade Water, Eppendorf) umesto

DNA uzorka. PCR reakcija izvedena je u termosajkleru 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, California) pri sledećim uslovima: inicijalna denaturacija 5 min na 95°C, zatim 35 ciklusa koji se sastoje od denaturacije 30 s na 94°C, hibridizacije (annealing) 30 s na različitim temperaturama prikazanim u Tabeli 9 i elongacije prajmera 1 min na 72°C praćeno finalnom elongacijom od 10 min na 72°C. Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava traka očekivane veličine od 100 do 300 bp, u zavisnosti od korišćenog para prajmera prikazanim u Tabeli 9.

Tabela 9. Pregled specifičnih prajmera za detekciju pojedinih AG grupa ispitivanih izolata *Rhizoctonia* spp.

Prajmeri	Ciljana AG	Sekvenca 5'-3'	T hibridizacije	Veličina fragmenta (bp)	Literatura
AG-A F/ ThanaCera-R	AG-A	CTTGTGAGACTGGAGGCCGT/ TGATACTCAAACAGGCATGC	53°C	300	Arakawa and Inagaki, 2014
AG-G F/ ThanaCera-R	AG-G	AGTCTTCCGTCTATTCAACC/ TGATACTCAAACAGGCATGC	52°C	150	Arakawa and Inagaki, 2014
AG-F F/ ThanaCera-R	AG-F	TGCACCTGTGAGACAGAGTG/ TGATACTCAAACAGGCATGC	52°C	150	Arakawa and Inagaki, 2014
AG-2-1_F/ AG-2-1_R	AG-2-1	CTTCCTCTTTCATCCCACACA/ TGAGTAGACAGAGGGTCCAA TAACCTA	53°C	150	Budge et al., 2009a
AG-2-2_F/ AG-2-2_R	AG-2-2	ATAAATTGGGTTTATATTAGA GTTGAGTAGACA/CACCTTTTG CTCTTTTTTAATCCA	53°C	100	Budge et al., 2009a
AG-3_F/ AG-3_R	AG-3	TCTACAGGGATTCCAGATTAC GC/TCACGGATCTTGAAATC AACA	53°C	100	Budge et al., 2009a
AG-4HGI_F/ AG-4HGI_R	AG-4 HGI	TGTGCACCTGTGAGACAGATG TT/TGTGTTACATCCATTACAT CCGTTT	55°C	100	Budge et al., 2009a
AG-4HGII_F/ AG-4HGII_R	AG-4 HGII	GCAAAGAGGCTGAGGGCTGT/ CGGTCTGGTACTCTTCACGA A	55°C	100	Budge et al., 2009a
AG-6_F/ ThanaCera-R	AG-6	CCCTCTGTCTACTCAATCCA/ TGATACTCAAACAGGCATGC	52°C	100	Budge et al., 2009a

4.6.2. Razvijanje qPCR protokola za detekciju *Rhizoctonia solani* AG-2-2

Za izolate *R. solani* AG-2-2 (270-15 i 271-15) poreklom iz šećerne repe iz Srbije razvijan je qPCR protokol za detekciju primenom specifičnih prajmera AG-2-2 F / AG-2-2 R (Budge et al., 2009a) (Tabela 9) i SYBR Green tehnologije. Razvijeni qPCR protokol je po specifičnosti i osetljivosti upoređen sa odgovarajućim protokolom za konvencionalni PCR.

Razvijeni qPCR rađen je u MIC qPCR cyler-u (Bio Molecular Systems, Australia) u radnoj zapremini od 5 µl. Reakciona smeša pravljen je od 2,5 µl FastGene IC Green 2 x qPCR Universal mix (Nippon Genetics, Europe GmbH), 0,5 µl od svakog prajmera (100 pmol/ µl, Metabion

International, Deutschland), 1,3 μ l molekularne RNase-free vode (Molecular Biology Grade Water, Eppendorf) i 0,2 μ l ekstrahovane DNA uzorka. PCR reakcije obavljene su pri sledećim uslovima: inicijalna denaturacija nukleinskih kiselina 95°C na 2 min, zatim 40 ciklusa koji su se sastojali od 15 s na 95°C, 30 s na 60°C i 2 s od 72°C. Fluorescencija je merena posle faze hibridizacije. Melting profili generisani su podizanjem temperature od 72 do 95°C (0.30 C/s). Protokol primenom konvencionalnog PCR koji je poslužio za upoređivanje takođe je obavljan u radnoj zapremini od 5 μ l, a reakciona smeša pravljena je od 2,5 μ l 2 x PCR Master mix (Fermentas, Lithuania), 0,5 μ l od svakog prajmera (100 pmol/ μ l, Metabion International, Deutschland), 1,3 μ l molekularne RNase-free vode (Molecular Biology Grade Water, Eppendorf) i 0,2 μ l ekstrahovane DNA uzorka. U svim reakcijama, kako u konvencionalnom, tako i u qPCR, negativnu kontrolu predstavljao je uzorak u koji su dodati svi navedeni reagensi, a umesto DNA uzoraka dodavana je molekularna RNase-free voda (Molecular Biology Grade Water, Eppendorf). Konvencionalne PCR reakcije izvođene su u termosajkleru 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, California) pri sledećim uslovima: inicijalna denaturacija nukleinskih kiselina 4 min na 94°C, zatim 35 ciklusa koji se sastoje od 1 min na 95°C, 1 min na 49°C i 2 min na 72°C, sa finalnom elongacijom od 10 min na 72°C. Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava traka očekivane veličine oko 150 bp. Specifičnost detekcija u oba protokola, konvencionalnom i qPCR, testirana je korišćenjem 10 različitih *Rhizoctonia* AG: dvojedarnih (AG-A, AG-G, AG-F i AG-U) i višejedarnih (AG-2-1, AG-3, AG-4 HGI, AG-4 HGII, AG-6 i *W. circinata*). Osetljivost prajmera za specifičnu detekciju ispitivana je u oba protokola koristeći razređenja od 10^{-1} do 10^{-5} DNA ispitivanih uzoraka *R. solani* AG-2-2. Serija razređenja od 10^{-2} do 10^{-5} pravljena je u odnosu 1:10. Razređenje 10^{-1} formirano je tako što je uzet 1 μ l ekstrahovane DNA uzorka i dodato 9 μ l RNase-free vode. Zatim je iz razređenja 10^{-1} uzimano 1 μ l uzorka i razređivano u 9 μ l RNase-free vode, što je predstavljalo razređenje 10^{-2} i tako redom do 10^{-5} . Sve reakcije ponovljene su najmanje tri puta.

4.7. Ispitivanje kruga domaćina i virulentnosti odabranih *Rhizoctonia* spp.

U cilju utvrđivanja kruga domaćina i razlika u virulentnosti između izolata *Rhizoctonia* spp. koje pripadaju različitim AG izvedeni su ogledi u tri sistema: na sejancima 14 vrsta biljaka iz osam botaničkih familija, na fragmentima lisnih peteljki jagode i na isečcima stabla različitih sorti krompira. U svim ogledima korišćena je micelija sedam dana starih izolata odgajenih na PDA podlozi na 24°C u mraku. Kako je različit broj izolata bio uključen u pojedine testove u Tabeli 10 prikazano je za koje testove je bio uključen svaki od odabranih izolata.

4.7.1. Ispitivanje virulentnosti *Rhizoctonia* spp. na sejancima

Za ispitivanje virulentnosti i određivanja kruga domaćina u uslovima veštačkih inokulacija sejanaca odabrano je ukupno 25 izolata sa 15 lokaliteta, sa 12 biljaka domaćina. Odabrani izolati svrstani su u 11 različitih AG *Rhizoctonia* spp. (Tabela 10). Krug domaćina je ispitivan na sejancima 14 vrsta biljaka iz osam botaničkih familija monokotiledonih i dikotiledonih biljaka i to: pšenice (*Triticum aestivum*, Poaceae), kukuruza (*Zea mays*, Poaceae), kupusa (*Brassica oleracea*, Brassicaceae), uljane repice (*Brassica napus*, Brassicaceae), paradajza (*Lycopersicon esculentum*, Solanaceae), paprike (*Capsicum annuum*, Solanaceae), duvana (*Nicotiana tabacum*, Solanaceae), krastavca (*Cucumis sativus*, Cucurbitaceae), zelene salate (*Lactuca sativa*, Asteraceae), suncokreta (*Helianthus annuus*, Asteraceae), graška (*Pisum sativum*, Fabaceae), pasulja (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae), mrkve (*Daucus carota*, Apiaceae) i šećerne repe (*Beta vulgaris*, Amaranthaceae), ispitivanja su obavljena na PDA u epruvetama, na ranije opisan način. Ocena virulentnosti izvršena je na osnovu intenziteta simptoma. U tu svrhu u toku ovog istraživanja kreirana je sledeća skala: 0 - nema vidljivih simptoma, 1 - do 30% zahvaćene mase korena, 2 - od 50% zahvaćene mase, 3 - ceo koren zahvaćen nekrozom, 4 - nekrozom zahvaćeni i koren i nadzemni deo sejanca. Iz biljaka sa simptomima obavljena je reizolacija. Kao negativna kontrola korišćeni su sejanci istih vrsta biljaka odgajeni na isti način i inokulisani sterilnom PDA. Za svaki ispitivani izolat postavljano je po pet

biljaka. Ceo eksperiment je ponovljen dva puta. Dobijeni podaci analizirani su primenom Colmogorov-Smirnov and Liliefors testa koristeći paket Graph Pad Software 5.0, USA i faktorskog ANOVA testa koristeći Statistica 7 paket (StatSoft, USA), a vrednosti su poredene Tuckey testom (na nivou značajnosti $p < 0.05$) (Sokal and Rohlf, 1995).

Tabela 10. Pregled korišćenih izolata dvojedarnih *Rhizoctonia* spp. i višejedarnih *Rhizoctonia solani* i *Waitea circinata* za ispitivanje kruga domaćina i virulentnosti

Izolat	Domaćin	<i>Rhizoctonia</i> spp./ <i>Waitea circinata</i> var.	Metoda na sejancima	Metoda na isečcima lisnih peteljki jagode	Metoda na isečcima stabla krompira
107-13	jagoda	AG-A	+*	+	+
101-16	jagoda	AG-A	+	+	-
293-16	jagoda	AG-A	+	+	-
BJ4-18	jagoda	AG-A	+	+	-
140-16	paradajz	AG-G	+	+	+
163-17	trešnja	AG-G	+	-	-
296-17	pasulj	AG-G	+	-	-
190G-18	paprika	AG-F	+	+	-
314-16	jabuka	AG-U	+	+	+
137-17	paprika	AG-2-1	+	+	-
270-15	šećerna repa	AG-2-2	+	+	-
271-15	šećerna repa	AG-2-2	+	-	+
98-16	krompir	AG-3	+	-	+
14G-18	krompir	AG-3	+	+	+
252G-18	krompir	AG-3	+	-	-
R14	krompir	AG-3	-	-	+
433-16	mrkva	AG-4 HGI	+	+	-
443-16	mrkva	AG-4 HGI	+	-	-
456-16	mrkva	AG-4 HGI	+	-	-
297-17	kupus	AG-4 HGI	+	-	+
301-17	uljana repica	AG-4 HGI	+	-	-
303-17	paprika	AG-4 HGI	+	-	-
238-15	jabuka	AG-4 HGII	+	+	+
251G-18	malina	AG-6	+	+	-
299-17	kupus	var. <i>zeae</i>	+	+	+
300-17	uljana repica	var. <i>zeae</i>	+	-	-

*+izolat korišćen u određenoj metodi, -izolat nije korišćen u određenoj metodi

4.7.2. Virulentnost ispitivanih izolata na lisnim peteljka jagode

Virulentnost 14 odabranih izolata poreklom sa devet domaćina po jedan od svake od 11 identifikovanih AG (sem za izolate sa jagode kod kojih su u ovom eksperimentu korišćena četiri izolata) (Tabela 10) upoređivana je na lisnim peteljka jagode (sorte Senga Sengana). Postupak je metodološki izveden na isti način kao ranije opisana provera patogenosti na peteljka listova različitih biljaka, a kao kontrola korišćena je sterilna PDA. Dobijene vrednosti su transformisane korišćenjem formule $\sqrt{(x+0,1)}$, a transformisani podaci su obrađeni jednofaktorskom analizom varijanse pomoću softverskog paketa Statistica 7 (StatSoft, USA). Značajnost razlika testirana je Duncan-ovim testom na nivou značajnosti $p < 0.05$ (Sokal and Rohlf, 1995).

4.7.3. Ispitivanje virulentnosti *Rhizoctonia* spp. na isečcima stabla krompira

Virulentnost deset izolata *Rhizoctonia* spp., svrstanih u osam različitih AG (Tabela 10), preliminarno identifikovanih) ispitivana je na isečcima stabla krompira (*Solanum tuberosum*, Solanaceae). U ogled je uključeno sedam različitih sorti krompira: Brook, Liseta, Orwell, Sifra, Almera, Lucinda i Crisps4all. Krtole su postavljene u povoljne uslove za naklijavanje, odnosno uslove visoke RH vazduha i temperature od 25°C. Nakon klijanja, od svake sorte odabrana su stabla ujednačene debljine, skraćeni na dužinu od 20 mm i površinski sterilisani potapanjem u 2% rastvor natrijum hipohlorita (NaOCl, 1:1 komercijalna varikina) u trajanju od 1 min. Fragmenti stabla prosušeni su na vazduhu u laminarnoj komori u trajanju od 15 minuta i povređivani ubodom sterilnom iglom. Na mesto uboda nanošen je fragment kolonije prečnika 1 mm okrenut micelijom ka stablu. Kao kontrola korišćeni su fragmenti stabla krompira inokulisani sterilnom PDA. Svakim ispitivanim izolatom inokulisano je pet fragmenata stabla i inkubirani su sedam dana na 24°C. Nakon sedam dana očitavana je pojava nekroze. Za ova ispitivanja oformljena je i primenjivana skala za ocenjivanje: 0 - nema simptoma, 1 - dužina nekroze do 1 mm, 2 - do 20% zahvaćene površine, 3 - do 50% zahvaćene površine i 4 - preko 50% zahvaćene površine isečka stabla krompira. Dobijene vrednosti su transformisane korišćenjem formule $\sqrt{(x+0,1)}$, a transformisani podaci su obrađeni dvofaktorskom analizom varijanse pomoću softverskog paketa Statistica 7 (StatSoft, USA). Značajnost razlika testirana je Duncan-ovim testom na nivou značajnosti $p < 0.05$ (Sokal and Rohlf, 1995).

4.8. Ispitivanje međuodnosa izolata *Trichoderma* spp. i odabranih izolata *Rhizoctonia* spp.

U procesu prikupljanja izolata vrsta roda *Rhizoctonia* prikupljeno je i više izolata *Trichoderma* spp. Od prikupljenih *Trichoderma* sp. zbog izražene antagonističke aktivnosti u preliminarnom ispitivanju u dualnim kulturama sa izolatima *Rhizoctonia* spp. odabran je izolat 167-17 *Trichoderma* spp. poreklom sa lokaliteta Beograd, koji je morfološki i molekularno identifikovan. Odabrani izolat 167-17 korišćen je za ispitivanje mogućnosti biološke kontrole devet AG i podgrupa *Rhizoctonia* spp. dobijenih u ovom radu, kako u *in vitro*, tako i u uslovima staklenika.

4.8.1. Identifikacija izolata *Trichoderma* sp.

Morfološka identifikacija ispitivanog izolata 167-17 uključila je gajenje na PDA i proučavanje morfoloških osobina. Proučavani su izgled i boja kolonije i brzina porasta, koja je očitavana drugog i trećeg dana po zasejavanju, a potom je računat prosek unakrsnog merenja prečnika kolonija u pet ponavljanja, a ogled je ponavljen dva puta. Identifikacija je uključila i proučavanje mikroskopskih struktura, kao što su izgled konidija i konidiofora i njihovih dimenzija. Merene su dimenzije 50 konidija i 50 konidiofora. Pojava askusa sa askosporama proučavana je na SNA (Spezieler Nährstoffarmer agar) podlozi bez filter papira tri nedelje po zasejavanju (Chaverri et al., 2015). SNA podloga je pripremana 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 (Nirenberg, 1976). Mikroskopski preparati pravljani su na ranije opisan način i posmatrani na mikroskopu Olympus 5B08713 pod mikroskopskim uvećanjima od 40x.

Molekularna identifikacija odabranog izolata sastojala se od gajenja na tečnoj PDB i ekstrakcije DNA primenom DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) na prethodno opisan način praćenog umnožavanjem ciljanog segmenta DNA - ITS regiona rDNA primenom PCR reakcije i korišćenjem para prajmera ITS1F/ITS4 po uslovima i količinama koje su prethodno opisane.

Radi detaljnije karakterizacije izolata izvršeno je umožavanje još dva genska regiona *tef-1a* i *rpb2* (Tabela 11). PCR sa parom prajmera EF1-728F/EF1-1199R koji omogućava amplifikaciju gena za *tef-1a*. PCR reakcija obavljena je u termosajkleru 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, California) pri sledećim uslovima: inicijalna denaturacija nukleinskih kiselina 10 min

na 95°C, zatim 35 ciklusa koji se sastoje od denaturacije 30 s na 94°C, hibridizacije (annealing) 30 s na 53°C i elongacije prajmera 1 min na 72°C praćeno finalnom elongacijom 10 min na 72°C (Walker et al., 2010). Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava traka očekivane veličine oko 550 bp. PCR sa parom prajmera fRPB2-5f /fRPB2-7cr omogućava amplifikaciju dela sekvence gena za *rpb2*. Reakcija je obavljena pri sledećim uslovima: inicijalna denaturacija nukleinskih kiselina 5 min na 95°C, zatim 35 ciklusa koji se sastoje od denaturacije 30 s na 94°C, hibridizacije (annealing) 30 s na 45°C i elongacije prajmera 1 min na 72°C, praćeno finalnom elongacijom 10 min na 72°C (Jaklitsch and Voglmayr, 2015). Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava traka očekivane veličine oko 800 bp.

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 po ranije opisanom postupku. Umnoženi fragmenti poslani su na uslužno sekvenciranje u oba pravca sa istim prajmerima kao pri amplifikaciji, a zatim su dobijene sekvence upoređene BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) analizom i višestrukim poređenjem sa dostupnim sekvencama u GenBank bazi podataka pomoću CLUSTAL W programa (Thompson et al., 1994).

Tabela 11. Pregled prajmera korišćenih u okviru karakterizacije *Trichoderma* spp.

Ciljna sekvenca	Prajmeri	Sekvenca 5'-3'	Veličina fragmenta (bp)	Literaturni navod
<i>tef-1a</i>	EF1-728F EF1-1199R	CATCGAGTTCGAGAAGG GGGAAGTACCMGTGATCAT GT	550	Carbone and Kohn, 1999 Walker et al., 2010
<i>rpb2</i>	fRPB2-5f fRPB2-7cr	GGGGWGAYCAGAAGAAGG CCCATRGCTTGYYTTRCCCAT	800	Liu et al., 1999

4.8.2. Ispitivanje međuodnosa *Trichoderma* sp. i odabranih izolata različitih AG *Rhizoctonia* spp. *in vitro*

Ispitivanje biološke aktivnosti izolata 167-17 *Trichoderma* spp. u odnosu na devet različitih AG iz Srbije dvojedarnih *Rhizoctonia* spp. AG-A (izolat 107-13), AG-G (296-17), AG-U (314-16) i višejedarnih *R. solani* AG-2-1 (137-17), AG-2-2 (270-15), AG-3 (98-16), AG-4 HGI (303-17), AG-4 HGII (238-15), kao i *W. circinata* (299-17) sprovedeno je u laboratorijskim uslovima. Delovanje *Trichoderma* sp. ispitivano je u dualnim kulturama na PDA i WA zasejanim isećcima prečnika 5 mm na suprotne strane Petri kutija. Svaka kombinacija izolat *Rhizoctonia* sp. / *Trichoderma* sp. zasejana je u 10 ponavljanja i inkubirana 15 dana na 28°C uz povremeno mikroskopiranje da bi se zabeležile aktivnosti. Odnos *Rhizoctonia* sp. / *Trichoderma* sp. okarakterisan je na osnovu promene u brzini porasta *Rhizoctonia* spp., pojave zaustavljanja porasta hifa *Rhizoctonia* sp., prisustva morfoloških promena u hifama *Rhizoctonia* sp. u momentu kontakta sa *Trichoderma* sp. u vidu koagulacije i vakuolizacije ćelijskog sadržaja, poređenje učestalosti obavijanja hifa *Trichoderma* sp. oko hifa *Rhizoctonia* sp., između vazdušnih i supstratnih hifa, prisustvo mesta degradacije ćelijskog zida na parazitiranim hifama *Rhizoctonia* sp., pojave pucanja hifa pri kontaktu i oslobađanja pigmentata, uticaj parazitiranosti na dinamiku i raspored obrazovanja sklerocija kod različitih izolata *Rhizoctonia* sp. Na osnovu svih parametara izvršeno je poređenje reakcije izolata *Rhizoctonia* sp. iz različitih AG grupa, kao i određivanje postojanja specijalizacije izolata *Trichoderma* sp. Brzina porasta merena je nakon 48 h, kako u dualnim kulturama, tako i u kontrolnim, gde su gajene samo kulture *Rhizoctonia* sp. odnosno *Trichoderma* sp. Vrednosti inhibicije porasta transformisane su korišćenjem formule \sqrt{x} , a transformisani podaci obrađeni su jednofaktorskom analizom varijanse

pomoću softverskog paketa Statistica 7 (StatSoft, USA). Značajnost razlika testirana je Duncan-ovim testom na nivou značajnosti $p < 0,05$ (**Sokal and Rohlf**, 1995).

4.8.3. Ispitivanje međuodnosa *Trichoderma* sp. i odabranih izolata različitih AG *Rhizoctonia* spp. *in vivo*

Za ispitivanje biološke aktivnosti odabranog izolata *Trichoderma* sp. u *in vivo* uslovima odabrane su dve biljke domaćini, pasulj i mrkva. U preliminarnim istraživanjima sve AG *Rhizoctonia* spp. ispoljile su patogenost na ovim biljkama. U ogledu sa sejancima pasulja ispitivana je mogućnost njihove zaštite od odabranih AG *Rhizoctonia* spp. primenom antagonističkog izolata 167-17 *Trichoderma* sp. u fenofazi kotiledona. U ogledu sa mrkvom mogućnost zaštite od različitih *Rhizoctonia* spp. AG u zemljištu ispitivana je tokom klijanja i nicanja.

Ispitivanje biološke aktivnosti na biljkama pasulja - Ispitivanje biološke aktivnosti rađeno je u uslovima staklenika na biljkama pasulja, a za inokulaciju su odabrane dve AG *Rhizoctonia* spp.: dvojedarna *Rhizoctonia* spp. AG-G (izolat 296-17) poreklom sa pasulja sa lokaliteta Futog i višejedarna *R. solani* AG-2-2 (izolat 270-15) poreklom sa šećerne repe sa lokaliteta Adaševci. Navedene AG odabrane su na osnovu prethodnog ispitivanja biološke aktivnosti *Trichoderma* sp. na podlozi. Izolat *Rhizoctonia* spp. AG-G ispoljio je umerenu osetljivost, dok je izolat *R. solani* AG-2-2 bio jako osetljiv na *Trichoderma* sp. Inokulum je pripreman po metodi **Gaskill** (1968) u supstratu koji se sastojao od 50 zrna ječma i 50 ml destilovane vode sterilisanih u autoklavu (121°C; 1,2 bara; 20 min) u Erlenmajer kolbama od 250 ml. U prohladeni supstrat od zrna ječma dodavani su iseći sedam dana starih kolonija izolata sa PDA, odgajanih na 24°C u mraku. Inokulisana zrna inkubirana su u termostatu, bez prisustva svetlosti, pri temperaturi od 24°C u trajanju od dve nedelje, uz povremeno protresanje da ne bi došlo do stvaranja kompaktne mase. Nakon dve nedelje, zrna su prosušena i korišćena za inokulacije. U ogledima su korišćene saksije dimenzija 15 x 10 cm koje su punjene sa sterilnim supstratom Floragard (Germany), u koje je posejano po dva semena pasulja. Tokom setve, u svaku saksiju dodato je po pet zrna ječma sa inokulumom izolata *Rhizoctonia* spp. Ispitivana je mogućnost zaštite pasulja primenom *Trichoderma* spp. izolata u dve varijante i to tako što je *Trichoderma* sp. dodavana u momentu setve pasulja zajedno sa izolatima *Rhizoctonia* spp. i druga varijanata kada je *Trichoderma* sp. dodavana sedam dana kasnije. *Trichoderma* sp. je dodavana tako što je pripremljena suspenzija konidija iz kultura starih sedam dana odgajanih na PDA na 24°C u mraku. Nakon perioda nicanja saksije su održavane u uslovima staklenika pri temperaturi od 24-30°C. Ogled je postavljen u pet ponavljanja, a ceo eksperiment je ponovljen dva puta. Promene na biljkama praćene su svakodnevno, a konačna ocena intenziteta oboljenja u svakom od tretmana obavljena je deset dana nakon inokulacije izolatima *Rhizoctonia* spp. određivanjem broja preživelih biljaka i ocenom intenziteta simptoma bolesti. Skala za ocenu intenziteta oboljenja određena je na sledeći način: 0=biljke bez simptoma, 1=nekroza vrhova korenovih žilica, 2=nekroza korenovih žilica, 3=ogoljen koren (propadanje korena). Vrednosti su transformisane korišćenjem formule $\sqrt{(x+0,1)}$, a transformisani podaci su obrađeni jednofaktorskom analizom varijanse pomoću softverskog paketa Statistica 7 (StatSoft, USA). Značajnost razlika testirana je Duncan-ovim testom na nivou značajnosti $p < 0,05$ (**Sokal and Rohlf**, 1995). Ogled se sastojao od sledećih tretmana: (1) biljke inokulisane izolatima *Rhizoctonia* spp. (netretirana kontrola), (2) biljke tretirane suspenzijom konidija *Trichoderma* spp. pri setvi, (3) biljke tretirane suspenzijom konidija *Trichoderma* spp. sedam dana nakon setve, (4) biljke inokulisane ispitivanim izolatima *Rhizoctonia* spp. i tretirane tiofanat-metilom (Funomil, 700 WG, 700 g/kg tiofanat-metila, Ningbo Tide Imp. & Exp. Co. Ltd., Kina) u koncentraciji 0,7 g a.s./l (tretirana kontrola), (5) biljke tretirane tiofanat-metilom u koncentraciji 0,7 g a.s./l, (6) biljke inokulisane sterilnim zrnima ječma.

Ispitivanje biološke aktivnosti na biljkama mrkve - Delovanje *Trichoderma* sp. na ispitivane izolate *Rhizoctonia* spp. ispitivano je u ogledu sa semenom mrkve. Seme mrkve sejano je u saksije (po 30) i u momentu setve inokulisano unošenjem micelije ispitivanih izolata *Rhizoctonia* spp. i *Trichoderma* spp. u neposrednoj blizini semena. U ogled su uključeni izolati iz devet AG i to:

dvojedarne *Rhizoctonia* spp. AG-A (izolat 107-13), AG-G (296-17), AG-U (314-16) i višejedarne *R. solani* AG-2-1 (137-17), AG-2-2 (270-15), AG-3 (98-16), AG-4 HGI (433-16), AG-4 HGII (238-15), kao i *W. circinata* var. *zeae* (299-17). Inokulum, kako kod izolata *Rhizoctonia* spp., tako i kod *Trichoderma* spp. je pripreman u avanu, tako što je 1 cm² kolonije odgajene na PDA pri temperaturi od 24°C u uslovima mraka blago usitnjeno i dodato u saksiju u zonu gde je postavljano seme. U ogledima su korišćene saksije dimenzija 15 x 10 cm koje su punjene sterilnim supstratom Floragard (Germany). U ovom ogledu korišćeno je više različitih kontrola i to: (1) seme inokulisano izolatima *Rhizoctonia* spp. (netretirana kontrola), (2) seme inokulisano ispitivanim izolatima *Rhizoctonia* spp. tretiranim tiofanat-metilom u koncentraciji 0,7 g a.s./l (tretirana kontrola), (3) seme inokulisano sterilnom PDA, (4) seme inokulisano izolatom *Trichoderma* sp. Saksije su održavane u uslovima staklenika pri temperaturi od 24-30°C uz redovne mere zalivanja. Promene na biljkama beležene su do četiri nedelje posle inokulacije, kada je data konačna ocena intenziteta oboljenja, koja se ogledala u broju uginulih, odnosno prezivelih biljaka. Ocene intenziteta oboljenja analizirane su primenom dvofaktorskog ANOVA testa, a vrednosti su razdvajane Dankanovim višestrukim testom (Sokal and Rohlf, 1995).

5. REZULTATI

5.1. Simptomi bolesti i izolovane *Rhizoctonia* spp.

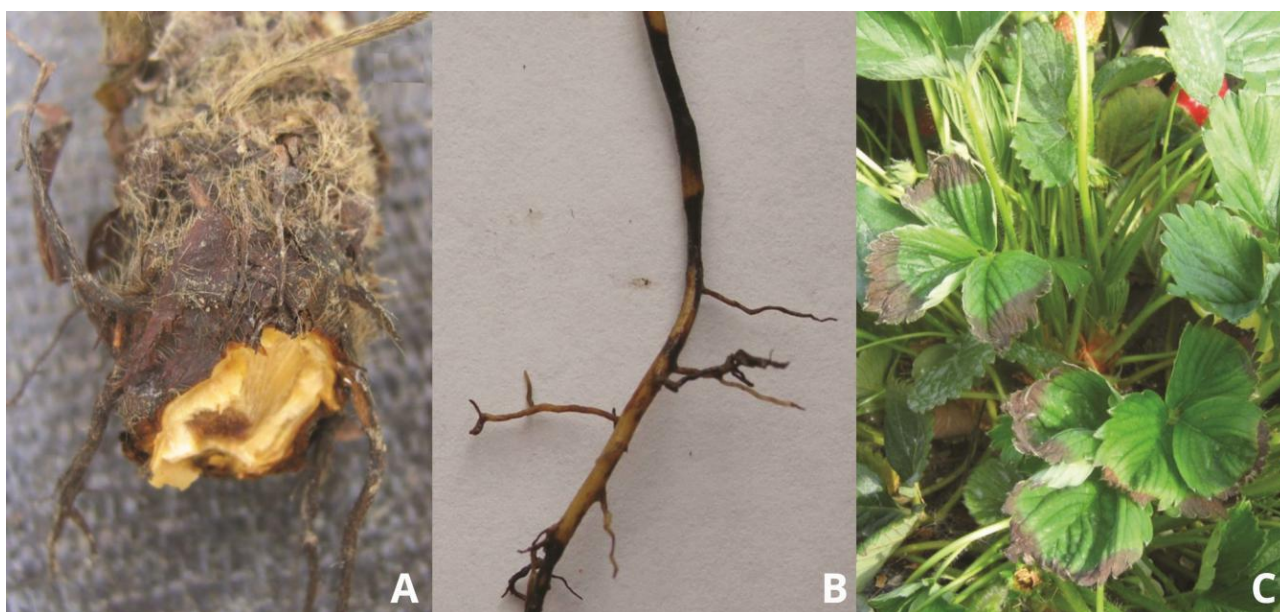
Obilazak terena i sakupljanje uzoraka obolelih biljaka u periodu od 2013. do 2020. godine, obuhvatilo je ukupno 22 useva, 13 različitih zeljastih i drvenastih biljaka domaćina (jagoda, jabuka, trešnja, malina, paprika, paradajz, pasulj, mrkva, kupus, krompir, šećerna repa, uljana repica i livadarka jednogodišnja), kao i šest partija krompira (Tabela 12). Tokom pregleda uočeni su raznovrsni simptomi u vidu truleži korena i prizemnog dela stabla, naročito u zoni korenovog vrata biljaka, zatim hloroze, nekroze, prevremenog opadanja listova, zakržljalosti, uvenuća i uginuća biljaka. Kod pojedinih obolelih biljaka u uslovima visoke vlažnosti vazduha razvila se bela micelija na prizemnom delu stabla. Prvi simptomi na zeljastim domaćinima uočeni su u početnim fazama razvoja u vidu poleganja i propadanja sejanaca i mladih biljaka ubrzo nakon ostvarene infekcije, dok su simptomi truleži i nekroze korena bili široko rasprostranjeni. Prikupljeno je po 3-15 uzoraka, u zavisnosti od tipa simptoma i veličine useva. Ukupno je sakupljeno 330 uzoraka, od čega je dobijeno 177 izolata koji su prebačeni na WA i dobijeni su izolati vrha hife, sa karakteristikama i naročito specifičnim grananjem hifa pod pravim uglom, što je ukazivalo na pripadnost *Rhizoctonia* spp. Dobijeni izolati su korišćeni za dalji rad. Sa svakog od pregledanih lokaliteta dobijeni izolati vrha hife ispoljavali su uniformne osobine ukazujući da su se sve AG nalazile u pojedinačnim infekcijama. Za dalju karakterizaciju odabrano je 64 izolata vrha hife. Izolati su dalje svrstani u 11 različitih morfoloških grupa roda *Rhizoctonia*, odnosno AG, a rezultati su prikazani u skladu sa tim. U okviru 11 grupa - četiri AG pripadaju dvojedarnim *Rhizoctonia* spp. (AG-A, AG-G, AG-F, AG-U), šest AG pripadaju višejedarnim *R. solani* (AG-2-1, AG-2-2, AG-3, AG-4 HGI, AG-4 HGII, AG-6) i jedan varijetet pripada višejedarnoj *Waitea circinata* var. *zeae*. Identifikacija ovih 11 genotipova potvrđena je sekvenciranjem ITS regiona rDNA. Rezultati su prikazani prema frekvenciji izolacije i rasprostranjenosti grupa, odnosno broju useva i lokaliteta u kojima je potvrđeno njihovo prisustvo (Tabela 12). Tokom obilaska terena procenjena učestalost bolesti na svakom lokalitetu ili partiji krompira iznosila je od 5 do 35%.

Tabela 12. Poreklo izolata i učestalost bolesti u usevima/zasadima obuhvaćenim ispitivanjima

Godina	Lokalitet	Domaćin	Učestalost bolesti (%)	Prikupljeni uzorci	Izolovana <i>Rhizoctonia</i> AG/ <i>Waitea circinata</i> var.
2013	Subotica	jagoda	20	15	AG-A
2015	Krčedin	jabuka	15	8	AG-4 HGII
	Vašica	šećerna repa	30	8	AG-2-2
	Adaševci	šećerna repa	30	9	AG-2-2
2016	Beograd	jagoda	30	13	AG-A
	Togočevce	paradajz	25	6	AG-G
	Novi Sad	jagoda	30	12	AG-A
	Zaječar	jabuka	5	7	AG-U
	Futog 1	mrkva	20	72	AG-4 HGI
	Zelena pijaca (Zemun)	krompir	10	10	AG-3
	2017	Paraćin	paprika	20	10
Mladenovac	trešnja	5	7	AG-G	
Futog 2	pasulj	15	8	AG-G	
Futog 3	kupus	15	19	var. <i>zeae</i>	
Rimski Šančevi 1	kupus	15	15	AG-4 HGI	
Rimski Šančevi 2	uljana repica	20	24	var. <i>zeae</i>	

Godina	Lokalitet	Domaćin	Učestalost bolesti (%)	Prikupljeni uzorci	Izolovana <i>Rhizoctonia</i> AG/ <i>Waitea circinata</i> var.
2017	Rimski Šančevi 3	paprika	25	10	AG-4 HGI
	Rimski Šančevi 4	uljana repica	15	12	AG-4 HGI
2018	Zelena pijaca (Zemun)	krompir	10	10	AG-3
	Kruševac	jagoda	25	13	AG-A
	Kruševac	malina	10	6	AG-6
	Mačkovac	paprika	15	7	AG-F
	Šid	jagoda	35	10	AG-A
2019	Zelena pijaca (Zemun)	krompir	5	5	AG-3
2020	Beograd	livadarka	30	14	AG-U
Ukupno				330	

Dvojedarna *Rhizoctonia* spp. AG-A je u toku ovog istraživanja detektovana samo na biljkama jagode. U periodu od tri godine (2013, 2016, 2018) na pet lokaliteta (Subotica, Novi Sad, Šid, Beograd, Kruševac) i na pet sorti jagode (Camarosa, Asia, Roxana, Alba, Senga Sengana) zabeležena je pojava truleži korena koju je prouzrokovala *Rhizoctonia* spp. AG-A. Trulež se često širila duž redova u zasadima. Na poprečnom preseku korenovog vrata uočavala se nekroza (Slika 2A). Čest simptom je bila i mestimična nekroza korenovih žila (Slika 2B). Na nadzemnom delu bila je prisutna nekroza listova (Slika 2C). Svi uočeni simptomi često su se razvijali brzo i bolest se završavala uginućem celih biljaka. Iz 53 prikupljena uzorka korena, korenovog vrata i listova sa simptomima nekroze dobijeno je ukupno 16 izolata identifikovanih do nivoa roda, od kojih je pet izolata detaljno okarakterisano. Učestalost bolesti se razlikovala u zasadima i kretala se od 20 do 35%, a u proseku 27,5%.



Slika 2. Dvojedarna *Rhizoctonia* spp. AG-A: A – nekroza na poprečnom preseku korenovog vrata jagode; B – mestimična nekroza na korenovim žilicama jagode; C – sušenje i nekroza listova jagode

Dvojedarna *Rhizoctonia* spp. AG-G detektovana je ukupno na tri domaćina, na trešnji i na dve povrtarske biljke gajene na otvorenom polju, paradajzu i pasulju, u dve proizvodne godine (2016 i 2017) i na tri lokaliteta: Togočevce, Futog i Mladenovac. Prisustvo *Rhizoctonia* spp. AG-G zabeleženo je u usevu paradajza i pasulja gde je bilo uočljivo prisustvo sušenja biljaka, raspoređenih u grupama. Na paradajzu se javljalo i suženje u nivou korenovog vrata i nekroza na

poprečnom preseku korena (Slika 3A, B), a na pasulju trulež korena (Slika 3C). Na korenovim žilicama paradajza i pasulja bila je uočljiva mestimična nekroza. U zasadu trešnje starom dve godine uočena je pojava sušenja listova, a i celih sadnica raspoređenih u zonama, kao i nekroza na poprečnom preseku korena i trulež i sušenje korena (Slika 3D). Iz 21 prikupljenog uzorka korena i korenovog vrata sva tri domaćina sa simptomima nekroze dobijeno je ukupno osam izolata identifikovanih do nivoa roda, od kojih su tri izolata, po jedan sa svakog domaćina, detaljno okarakterisana. Učestalost bolesti se razlikovala u zavisnosti od biljke domaćina i kretala se od 5% kod trešnje i 15% kod pasulja do 25% kod paradajza.



Slika 3. Dvojedarna *Rhizoctonia* spp. AG-G: A - suženje stabla paradajza u nivou korenovog vrata i ogoljavanje tkiva; B – nekroza na poprečnom preseku stabla paradajza, C - nekrotična zona na korenovom vratu i ogoljavanje i mestimična nekroza korena pasulja; D - sušenje korena trešnje i prisustvo bele micelijske prevlake

Dvojedarna *Rhizoctonia* spp. AG-F tokom ovih istraživanja detektovana je na paprici u toku 2016. godine na otvorenom polju, na lokalitetu Mačkovac. Zaražene biljke bile su raspoređene u oazama. Biljke su ispoljavale simptome na nadzemnim delovima u vidu sušenja, sužavanja prizemnog stabla i povijanja u zoni korenovog vrata, gde je na poprečnom preseku uočena nekroza. Na korenu je bila izražena nekroza glavnog dela, dok je na bočnim žilicama uočena mestimična nekroza. Zaražene biljke su se vremenom sušile i u potpunosti propadale (Slika 4A, B). Iz sedam prikupljenih uzoraka paprike sa simptomima dobijena su četiri izolata sa uniformnim osobinama koja su identifikovana do nivoa roda, od kojih je jedan odabran i detaljno okarakterisan. Učestalost bolesti procenjena je na 15%.



Slika 4. Dvojedarna *Rhizoctonia* spp. AG-F: A - nekroza korenovih žilica paprike; B – nekroza na poprečnom preseku korenovog vrata paprike

Dvojedarna *Rhizoctonia* spp. AG-U je izolovana iz dva raznorodna domaćina, jabuke u toku 2016. godine na lokalitetu Zaječar i iz monokotiledonog useva trave livadarke jednogodišnje u toku 2020. godine na lokalitetu Beograd. Prilikom pregleda trogodišnjeg zasada jabuke uočene su promene u vidu paleži listova, kao i mestimične nekroze korenovih žilica i propadanja glavnog korena, što se odražavalo na opšte stanje biljaka (Slika 5A, B). Pregledom travnate površine, uočeno je prisustvo

sušenja biljaka uglavnom nepravilno raspoređenih u oazama. Kod nekih biljaka bila je uočljiva mestimična nekroza korena, kao i trulež korena (Slika 5C). Iz ukupno 21 prikupljenog uzorka korena i korenovog vrata jabuke i livadarke sa simptomima nekroze dobijeno je 10 izolata identifikovanih do nivoa roda, od kojih su dva, iz svakog domaćina po jedan, detaljno okarakterisana. Učestalost bolesti procenjena je na 5% u zasadu jabuke i 30% u usevu livadarke.



Slika 5. Dvojedarna *Rhizoctonia* spp. AG-U: A - nekroza korena jabuke; B – pojava rak rana i nekroza na poprečnom preseku stabla jabuke; C - mestimična nekroza listova i trulež korena livadarke (*Poa* sp.)

Višejedarna *Rhizoctonia solani* AG-2-1 detektovana je tokom ovih istraživanja u usevu paprike na otvorenom polju na lokalitetu Paraćin u toku 2017. godine. Pregledom useva uočeno je propadanje biljaka u grupama. Na glavnom delu korena bila je izražena nekroza, dok je na bočnim žilicama bila uočljiva mestimična nekroza. Nekroza je zahvatala i zonu korenovog vrata i bila je vidljiva na poprečnom preseku (Slika 6). Iz 10 prikupljenih uzoraka korena i korenovog vrata sa simptomima nekroze dobijeno je ukupno šest izolata identifikovanih do nivoa roda, od kojih je jedan identifikovan do nivoa AG i detaljno okarakterisan. Učestalost bolesti je procenjena na 20%.



Slika 6. Višejedarna *Rhizoctonia solani* AG-2-1: sužavanje korenovog vrata, mestimična nekroza i ogoljavanje korena paprike

Višejedarna *Rhizoctonia solani* AG-2-2 detektovana je na šećernoj repi u toku 2015. godine na dva lokaliteta, Adaševci i Vašica. Zaražene biljke na oba lokaliteta bile su raspoređene u grupama. Na korenu je uočena nekroza na glavnom delu, kao i pucanje kore gde su se u pukotine često naseljavali sekundarni mikroorganizmi doprinoseći nastanku većih šteta (Slika 7A). Na poprečnom preseku korena bili su prisutni nekrotični prstenovi (Slika 7B). Iz 17 prikupljenih uzoraka korena sa simptomima nekroze dobijeno je ukupno devet izolata sa uniformnim osobinama, identifikovanih do nivoa roda, od kojih su odabrana dva izolata i detaljno okarakterisana. Učestalost bolesti procenjena je na oba lokaliteta u proseku na 30%.



Slika 7. Višejedarna *Rhizoctonia solani* AG-2-2: A - trulež korena šećerne repe; B - nekroza na poprečnom preseku korena šećerne repe

Višejedarna *Rhizoctonia solani* AG-3 detektovana je na krtolama krompira u toku 2016, 2018, 2019. godine u šest partija konzumnog krompira u prometu na tržištu Republike Srbije. Na krtolama krompira uočena je pojava tamnih sklerocija koje su bile čvrsto pričvršćene na površini (Slika 8A, B). Na poprečnom preseku često su bili uočljivi nekrotični prstenovi. Nekroza je bila uočljiva na površini krtola. Pregledano je u proseku po 100 krtola po partiji. Učestalost bolesti razlikovala se u partijama, kretala se od 5 do 10%, u proseku 7,5%. Iz 25 prikupljenih uzoraka krtola krompira sa simptomima dobijeno je ukupno 17 izolata sa uniformnim osobinama identifikovanih do nivoa roda, od kojih je šest odabranih izolata detaljno okarakterisano.



Slika 8. Višejedarna *Rhizoctonia solani* AG-3: crne sklerocije na površini krtola krompira

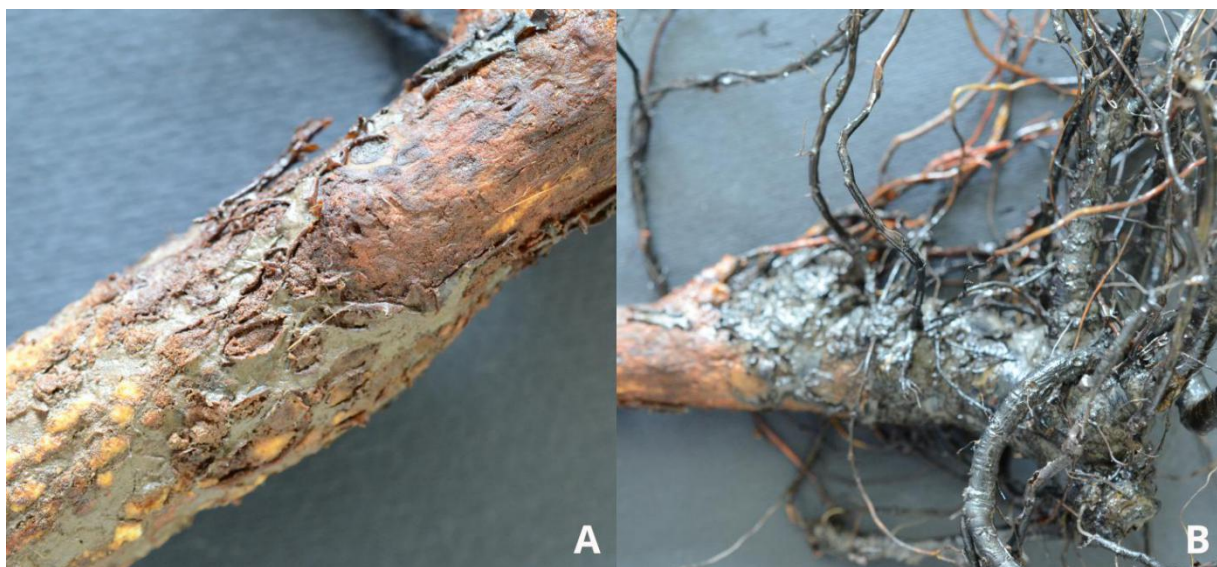
Višejedarna *Rhizoctonia solani* AG-4 HGI je tokom ovih istraživanja detektovana u četiri useva, na četiri različita domaćina, i to - mrkvi, paprici, kupusu i uljanoj repici, u toku dve godine (2016 i 2017), na dva lokaliteta (Futog i Rimski Šančevi). Pregledom useva mrkve uočena je pojava nekroze u nivou korenovog vrata, što je izazivalo poleganje biljaka. Bolest se u usevu javljala u oazama. Na nadzemnom delu (listovima i peteljkama) bilo je uočljivo prisustvo nekrotičnih zona. Zaražene biljke su se ubrzo sušile i propadale. Prisustvo nekrotičnih zona i razmekšavanja tkiva bilo je vidljivo i u zoni korenovog vrata (Slika 9A), gde je često bila prisutna micelijska prevlaka. Učestalost bolesti u usevu mrkve procenjena na 20%. U usevu paprike uočeno je sušenje listova na biljkama raspoređenim uglavnom u oazama, kao i pojava nekrotičnih zona i sužavanja stabla u zoni korenovog vrata. Učestalost bolesti u usevu paprike procenjena je na 25%. Pregledom useva uljane repice uočeno je sušenje biljaka nepravilno raspoređenih u oazama, a učestalost bolesti je procenjena na 15%. Na biljkama su bile vidljive nekrotične zone i suženje u nivou korenovog vrata

(Slika 9B). Na rasadu kupusa bilo je uočljivo lomljenje mladih biljaka u oazama, sa izraženom pojavom nekroze u nivou korenovog vrata i propadanjam korena (Slika 9C). Učestalost bolesti u usevu procenjena je na 15%. Iz 109 prikupljenih uzoraka korena i korenovog vrata četiri domaćina sa simptomima nekroze dobijeno je ukupno 75 izolata identifikovanih do nivoa roda, od kojih je 30 odabranih izolata detaljno okarakterisano.



Slika 9. Višejedarna *Rhizoctonia solani* AG-4 HGI: A - nekroza i trulež korenovog vrata mrkve; B - sužavanje i nekroza korenovog vrata uljane repice; C - nekroza korenovog vrata i korena kupusa

Višejedarna *Rhizoctonia solani* AG-4 HGII je tokom ovih istraživanja detektovana na biljkama jabuke u toku 2015. godine na lokalitetu Krčedin. Pregledom dvogodišnjeg zasada jabuke uočeno je prisustvo sušenja pojedinih biljaka. Učestalost bolesti procenjena je na 15%. Na sadnicama jabuke uočena je pojava ljuštenja kore stabla, truleži korena i nekroze sprovodnih sudova na poprečnom preseku u nivou korenovog vrata. Nakon određenog vremena zaražene sadnice su se sušile (Slika 10A, B). Iz osam prikupljenih uzoraka korena jabuke sa simptomima nekroze dobijena su ukupno tri izolata identifikovana do nivoa roda sa uniformnim osobinama, od kojih je jedan detaljno okarakterisan.



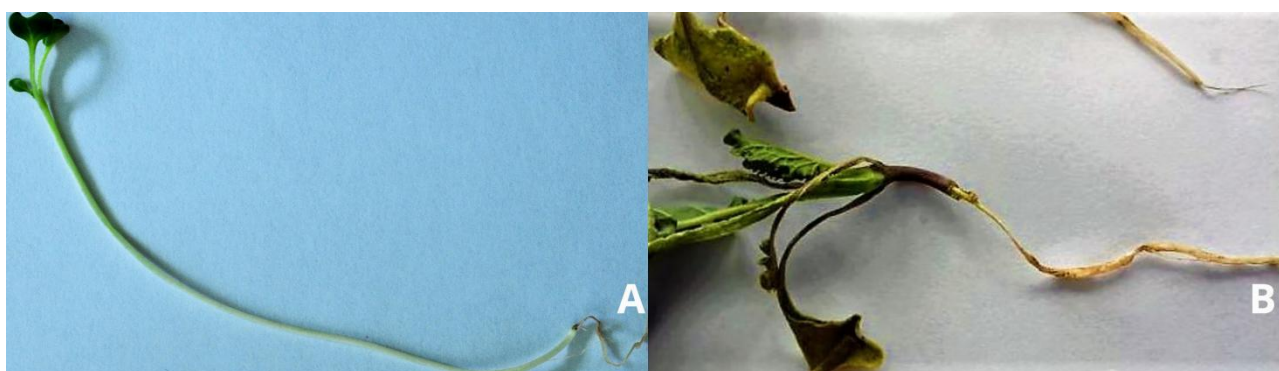
Slika 10. Višejedarna *Rhizoctonia solani* AG-4 HGII: A - ljuštenje kore i sužavanje u zoni korenovog vrata jabuke; B - nekroza i propadanje korena jabuke

Višejedarna *Rhizoctonia solani* AG-6 detektovana je tokom ovih istraživanja na biljkama maline u toku 2018. godine na lokalitetu Kruševac. Tokom pregleda zasada uočeno je sušenje pojedinih biljaka, raspoređenih duž redova. Učestalost bolesti je procenjena na 10%. Na podzemnim delovima uočena je trulež korena, ljuštenje kore i ogoljavanje korena, što je na kraju dovelo do sušenja biljaka (Slika 11A, B). Iz šest prikupljenih uzoraka korena maline sa simptomima nekroze, dobijena su ukupno tri izolata sa uniformnim osobinama, a jedan odabrani izolat je detaljno okarakterisan.



Slika 11. Višejedarna *Rhizoctonia solani* AG-6: A - nekrotične zone na korenovom vratu i korenu maline; B - ljuštenje kore maline u nivou prizemnog dela stabla

Višejedarna *Waitea circinata* var. *zeae* je tokom ovih istraživanja detektovana na biljkama kupusa u toku 2017. godine na lokalitetu Futog i na biljkama uljane repice, takođe u toku 2017. godine u lokalitetu Rimski Šančevi. Pregledom oba useva moglo se uočiti sušenje biljaka raspoređenih u grupama. Na biljkama kupusa uočena je trulež korena i sušenje biljaka, dok je na uljanoj repici uočena pojava hloroze, sušenja i propadanja biljaka (Slika 12A, B). Iz 43 prikupljena uzorka korena, korenovog vrata i listova kupusa i uljane repice sa simptomima nekroze dobijeno je ukupno 12 izolata koji su detaljno okarakterisani. Učestalost bolesti razlikovala se u usevima i kretala se od 15 do 20% u usevu kupusa odnosno uljane repice.



Slika 12. Višejedarna *Waitea circinata* var. *zeae*: A - nekroza i sužavanje u zoni korenovog vrata kupusa; B - mestimična nekroza korena uljane repice

5.2. Patogenost *Rhizoctonia* spp. na različitim biljkama

Za proveru patogenosti odabrano je ukupno 26 izolata, po jedan izolat sa svakog domaćina i sa svakog lokaliteta, tako da su sve detektovane AG bile zastupljene. U uslovima postavljenih eksperimenata, izolati su ostvarili zarazu inokulisanih živića jagode, listova maline i jabuke, biljaka

krompira i sejanaca različitih biljaka domaćina, odnosno izazvali pojavu simptoma koji su po izgledu odgovarali simptomima prirodnih zaraza. Iz svih zaraženih biljaka i biljnih delova na kojima su se razvili simptomi uspešno je izvršena reizolacija primenom istih metoda, čime su zadovoljeni Koch-ovi postulati, a dalji rad nastavljen je sa reizolatima.

Dvojedarna *Rhizoctonia* spp. AG-A. Od ukupno 16 dobijenih izolata, koji su ispoljili uniformne morfološke osobine, odabrana su četiri izolata za testove patogenosti. Sva četiri izolata (107-13, 101-16, 293-16, BJ4-18), ispoljila su patogenost na živićima jagode u uslovima staklenika. Na veštački inokulisanim živićima jagode 30 dana od inokulacije uočena je pojava nekroze na glavnom korenu, korenovim žilicama i korenovom vratu (Slika 13A). Sva četiri izolata prouzrokovala su mestimičnu nekroze na inokulisanim biljnim delovima. Na kontrolnim živićima jagode nije došlo do razvoja nekroze i drugih simptoma. Sva četiri izolata su lako i uspešno reizolovana.

Dvojedarna *Rhizoctonia* spp. AG-G. Od ukupno osam dobijenih izolata koji su ispoljii uniformne morfološke osobine, odabrana su tri izolata (296-17, 140-16, 163-17), poreklom sa tri domaćina, sa tri lokaliteta za koje je potvrđena patogenost na ispitivanim biljkama. Patogenost je dokazana na dva načina, u zavisnosti od toga sa kog domaćina potiče izolat, na sejancima za izolate sa pasulja i paradajza i na listovima i peteljkama trešnje za izolat sa trešnje. Na sejancima pasulja sedam dana nakon inokulacije izolat 296-17 je izazvao pojavu nekrotičnih zona i trulež korena. Na kontrolnim sejancima nije došlo do razvoja simptoma. Na sejancima paradajza izolat 140-16 je sedam dana nakon inokulacije izazvao pojavu nekrotičnih zona i suženja korenovog vrata i nekrozu i trulež korena (Slika 13B). Na kontrolnim sejancima nije došlo do razvoja simptoma. Izolat 163-17 je na listovima i peteljkama trešnje, izazvao pojavu nekrotičnih zona na i oko mesta inokulacije, kao i nekrotične zone na peteljkama prosečne dužine 12,3 mm, sedam dana nakon inokulacije (Slika 13C). Na kontrolnim listovima i peteljkama nije došlo do razvoja nekroze. Sva tri izolata su lako i uspešno reizolovana.

Dvojedarna *Rhizoctonia* spp. AG-F. Od ukupno četiri izolata koja su ispoljila uniformne morfološke osobine, odabran je izolat 190G-18 poreklom sa paprike za koji je proveravana patogenost. Sejanci paprike inokulisani izolatom 190G-18, ispoljili su pojavu nekrotičnih zona na korenovom vratu i nekrozu korenovih žila. Na kontrolnim sejancima nije došlo do razvoja simptoma. Ispitivani izolat je lako i uspešno reizolovan.

Dvojedarna *Rhizoctonia* spp. AG-U. Od 10 dobijenih izolata koji su ispoljii uniformne morfološke osobine, za proveru patogenosti odabrana su dva izolata, sa dva lokaliteta, poreklom sa dva domaćina jabuke i livadarke. Patogenost izolata sa jabuke proverena je na dva načina, na listovima jabuke, gde je uočena pojava nekrotičnih zona na i oko mesta inokulacije nakon sedam dana i na lisnim peteljkama gde je nakon sedam dana uočena nekrotična zona prosečne dužine 16,4 mm. Na kontrolnim listovima i peteljkama nije došlo do razvoja simptoma. Patogenost je proveravana i na sejancima jabuke na kojima je sedam dana nakon inokulacije uočena nekroza i propadanje korena. Na kontrolnim sejancima nije došlo do razvoja simptoma. Patogenost izolata sa livadarke jednogodišnje proveravana je na biljkama livadarke u uslovima staklenika, a 15 dana od inokulacije na korenu je uočena pojava mestimične nekroze korenovih žila i truleži i nekroza korena. Na kontrolnim biljkama nije došlo do pojave nekroze. Ispitivani izolati su uspešno reizolovani.

Višejedarna *Rhizoctonia solani* AG-2-1. Od ukupno šest dobijenih izolata koji su ispoljili uniformne morfološke osobine, za proveru patogenosti, odabran je izolat 137-17 poreklom sa paprike. Sedam dana nakon inokulacije ovaj izolat izazvao je pojavu nekrotičnih zona na korenovom vratu i nekrozu korenovih žila na sejancima paprike (Slika 13D). Na kontrolnim sejancima nije došlo do razvoja simptoma. Ispitivani izolat je lako i uspešno reizolovan i poslužio je za dalji rad.

Višejedarna *Rhizoctonia solani* AG-2-2. Od ukupno devet dobijenih izolata koji su ispoljili ujednačene morfološke osobine, za proveru patogenosti odabrana su dva izolata 270-15 i 271-15, poreklom sa šećerne repe sa dva lokaliteta, koji su sedam dana nakon inokulacije izazvali pojavu

nekroze korenovih žila i glavnog dela korena sejanaca šećerne repe. Na kontrolnim sejancima nije došlo do razvoja simptoma. Oba ispitivana izolata su uspešno reizolovana.

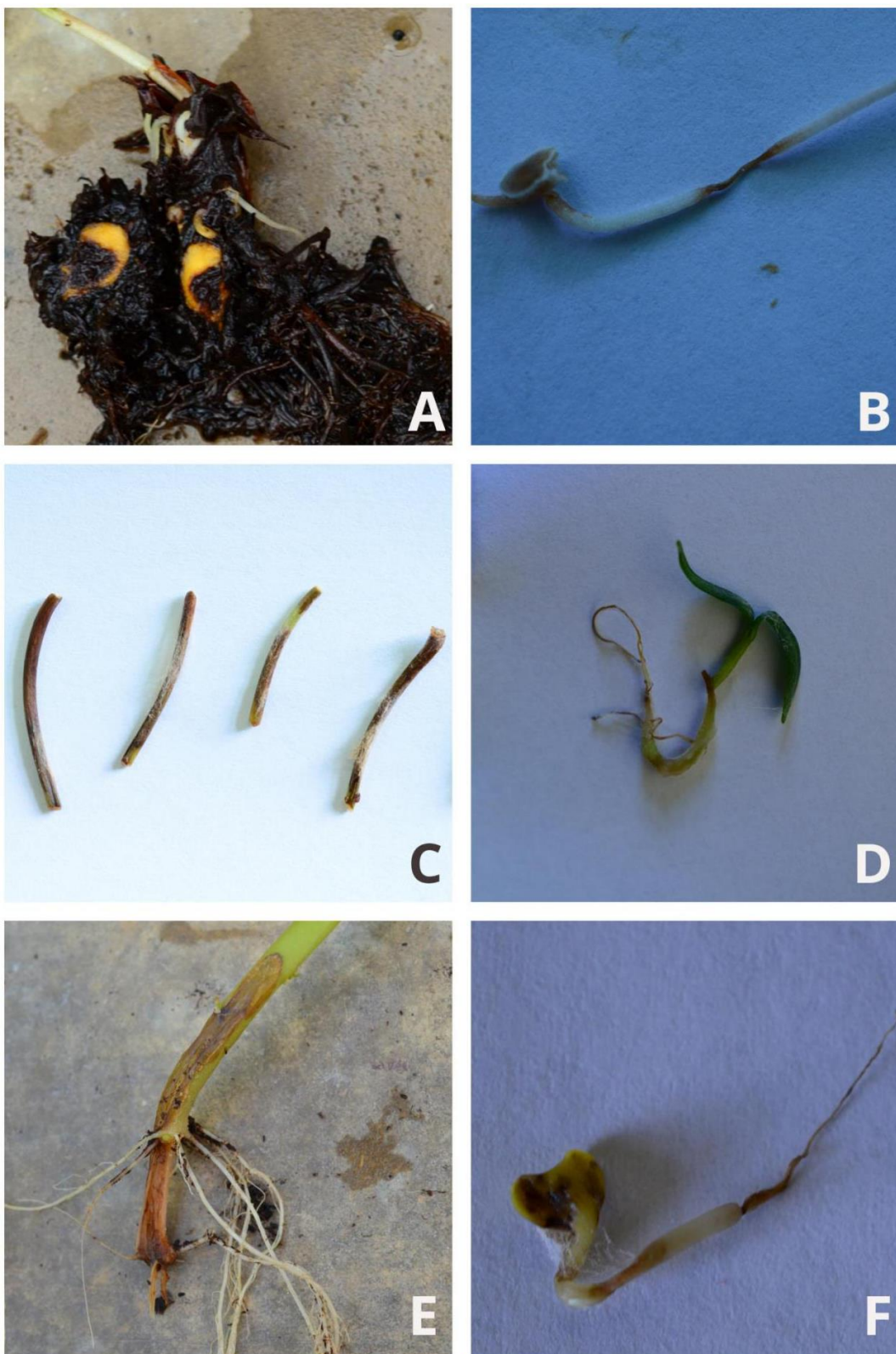
Višejedarna *Rhizoctonia solani* AG-3. Od ukupno 17 dobijenih izolata koji su ispoljili ujednačene morfološke osobine, odabrana su četiri izolata (98-16, 14G-18, 252G-18, 2G-19) poreklom iz četiri partije krompira, čija patogenost je proveravana u uslovima staklenika. Na biljkama krompira 30 dana od inokulacije uočena je pojava nekroze i mestimične nekroze na korenu, korenovim žilama, korenovom vratu i delu stabla (Slika 13E). Na kontrolnim biljkama nije došlo do razvoja simptoma. Svi ispitivani izolati su uspešno reizolovani.

Višejedarna *Rhizoctonia solani* AG-4 HGI. Od ukupno 75 dobijenih izolata koji su ispoljili uniformne morfološke osobine za proveru patogenosti odabrano je šest izolata, poreklom sa četiri domaćina, iz četiri useva sa dva lokaliteta. Patogenost je proveravana na sejancima mrkve za izolate 433-16, 443-16 i 456-16, odnosno na sejancima kupusa, uljane repice i paprike za izolate 297-17, 301-17 i 303-17. Na sejancima mrkve sedam dana nakon inokulacije uočena je pojava nekroze korena, ali i propadanja celih biljaka. Na sejancima kupusa, sedam dana nakon inokulacije, uočena je pojava suženja na korenovom vratu i nekroza korena. Na sejancima uljane repice, sedam dana nakon inokulacije, uočena je pojava nekroze i propadanja korena. Na sejancima paprike, sedam dana nakon inokulacije, uočena je pojava propadanja celih biljaka. Na kontrolnim sejancima sve četiri biljke nije došlo do razvoja simptoma. Svih šest ispitivanih izolata uspešno je reizolovano.

Višejedarna *Rhizoctonia solani* AG-4 HGII. Od ukupno osam dobijenih izolata koji su ispoljili uniformne morfološke osobine za proveru patogenosti, odabran je izolat 238-15 poreklom sa jabuke. Patogenost je proveravana na dva načina. Prvo, na listovima i peteljka lista jabuke, gde je uočena pojava nekrotičnih zona na i oko mesta inokulacije na listu nakon sedam dana, a nekrotične zone na peteljka listova jabuke prosečne dužine od 9,6 mm posle sedam dana. Na kontrolnim listovima i lisnim peteljka nije došlo do razvoja simptoma. Drugo, na sejancima jabuke, gde je sedam dana nakon inokulacije uočena nekroza i propadanje korena. Na kontrolnim sejancima nije došlo do razvoja simptoma. Ispitivani izolat je lako i uspešno reizolovan.

Višejedarna *Rhizoctonia solani* AG-6. Od ukupno tri dobijena izolata koja su ispoljila ujednačene morfološke osobine, za proveru patogenosti, odabran je izolat 251G-18 poreklom sa maline. Patogenost je proveravana na listovima i lisnim peteljka maline. Na listovima je posle sedam dana uočena pojava nekrotičnih zona na i oko mesta inokulacije na listu, a na peteljka pojava nekrotičnih zona prosečne dužine od 18,8 mm. Na kontrolnim listovima i peteljka listova nije došlo do razvoja simptoma. Ispitivani izolat je lako i uspešno reizolovan.

Višejedarna *Waitea circinata* var. *zeae*. Od ukupno 12 dobijenih izolata koji su ispoljili uniformne morfološke osobine, za proveru patogenosti, odabrana su dva izolata 299-17 i 300-17, poreklom sa kupusa odnosno uljane repice. Patogenost je proveravana na sejancima kupusa za izolat 299-17 i na uljanoj repici za izolat 300-17. Sedam dana nakon inokulacije uočena je pojava nekroze korenovih žila i glavnog dela korena obe biljke (Slika 13F). Na kontrolnim sejancima nije došlo do razvoja simptoma. Ispitivani izolati uspešno su reizolovani.



Slika 13. Patogenost izolata *Rhizoctonia* spp. iz Srbije na različitim domaćinima primenom različitih metoda: A - dvojedarna *Rhizoctonia* spp. AG-A - nekroza korena živića jagode; B - dvojedarna *Rhizoctonia* spp. AG-G - nekroza i sužavanje stabla paradajza; C - dvojedarna *Rhizoctonia* spp. AG-G - mestimična nekroza lisnih peteljki trešnje; D - višejedarna *Rhizoctonia solani* AG-2-1 - nekroza korena paprike; E - višejedarna *Rhizoctonia solani* AG-3 - ogoljavanje i nekroza korenovog sistema, korenovog vrata i prizemnog dela stabla krompira; F - višejedarna *Waitea circinata* var. *zae* - mestimična nekroza korena kupusa

5.3. Morfološke odlike i brzina porasta izolata *Rhizoctonia* spp.

Svi proučavani izolati su pri gajenju na PDA ispoljili tipične karakteristike kompleksa *Rhizoctonia* spp. što podrazumeva zrakast raspored hifa u kolonijama na kojima se uočavaju zone različite obojenosti, kao i karakteristično grananje hifa pod pravim uglom u blizini distalne septe, sužavanje hifa i formiranje septe posle mesta grananja (Slika 14). Ukupno 64 izolata ispoljila su različitu brzinu porasta, što su potvrdile statističke analize odabranih predstavnika iz svake AG (Tabela 13). Ukupno 64 izolata koja su morfološki odgovarala osobinama 11 AG okarakterisana su, a specifične osobine će u daljem tekstu biti predstavljene pojedinačno za svaku detektovanu AG.

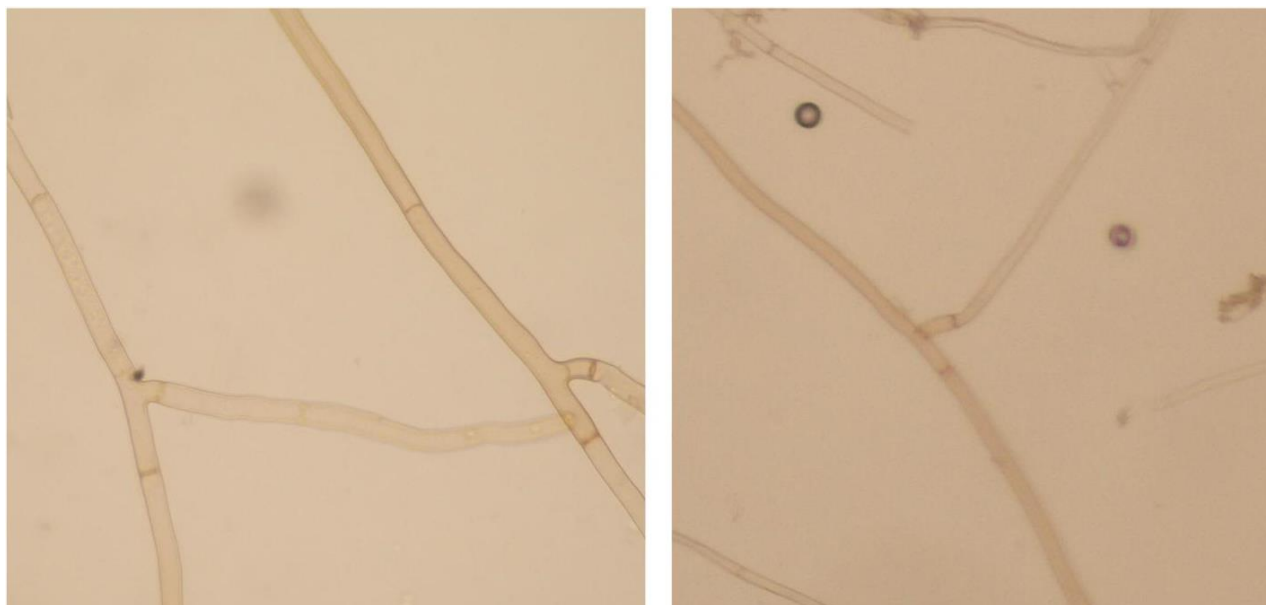
Dvojedarna *Rhizoctonia* spp. AG-A. Grupa od 16 izolata poreklom sa jagode koja je morfološki odgovarala osobinama *Rhizoctonia* sp. AG-A ispoljila je uniformne morfološke osobine. Za detaljnije proučavanje morfoloških karakteristika, kao i merenje porasta i anastomozno uparivanje odabrano je pet izolata 107-13, 101-16, 293-16, BJ4-18, poreklom sa pet različitih lokaliteta. Izolati su na PDA u početku obrazovali koncentrično zonirane kolonije, ravnog oboda i bele boje (Slika 15A) i nisu obrazovali sklerocije. Zapaženo je da kolonije brzo rastu. Tri dana nakon zasejavanja uočeno je prisustvo moniliformnih ćelija (Slika 18A, B). U ćelijama mladih hifa uočena su po dva jedra (Slika 18C). Prosečan porast ispitivanih izolata bio je 11,2 - 13,2 mm/dan (prosečno 12,2 mm/dan) (Tabela 14). Razlika između ispitivanih izolata u prosečnom dnevnom porastu bila je statistički značajna ($p < 0,01$). Izvojile su se tri grupe izolata. U prvu grupi se izdvojio izolat 107-13 sa najmanjim porastom, dok su sa najvećom brzinom porasta bili izolati 101-16 i BJ4-18. Pregled proučenih makroskopskih i mikroskopskih morfoloških karakteristika *Rhizoctonia* spp. AG-A dat je u Tabeli 14.

Dvojedarna *Rhizoctonia* spp. AG-G. Grupa od osam izolata koja je morfološki odgovarala osobinama *Rhizoctonia* sp. AG-G ispoljila je uniformne morfološke osobine. Od njih su za proučavanje morfoloških karakteristika, kao i merenje porasta i anastomozno uparivanje odabrana tri izolata (140-16 izolovan sa paradajza, 163-17 sa trešnje i 296-17 sa pasulja). Sva tri izolata su na PDA u početku obrazovali koncentrično zonirane kolonije bež boje, koje postepeno postaju smeđe, ravnog oboda na kojima se posle sedam dana obrazuju smeđe sklerocije raspoređene po celoj površini kolonija (Slika 15B). Tri dana posle zasejavanja uočava se koncentrična zoniranost. Zapaženo je da kolonije brzo rastu. Tri dana nakon zasejavanja uočeno je prisustvo moniliformnih ćelija. U ćelijama mladih hifa bila su prisutna po dva jedra. Prosečan porast ispitivanih izolata kretao se od 10,5 - 18,2 mm/dan (prosečno 14,3 mm/dan) (Tabela 14). Razlika u prosečnom dnevnom porastu između ispitivanih izolata je bila statistički značajna ($p < 0,01$), a izdvojile su se dve grupe izolata. Izolat 140-16 ispoljio je najmanji porast. Drugu grupu su činili izolati poreklom sa pasulja 296-17 i trešnje 163-17. Pregled proučenih makroskopskih i mikroskopskih morfoloških karakteristika *Rhizoctonia* spp. AG-G dat je u Tabeli 14.

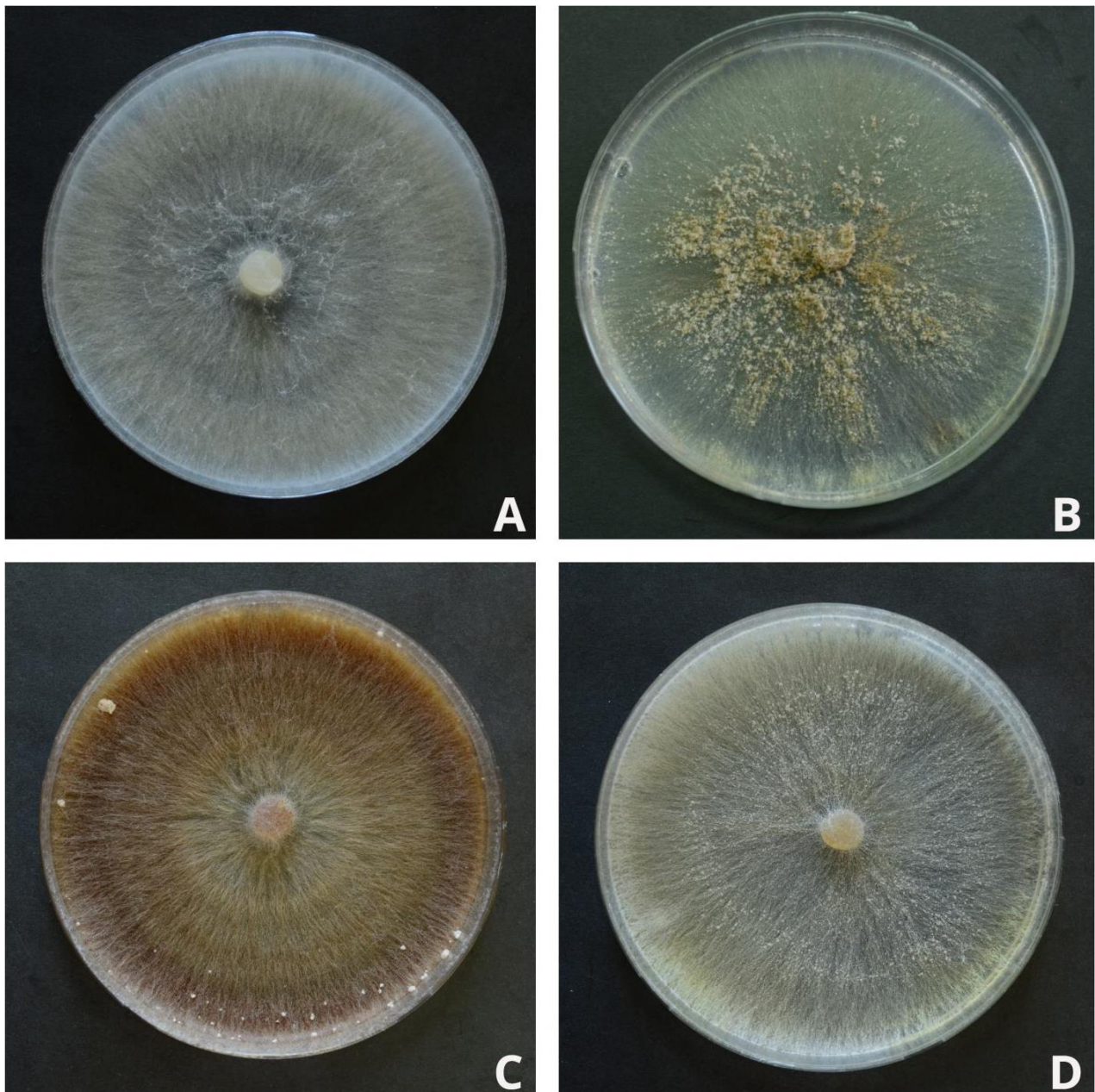
Dvojedarna *Rhizoctonia* spp. AG-F. Grupa od sedam izolata koja je morfološki odgovarala osobinama *Rhizoctonia* sp. AG-F ispoljila je uniformne morfološke osobine. Izolat 190G-18 sa paprike na PDA je u početku obrazovao koncentrično zoniranu koloniju, ravnog oboda, bež boje, koja postepeno postaje za nijansu tamnije bež boje posle sedam dana, na kojoj se obrazuju sklerocije bež boje raspoređene po celoj površini kolonije (Slika 15C). Tri dana nakon zasejavanja uočeno je prisustvo moniliformnih ćelija. U ćelijama mladih hifa uočena su po dva jedra. Zapaženo je da kolonije brzo rastu. Prosečan porast ispitivanog izolata bio je 21,88 mm/dan (Tabela 14). Pregled proučenih makroskopskih i mikroskopskih morfoloških karakteristika *Rhizoctonia* spp. AG-F dat je u tabeli Tabela 14.

Dvojedarna *Rhizoctonia* spp. AG-U. Grupa od 10 izolata koja je morfološki odgovarala osobinama *Rhizoctonia* sp. AG-U ispoljila je uniformne morfološke osobine. Odabrana su dva izolata 314-16 i 16G-20 sa jabuke i livadarke, koji su na PDA u početku obrazovali koncentrično zonirane kolonije, ravnog oboda i bež boje. Kolonije postepeno postaju za nijansu tamnije bež boje i posle 10 dana obrazuju se sklerocije bež boje raspoređene po celoj površini kolonije (Slika 15D). Tri dana posle

zasejavanja uočava se koncentrična zoniranost. Zapaženo je da kolonije brzo rastu. Tri dana nakon zasejavanja formiraju se moniliformne ćelije. U ćelijama mladih hifa bila su prisutna po dva jedra. Prosečan porast ispitivanih izolata bio je od 18,5 do 18,8 mm/dan (prosečno 18,6 mm/dan) (Tabela 14). Pregled proučenih makroskopskih i mikroskopskih morfoloških karakteristika *Rhizoctonia* spp. AG-U dat je u Tabeli 14.



Slika 14. *Rhizoctonia* spp. mikroskopske odlike micelije tri dana starih kolonija na PDA: Karakteristično grananje pod pravim uglom sa suženjem i septom blizu mesta grananja



Slika 15. Dvojedarne *Rhizoctonia* spp.: izgled kolonija starih 15 dana odgajenih na PDA: A - kolonija *Rhizoctonia* spp. AG-A; B - kolonija *Rhizoctonia* spp. AG-G; C - kolonija *Rhizoctonia* spp. AG-F; D - kolonija *Rhizoctonia* spp. AG-U

Višejedarna *Rhizoctonia solani* AG-2-1. Grupa od šest izolata koja je morfološki odgovarala osobinama *R. solani* AG-2-1 poreklom sa paprike ispoljila je uniformne morfološke osobine. Odabrani izolat 137-17 je na PDA obrazovao koncentrično zoniranu koloniju bež boje i ravnog oboda, koja postepeno postaje svetlosmeđe boje, na kojoj se posle sedam dana obrazuju sklerocije krem do smeđe boje raspoređene po celoj površini kolonije (Slika 16A). Tri dana nakon zasejavanja uočeno je prisustvo moniliformnih ćelija (Slika 18A, B). U ćelijama mladih hifa uočeno je više jedara, najčešće od četiri do sedam (Slika 18D). Prosečan porast ispitivanog izolata bio je 8,5 mm/dan (Tabela 15). Pregledom proučenih makroskopskih i mikroskopskih morfoloških karakteristika *R. solani* AG-2-1 dat je u Tabeli 15.

Višejedarna *Rhizoctonia solani* AG-2-2. Grupa od devet izolata koja je morfološki odgovarala osobinama *R. solani* AG-2-2 ispoljila je uniformne morfološke osobine. Dva odabrana izolata 270-15 i 271-15, poreklom sa šećerne repe su na PDA u početku obrazovali kolonije žute boje, koje postepeno postaju braon, na kojima se posle sedam dana obrazuju sklerocije smeđe boje, raspoređene po obodu kolonije (Slika 16B). Tri dana posle zasejavanja uočava se koncentrična

zoniranost. Zapaženo je da kolonije brzo rastu i da su ravnog oboda. Prosečan porast izolata bio je od 17,08 do 17,38 mm/dan (prosečno 17,15 mm/dan) (Tabela 15). Tri dana nakon zasejavanja uočeno je prisustvo moniliformnih ćelija. U ćelijama mladih hifa uočavano je više jedara, najčešće od tri do pet. Razlika u prosečnom dnevnom porastu između ispitivanih izolata bila je statistički značajna ($p < 0,01$). Pregled proučenih makroskopskih i mikroskopskih morfoloških karakteristika *R. solani* AG-2-2 dat je u Tabeli 15.

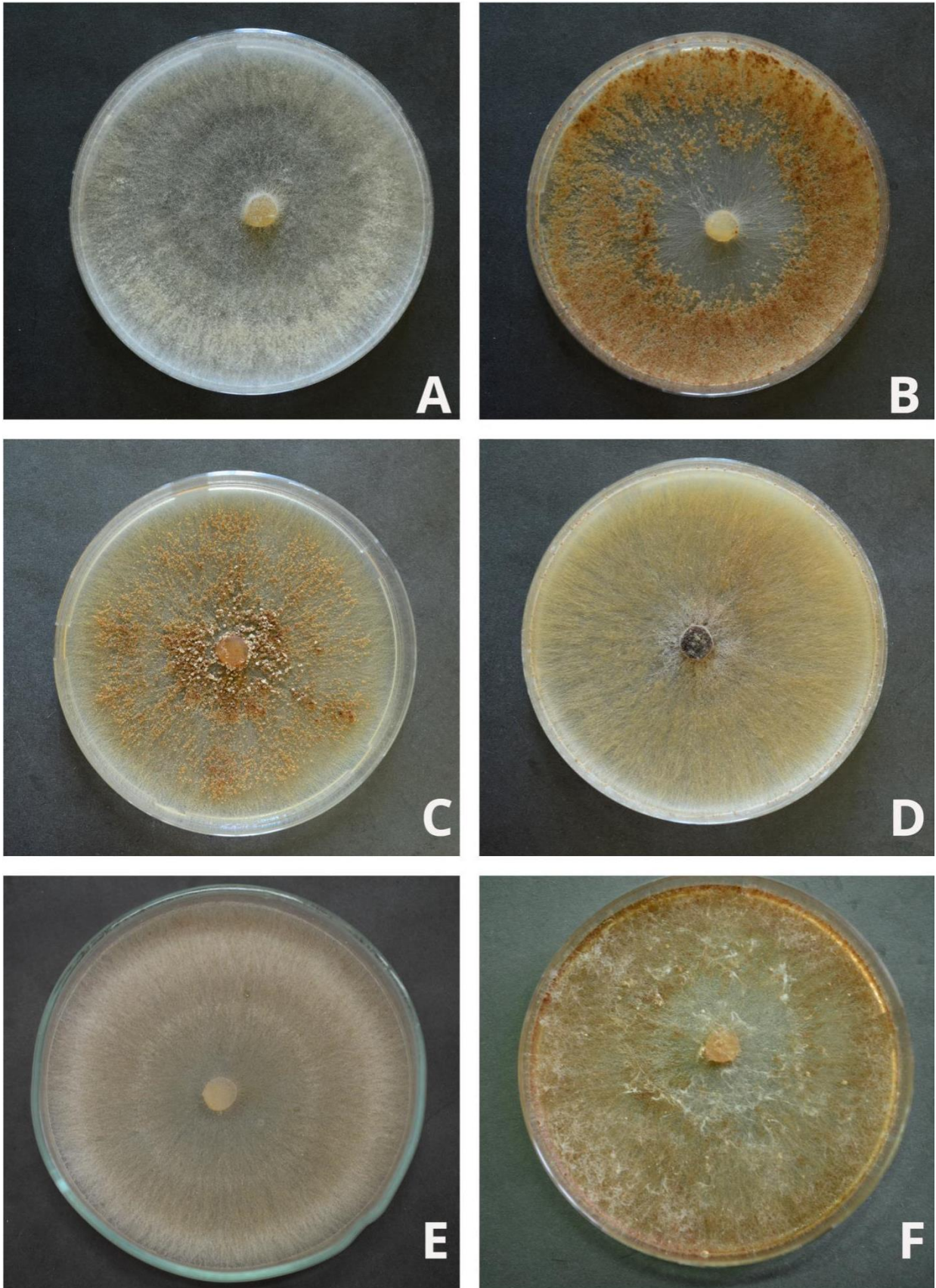
Višejedarna *Rhizoctonia solani* AG-3. Grupa od 17 izolata koja je morfološki odgovarala osobinama *R. solani* AG-3 sa krompira ispoljila je uniformne morfološke osobine. Izolati 98-16, 14G-18, 252G-18, 270G-18, 271G-18, 2G-19 su u početku razvoja na PDA obrazovali kolonije ravnog oboda, svetlosmeđe boje, koje postepeno postaju tamnosmeđe, na kojima se posle sedam dana obrazuju sklerocije smeđe boje raspoređene po celoj koloniji (Slika 16C). Tri dana posle zasejavanja uočava se koncentrična zoniranost, kao i prisustvo moniliformnih ćelija. U ćelijama mladih hifa bilo je prisutno više jedara, najčešće od četiri do šest. Zapaženo je da kolonije brzo rastu. Prosečan porast ispitivanih izolata bio je 20,2 - 23 mm/dan (prosečno 21,6 mm/dan) (Tabela 15). Razlika u prosečnom dnevnom porastu između ispitivanih izolata bila je statistički značajna ($p < 0,01$) a izdvojile su se četiri nepreklapajuće grupe izolata. U prvoj grupi se izdvojio jedan izolat 98-16 sa najmanjim porastom, dok se sa najvećom brzinom porasta izdvojio izolat 14G-18. Pregled proučenih makroskopskih i mikroskopskih morfoloških karakteristika *R. solani* AG-3 dat je u Tabeli 15.

Višejedarna *Rhizoctonia solani* AG-4 HGI. Grupa od 75 izolata koja je morfološki odgovarala osobinama *R. solani* AG-4 HGI ispoljila je uniformne morfološke osobine. Ukupno je odabrano 30 izolata 433 - 456-16, 297 - 298-17, 301 - 304-17, izolovanih sa mrkve, kupusa, uljane repice i paprike. Na PDA izolati su u početku obrazovali kolonije bež boje, ravnog oboda, koje postepeno postaju tamnije bež sa zrakastim delovima svetlosmeđe boje, na kojima se posle 7-10 dana obrazuju sklerocije bež boje pretežno raspoređene po obodu kolonije (Slika 16D). Tri dana nakon zasejavanja uočeno je prisustvo moniliformnih ćelija. U ćelijama mladih hifa uočavano je više jedara, najčešće od četiri do osam. Zapaženo je da kolonije brzo rastu. Prosečan porast ispitivanih izolata bio je 7,7 - 27,3 mm/dan (prosečno 18,4 mm/dan) (Tabela 15). Razlika u prosečnom dnevnom porastu između ispitivanih izolata bila je statistički značajna ($p < 0,01$), a izvojilo se 14 preklapajućih grupa. Izolat 453-16 ispoljio je najmanji porast, dok je najveći porast zabeležen za izolat 444-16. Pregled proučenih makroskopskih i mikroskopskih morfoloških karakteristika *R. solani* AG-4 HGI dat je u Tabeli 15.

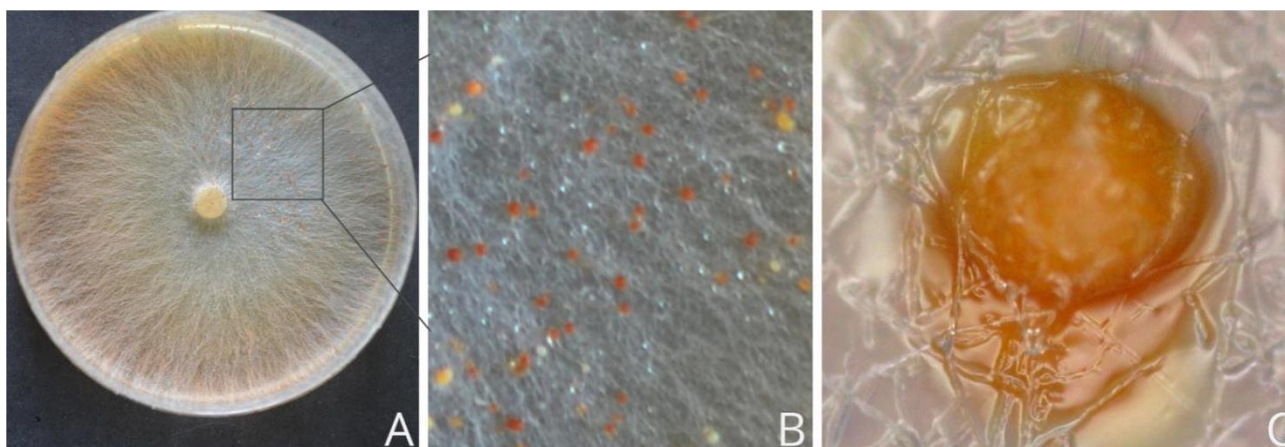
Višejedarna *Rhizoctonia solani* AG-4 HGII. Grupa od tri izolata poreklom sa jabuke koja je morfološki odgovarala osobinama *R. solani* AG-4 HGII ispoljila je uniformne morfološke osobine. Odabrani izolat 238-15 na PDA u početku obrazovao koloniju bež boje, ravnog oboda, koja postepeno postaje svetlosmeđe boje, na kojoj se posle 10 dana obrazuju sklerocije bež boje raspoređene uglavnom po obodu kolonije (Slika 16E). Tri dana nakon zasejavanja uočeno je prisustvo moniliformnih ćelija. U ćelijama mladih hifa bilo je više jedara, najčešće od četiri do sedam. Zapaženo je da kolonije brzo rastu. Prosečan porast ispitivanog izolata bio je 15,2 mm/dan (Tabela 15). Pregled proučenih makroskopskih i mikroskopskih morfoloških karakteristika *R. solani* AG-4 HGII dat je u Tabeli 15.

Višejedarna *Rhizoctonia solani* AG-6. Grupa od tri izolata poreklom sa maline koja je morfološki odgovarala osobinama *R. solani* AG-6 ispoljila je uniformne morfološke osobine, a odabrani izolat 251G-18 je na PDA u početku obrazovao koloniju svetlosmeđe boje, ravnog oboda koja postepeno postaje tamnosmeđe boje, na kojoj se posle 10 dana obrazuju sklerocije smeđe boje raspoređene po obodu kolonije u najvećem broju (Slika 16F). Tri dana nakon zasejavanja uočeno je prisustvo moniliformnih ćelija. U ćelijama mladih hifa uočeno je više jedara, najčešće od tri do pet. Zapaženo je da kolonije brzo rastu. Prosečan porast ispitivanog izolata bio je 19,4 mm/dan (Tabela 15). Pregled proučenih makroskopskih i mikroskopskih morfoloških karakteristika *R. solani* AG-6 dat je u Tabeli 15.

Višejedarna *Waitea circinata*. Grupa od 12 izolata koja je morfološki odgovarala osobinama *Waitea circinata* ispoljila je uniformne morfološke osobine. Odabrani izolati 299-17-0 - 299-17-5 i 300-17-0 - 300-17-5 izolovani sa kupusa i uljane repice su u početku razvoja obrazovali kolonije bež boje, ravnog oboda, koje postepeno postaju svetlonarandžaste, na kojima se posle 15 dana obrazuju sklerocije narandžaste boje raspoređene po celoj koloniji na PDA (Slika 17A, B, C). Tri dana nakon zasejavanja uočeno je prisustvo moniliformnih ćelija. U ćelijama mladih hifa uočavano je više jedara, najčešće od četiri do sedam. Zapaženo je da kolonije brzo rastu. Prosečan porast ispitivanih izolata bio je 15,2 - 16,1 mm/dan (prosečno 15,7 mm/dan) (Tabela 16). Razlika u prosečnom dnevnom porastu između ispitivanih izolata bila je statistički značajna ($p < 0,01$). Pregled proučenih makroskopskih i mikroskopskih morfoloških karakteristika *Waitea circinata* var. *zeae* dat je u Tabela 16.



Slika 16. Višejedarne *Rhizoctonia solani* izgled kolonija starih 15 dana odgajenih na PDA: A - kolonija *R. solani* AG-2-1; B - kolonija *R. solani* AG-2-2; C - kolonija *R. solani* AG-3; D - kolonija *R. solani* AG-4 HGI; E - kolonija *R. solani* AG-4 HGII; F - kolonija *R. solani* AG-6



Slika 17. Višejedarna *Waitea* spp.: izgled kolonija starih 15 dana i sklerocija odgajenih na PDA: A - kolonija; B - sklerocije u kulturi; C - sklerocija, detalj

Tabela 13. Prosečni porast odabranih izolata *Rhizoctonia* spp. i srodnih vrsta poreklom iz Srbije svrstanih u 11 detektovanih anastomoznih grupa (AG) i varijeteta

<i>Rhizoctonia</i> spp. AG/ <i>Waitea circinata</i> var.	Izolat	Prosečan porast ± standardna devijacija
AG-2-1	137-17	8,5±0 a*
AG-A	107-13	11,2±0,28 b
AG-4 HGII	238-15	15,2±0,14 c
var. <i>zeae</i>	299-17	15,98±0,28 d
AG-2-2	270-15	17,08±0 e
AG-G	296-17	17,99±0,2 f
AG-U	314-16	18,86±0,26 g
AG-4 HGI	303-17	19±0,20 g
AG-6	251G-18	19,4±0,26 h
AG-F	190G-18	21,88±0,21 i
AG-3	14G-18	22,98±0,27 j

*-Vrednosti obeležene istim slovima ne razlikuju se statistički značajno (Duncan test, $p < 0,01$)

Tabela 14. Pregled morfoloških karakteristika odabranih izolata dvojedarnih *Rhizoctonia* spp. AG poreklom iz Srbije

<i>Rhizoctonia</i> spp. AG	Izolat	Boja/ Bujnost kolonije	Koncentrični prstenovi	Raspored sklerocija/boja	Vreme formiranja sklerocija	Brzina porasta mm/dan ± standardna devijacija	Moniliformne ćelije
AG-A	107-13	Bež/slabo bujna	Prisutni	Nema	-	11,2±0,3	Prisutne
	101-16	Bež/slabo bujna	Prisutni	Nema	-	13,2±0,7	Prisutne
	293-16	Bež/slabo bujna	Prisutni	Nema	-	11,5±0,3	Prisutne
	BJ4-18	Bež/slabo bujna	Prisutni	Nema	-	13,0±0,1	Prisutne
	254G-18	Bež/slabo bujna	Prisutni	Nema	-	13,0±0,4	Prisutne
AG-G	140-16	Smeđa/vrlo bujna	Prisutni	Ravnomerno raspoređene/ svetlosmeđe	>5 dana	10,5±0,2	Prisutne
	163-17	Smeđa/vrlo bujna	Prisutni	Po obodu/ Svetlosmeđe	7 dana	18,2±0,2	Prisutne
	296-17	Smeđa/vrlo bujna	Prisutni	Ravnomerno raspoređene/ smeđe	7 dana	18±0,2	Prisutne
AG-F	190G-18	Bež/slabo bujna	Prisutni	Ravnomerno raspoređene/ smeđe	7 dana	21,9±0,2	Prisutne
AG-U	314-16	Bež/slabo bujna	Prisutni	Ravnomerno raspoređene/ svetlosmeđe	>15 dana	18,8±0,3	Prisutne
	16G-20	Bež/slabo bujna	Prisutni	Ravnomerno raspoređene/ svetlosmeđe	>15 dana	18,5±0,3	Prisutne

Tabela 15. Morfološke karakteristike odabranih izolata višejedarnih *Rhizoctonia solani* AG poreklom iz Srbije

<i>Rhizoctonia</i> spp. AG	Izolat	Boja/ Bujnost kolonije	Koncentrični prstenovi	Raspored sklerocija/boja	Vreme formiranja sklerocija	Brzina porasta mm/dan± standardna devijacija	Moniliformne ćelije
AG-2-1	137-17	Bež/slabo bujna	Prisutni	Na centru raspoređene/smeđe	>7 dana	8,6±0	Prisutne
AG-2-2	270-15	Žutosmeđa/slabo bujna	Prisutni	Na centru raspoređene/smeđe	>7 dana	17,1±0	Prisutne
	271-15	Žutosmeđa/slabo bujna	Prisutni	Na centru raspoređene/smeđe	>7 dana	17,4±0,1	Prisutne
AG-3	14G-18	Svetlosmeđa/slabo bujna	Prisutni	Ravnomerno raspoređjene/smeđe	7 dana	23±0,3	Prisutne
	98-16	Svetlosmeđa/slabo bujna	Prisutni	Ravnomerno raspoređjene/smeđe	7 dana	20,2±0,4	Prisutne
	252G-18	Svetlosmeđa/slabo bujna	Prisutni	Ravnomerno raspoređjene/smeđe	7 dana	22,2±0,2	Prisutne
	270G-18	Svetlosmeđa/slabo bujna	Prisutni	Ravnomerno raspoređjene/smeđe	7 dana	22,2±0,3	Prisutne
	271G-18	Svetlosmeđa/slabo bujna	Prisutni	Ravnomerno raspoređjene/smeđe	7 dana	21,6±0,2	Prisutne
	2G-19	Svetlosmeđa/slabo bujna	Prisutni	Ravnomerno raspoređjene/smeđe	7 dana	20,5±0,4	Prisutne
AG-4 HGI	297-17	Bež sa zrakastim primesama svetlo žutih delova/slabo bujna	Nisu prisutni	Ravnomerno raspoređjene/ svetlosmeđe	>10 dana	22,7±0,4	Prisutne
	298-17	Bež sa zrakastim primesama svetlo delova/slabo bujna	Nisu prisutni	Ravnomerno raspoređjene/ svetlosmeđe	10 dana	16,4±0,1	Prisutne
	301-17	Bež sa zrakastim primesama svetložutih delova/slabo bujna	Nisu prisutni	Ravnomerno raspoređjene/ svetlosmeđe	>7 dana	17,2±0,2	Prisutne

<i>Rhizoctonia</i> spp. AG	Izolat	Boja/ Bujnost kolonije	Koncentrični prstenovi	Raspored sklerocija/boja	Vreme formiranja sklerocija	Brzina porasta mm/dan± standardna devijacija	Moniliformne ćelije
AG-4 HGI	302-17	Bež sa zrakastim primesama žutih delova/slabo bujna	Nisu prisutni	Ravnomerno rasporedjene/ svetlosmeđe	10 dana	18,6±0,2	Prisutne
	303-17	Bež sa zrakastim primesama žutih delova/slabo bujna	Nisu prisutni	Ravnomerno rasporedjene/ svetlosmeđe	7 dana	19±0,2	Prisutne
	304-17	Bež sa zrakastim primesama žutih delova/slabo bujna	Nisu prisutni	Ravnomerno rasporedjene/svetlo smeđe	7 dana	22,7±0,2	Prisutne
	433-16	Bež sa zrakastim primesama smeđe delova/ slabo bujna	Nisu prisutni	Raspoređene po obodu/smeđe	10 dana	17±0,3	Prisutne
	434-16	Bež sa zrakastim primesama smeđih delova/slabo bujna	Nisu prisutni	Raspoređene po obodu/smeđe	10 dana	25,5±0,3	Prisutne
	435-16	Bež sa zrakastim primesama smeđih delova/slabo bujna	Nisu prisutni	Raspoređene po obodu/smeđe	10 dana	16±0,3	Prisutne
	436-16	Bež sa zrakastim primesama smeđih delova/slabo bujna	Nisu prisutni	Raspoređene po obodu/smeđe	10 dana	22,5±0,3	Prisutne
	437-16	Bež sa zrakastim primesama smeđih delova/slabo bujna	Nisu prisutni	Raspoređene po obodu/smeđe	10 dana	20±1,1	Prisutne
	438-16	Bež sa zrakastim primesama smeđih delova/slabo bujna	Nisu prisutni	Raspoređene po obodu/smeđe	10 dana	12±1,0	Prisutne

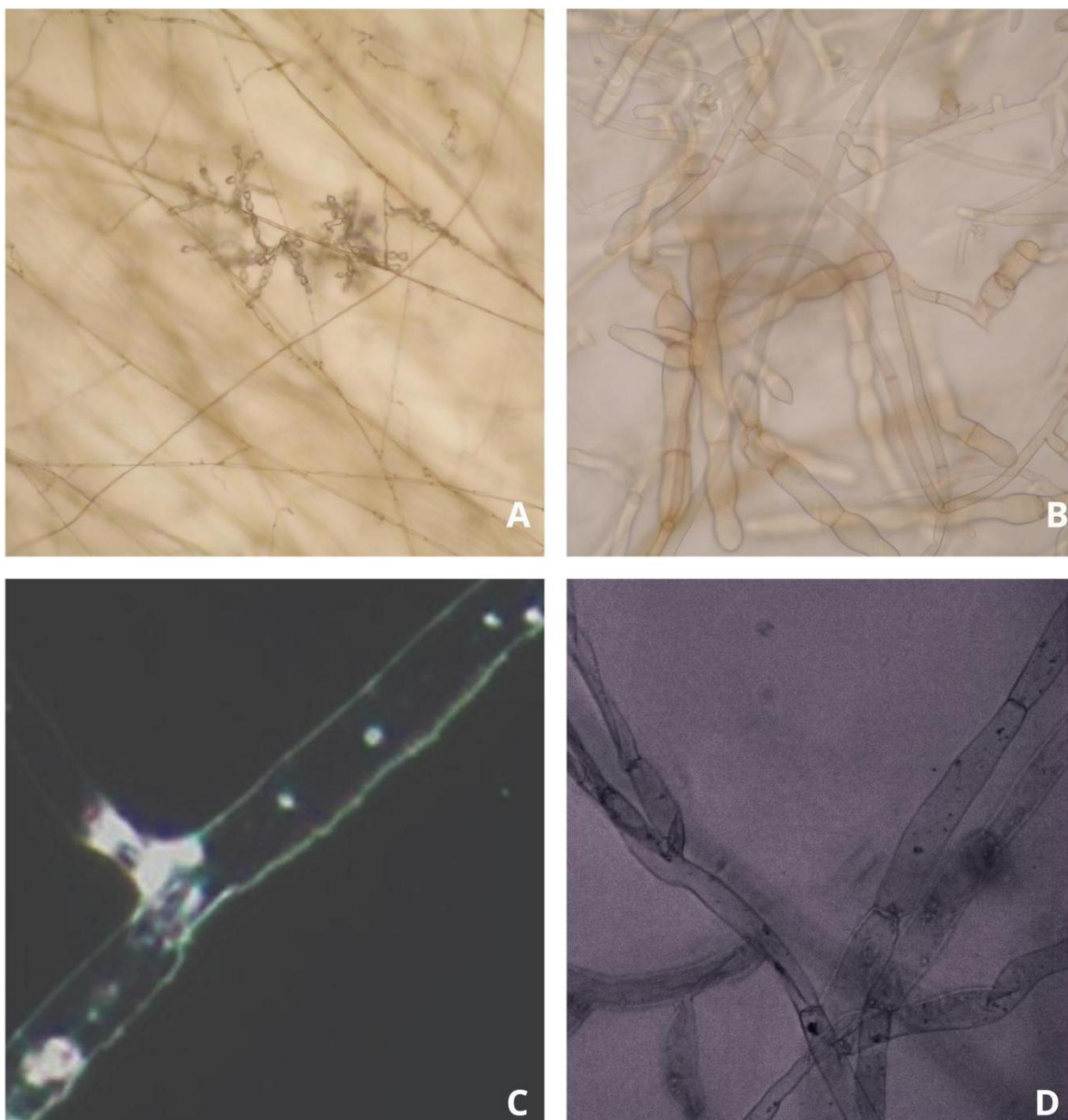
<i>Rhizoctonia</i> spp. AG	Izolat	Boja/ Bujnost kolonije	Koncentrični prstenovi	Raspored sklerocija/boja	Vreme formiranja sklerocija	Brzina porasta mm/dan± standardna devijacija	Moniliformne ćelije
AG-4 HGI	439-16	Bež sa zrakastim primesama smeđih delova/slabo bujna	Nisu prisutni	Na centru raspoređene/smeđe	10 dana	17±0,4	Prisutne
	440-16	Bež sa zrakastim primesama smeđih delova/slabo bujna	Nisu prisutni	Raspoređene po obodu/smeđe	10 dana	12,4±2,2	Prisutne
	441-16	Bež sa zrakastim primesama smeđih delova/slabo bujna	Nisu prisutni	Ravnomerno raspoređene/svetlo smeđe	10 dana	17,5±0,4	Prisutne
	442-16	Bež sa zrakastim primesama smeđih delova/slabo bujna	Nisu prisutni	Raspoređene po obodu/smeđe	>10 dana	11,7±0,4	Prisutne
	443-16	Bež sa zrakastim primesama smeđih delova/slabo bujna	Nisu prisutni	Raspoređene po obodu/smeđe	>10 dana	17,7±0,3	Prisutne
	444-16	Bež sa zrakastim primesama smeđih delova/slabo bujna	Nisu prisutni	Raspoređene po obodu /smeđe	>10 dana	27,3±0,3	Prisutne
	445-16	Bež sa zrakastim primesama smeđih delova/slabo bujna	Nisu prisutni	Raspoređene po obodu/smeđe	>10 dana	19,7±0,5	Prisutne
	446-16	Bež sa zrakastim primesama smeđih delova/slabo bujna	Nisu prisutni	Raspoređene po obodu/smeđe	10 dana	7,7±1,3	Prisutne
	447-16	Bež sa zrakastim primesama smeđih delova/slabo bujna	Nisu prisutni	Raspoređene po obodu /smeđe	10 dana	23±0,6	Prisutne

<i>Rhizoctonia</i> spp. AG	Izolat	Boja/ Bujnost kolonije	Koncentrični prstenovi	Raspored sklerocija/boja	Vreme formiranja sklerocija	Brzina porasta mm/dan± standardna devijacija	Moniliformne ćelije
AG-4 HGI	448-16	Bež sa zrakastim primesama smeđih delova/slabo bujna	Nisu prisutni	Raspoređene po obodu /smeđe	10 dana	20,2±0,9	Prisutne
	449-16	Bež sa zrakastim primesama smeđih delova/slabo bujna	Nisu prisutni	Raspoređene po obodu /smeđe	10 dana	20,8±0,7	Prisutne
	450-16	Bež sa zrakastim primesama smeđih delova/slabo bujna	Nisu prisutni	Raspoređene po obodu /smeđe	10 dana	10,6±0,3	Prisutne
	451-16	Bež sa zrakastim primesama smeđih delova/slabo bujna	Nisu prisutni	Raspoređene po obodu/smeđe	10 dana	21,6±0,6	Prisutne
	452-16	Bež sa zrakastim primesama smeđih delova/slabo bujna	Nisu prisutni	Raspoređene po obodu/smeđe	>10 dana	18,1±0,2	Prisutne
	453-16	Bež sa zrakastim primesama smeđe delova/slabo bujna	Nisu prisutni	Raspoređene po obodu/smeđe	10 dana	14,3±0,6	Prisutne
	454-16	Bež sa zrakastim primesama smeđih delova/slabo bujna	Nisu prisutni	Raspoređene po obodu/smeđe	10 dana	18,8±0,6	Prisutne
	455-16	Bež sa zrakastim primesama smeđe delova/slabo bujna	Nisu prisutni	Raspoređene po obodu/smeđe	>10 dana	15,8±0,3	Prisutne
	456-16	Bež sa zrakastim primesama smeđih delova/slabo bujna	Nisu prisutni	Raspoređene po obodu/smeđe	>10 dana	27,1±1,1	Prisutne

<i>Rhizoctonia</i> spp. AG	Izolat	Boja/ Bujnost kolonije	Koncentrični prstenovi	Raspored sklerocija/boja	Vreme formiranja sklerocija	Brzina porasta mm/dan± standardna devijacija	Moniliformne ćelije
AG-4 HGII	238-15	Bež/slabo bujna	Prisutni	Raspoređene po obodu/smeđe	>10 dana	15,2±0,1	Prisutne
AG-6	251G-18	Smeđa/jako bujna	Prisutni	Ravnomerno raspoređene/smeđe	10 dana	19,4±0,3	Prisutne

Tabela 16. Pregled morfoloških karakteristika odabranih izolata višejedarnih *Waitea circinata* var. *zeae* poreklom iz Srbije

<i>Waitea circinata</i>	Izolat	Boja/Bujnost kolonije	Koncentrični prstenovi	Raspored sklerocija/boja	Vreme formiranja sklerocija	Brzina porasta mm/dan± standardna devijacija	Moniliformne ćelije
var. <i>zeae</i>	299-17	Svetlonarandžasta/bujna	Nisu prisutni	Ravnomerno raspoređene/narandžaste	>15 dana	16±0,3	Prisutne
	299-17-1	Svetlonarandžasta/bujna	Nisu prisutni	Ravnomerno raspoređene/narandžaste	>15 dana	15,8±0,2	Prisutne
	299-17-2	Svetlonarandžasta/bujna	Nisu prisutni	Ravnomerno raspoređene/narandžaste	>15 dana	16,1±0,1	Prisutne
	299-17-3	Svetlonarandžasta/bujna	Nisu prisutni	Ravnomerno raspoređene/narandžaste	>15 dana	16±0,3	Prisutne
	299-17-4	Svetlonarandžasta/bujna	Nisu prisutni	Ravnomerno raspoređene/narandžaste	>15 dana	15,7±0,3	Prisutne
	299-17-5	Svetlonarandžasta/bujna	Nisu prisutni	Ravnomerno raspoređene/narandžaste	>15 dana	15,8±0,2	Prisutne
	300-17	Svetlonarandžasta/bujna	Nisu prisutni	Ravnomerno raspoređene/narandžaste	>15 dana	15,2±0,3	Prisutne
	300-17-1	Svetlonarandžasta/bujna	Nisu prisutni	Ravnomerno raspoređene/narandžaste	>15 dana	15,2±0,3	Prisutne
	300-17-2	Svetlonarandžasta/bujna	Nisu prisutni	Ravnomerno raspoređene/narandžaste	>15 dana	15,5±0,2	Prisutne
	300-17-3	Svetlonarandžasta/bujna	Nisu prisutni	Ravnomerno raspoređene/narandžaste	>15 dana	15,4±0,3	Prisutne
	300-17-4	Svetlonarandžasta/bujna	Nisu prisutni	Ravnomerno raspoređene/narandžaste	>15 dana	15,2±0,3	Prisutne
	300-17-5	Svetlonarandžasta/bujna	Nisu prisutni	Ravnomerno raspoređene/narandžaste	>15 dana	15,6±0,2	Prisutne



Slika 18. *Rhizoctonia* spp. mikroskopske osobine tri dana starih kolonija: A - moniliformne ćelije u kulturi; B - moniliformne ćelije, detalj; C - jedra u hifama dvojedarnih izolata; D - jedra u hifama višejedarnih izolata

5.3.1. Pripadnost izolata *Rhizoctonia* spp. anastomoznim grupama

Međusobnim uparivanjem i uparivanjem sa raspoloživim tester izolatima na PDA i WA, kao i na mikroskopskim pločicama, 30 odabranih izolata je po tipu i izgledu hifalnih anastomoza razvrstano u 11 različitih grupa. Na obe korišćene podloge dobijeno je isto grupisanje. Reakcije između hifa uparenih izolata posmatrane su na mikroskopskom i na makroskopskom nivou. Od mikroskopskih promena proučavana je anastomoza između hifa uparenih izolata, a od makroskopskih promena posmatrano je prerastanje ili formiranje barijere. Mikroskopske promene bile su uočljivije na WA, dok su makroskopske osobine bile vidljivije na PDA.

Izolati dvojedarne *Rhizoctonia* spp. AG-A (četiri izolata) ispoljili su najviši stepen genetičke sličnosti (C3 reakcija) samo u međusobnim uparivanjima, što je očekivano jer za istraživanja nije bio na raspolaganju odgovarajući tester izolat. Nizak nivo srodnosti (C2 reakcija) nije bio uočen ni sa jednim tester izolatom. Ispitivani izolati bili su vrlo slabo srodni (C1 reakcija) sa tester izolatima

AG-5 i AG-D, dok uopšte nisu bili srodni sa izolatima AG-1 IC, AG-2-1, AG-2-2, AG-3, AG-4, AG-6, AG-8 i AG-9.

Izolati dvojedarne *Rhizoctonia* spp. AG-G (tri izolata) ispoljili su najviši stepen genetičke sličnosti (C3 reakcija) samo u međusobnim uparivanjima, što je očekivano jer za istraživanja nije bio na raspolaganju odgovarajući tester izolat. Nizak nivo srodnosti (C2 reakcija) nije bio uočen ni sa jednim tester izolatom. Ispitivani izolati bili su vrlo slabo srodni (C1 reakcija) sa tester izolatima AG-1 IC i AG-D, dok uopšte nisu bili srodni sa izolatima AG-2-1, AG-2-2, AG-3, AG-4, AG-5, AG-6, AG-8 i AG-9.

Izolat dvojedarne *Rhizoctonia* spp. AG-F ispoljio je najviši stepen genetičke sličnosti (C3 reakcija) samo kada je uparen sa samim sobom, što je očekivano jer za istraživanja nije bio na raspolaganju odgovarajući tester izolat. Nizak nivo srodnosti (C2 reakcija) nije bio uočen ni sa jednim tester izolatom. Izolat je bio vrlo slabo srodan (C1 reakcija) sa tester izolatima AG-1 IC i AG-D, dok uopšte nije bio srodan sa izolatima AG-2-1, AG-2-2, AG-3, AG-4, AG-5, AG-6, AG-8 i AG-9.

Izolati dvojedarne *Rhizoctonia* spp. AG-U (dva izolata) ispoljili su najviši stepen genetičke sličnosti (C3 reakcija) samo u međusobnim uparivanjima, što je očekivano jer za istraživanja nije bio na raspolaganju odgovarajući tester izolat. Nizak nivo srodnosti (C2 reakcija) nije bio uočen ni sa jednim tester izolatom. Ispitivani izolati bili su vrlo slabo srodni (C1 reakcija) sa tester izolatima AG-5 i AG-D, dok uopšte nisu bili srodni sa izolatima AG-4, AG-5, AG-D, AG-1 IC, AG-2-1, AG-2-2, AG-3, AG-4, AG-6, AG-8 i AG-9 (Slika 19A).

Izolat višejedarne *Rhizoctonia solani* AG-2-1 ispoljilo je najviši stepen genetičke sličnosti (C3 reakcija) kada je uparen sa samim sobom, kao i kada je uparen sa tester izolatom AG-2-1. Nizak nivo srodnosti (C2 reakcija) uočen je prilikom uparivanja sa tester izolatom AG-2-2. Ispitivani izolat bio je vrlo slabo srodan (C1 reakcija) sa tester izolatima AG-8, dok uopšte nije bio srodan sa tester izolatima AG-1 IC, AG-3, AG-4, AG-5, AG-6, AG-9, AG-D.

Izolati višejedarne *Rhizoctonia solani* AG-2-2 (dva izolata) ispoljili su najviši stepen genetičke sličnosti (C3 reakcija) samo u međusobnim uparivanjima, dok je nizak nivo srodnosti (C2 reakcija) bio uočen sa tester izolatom AG-2-2. Ispitivani izolati bili su vrlo slabo srodni (C1 reakcija) sa tester izolatima AG-2-1 (Slika 19B), dok uopšte nisu bili srodni sa izolatima AG-1 IC, AG-3, AG-4, AG-5, AG-6, AG-8, AG-9, AG-D.

Izolati višejedarne *Rhizoctonia solani* AG-3 (četiri izolata) ispoljili su najviši stepen genetičke sličnosti (C3 reakcija), kao i nizak stepen sličnosti (C2 reakcija) u međusobnim uparivanjima i kada su upareni sa tester izolatima AG-3 (Slika 19C). Ispitivani izolati bili su vrlo slabo srodni (C1 reakcija) sa tester izolatima AG-9 (Slika 19B), dok uopšte nisu bili srodni sa izolatima AG-1 IC, AG-2-1, AG-2-2, AG-4, AG-5, AG-6, AG-8 i AG-D.

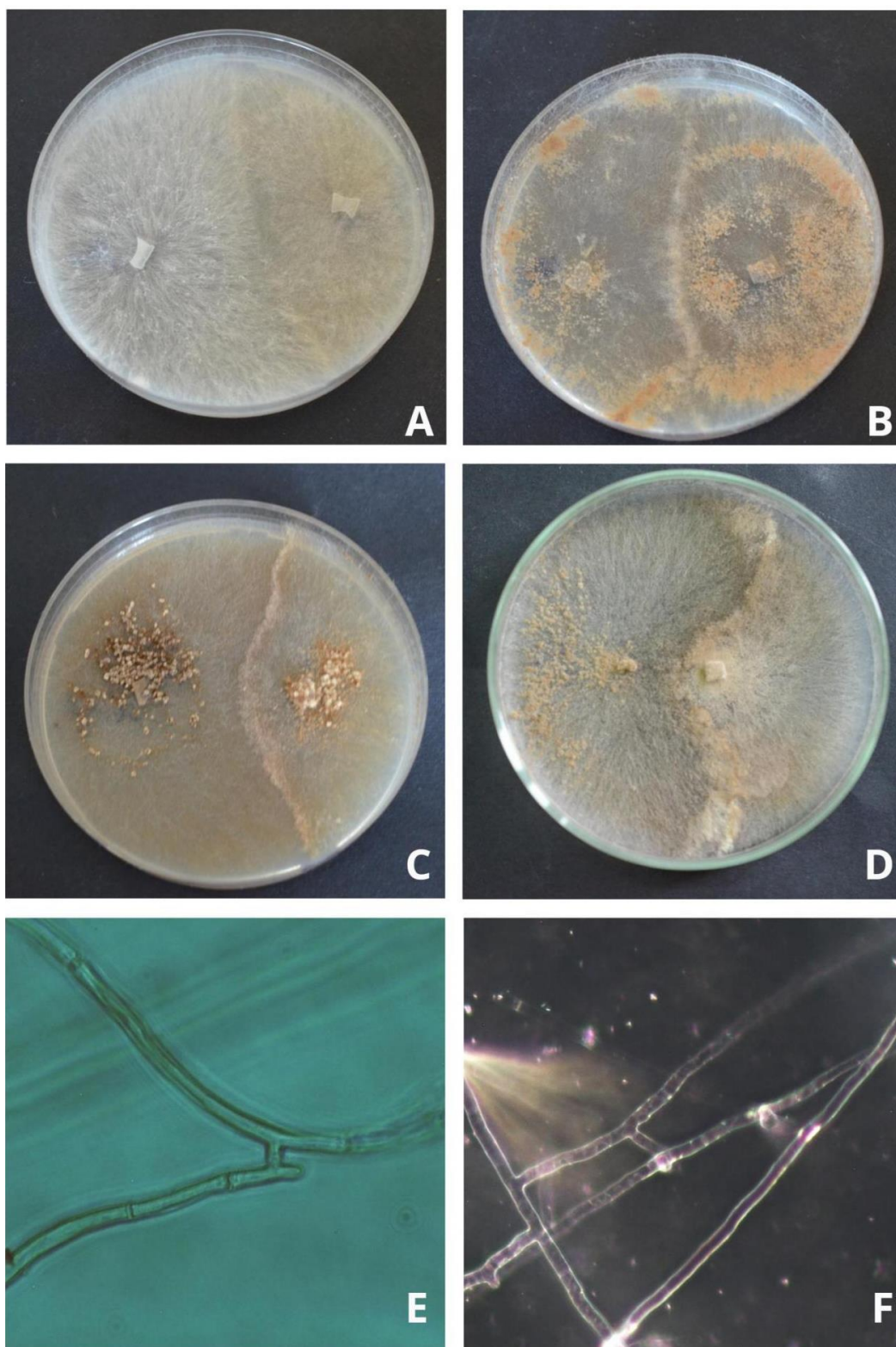
Izolati višejedarne *Rhizoctonia solani* AG-4 HGI (devet izolata) ispoljili su najviši stepen genetičke sličnosti (C3 reakcija) i nizak stepen srodnosti (C2 reakcija) samo u međusobnim uparivanjima, dok je sa tester izolatima AG-4 zabeležena je C1 reakcija. Uopšte nisu bili srodni sa izolatima AG-1 IC, AG-2-1, AG-2-2, AG-3, AG-5, AG-6, AG-8, AG-9, AG-D (Slika 19D).

Izolat višejedarne *Rhizoctonia solani* AG-4 HGII ispoljio je najviši stepen genetičke sličnosti (C3 reakcija) samo kada je uparen sa samim sobom (Slika 19E, F), dok je nizak nivo srodnosti (C2 reakcija) bio uočen sa tester izolatom AG-4. Ispitivani izolat uopšte nije bio srodan (C0 reakcija) sa izolatima AG-1 IC, AG-2-1, AG-2-2, AG-3, AG-5, AG-6, AG-8, AG-9, AG-D.

Izolat višejedarne *Rhizoctonia solani* AG-6 ispoljio je najviši stepen genetičke sličnosti (C3 reakcija) samo kada je uparen sa samim sobom, dok je nizak nivo srodnosti (C2 reakcija) bio uočen sa tester izolatom AG-6. Ispitivani izolat uopšte nije bio srodan (C0 reakcija) sa izolatima AG-1 IC, AG-2-1, AG-2-2, AG-3, AG-5, AG-8, AG-9, AG-D.

Izolati višejedarne *Waitea circinata* (dva izolata) ispoljili su najviši stepen genetičke sličnosti (C3 reakcija) samo kada su upareni međusobno, što je očekivano jer za istraživanja nije bio na

raspolaganju odgovarajući tester izolat. Nizak nivo srodnosti (C2 i C1 reakcije) nije bio uočen. Ispitivani izolati uopšte nisu bili srodni (C0 reakcija) sa izolatima AG-1 IC, AG-2-1, AG-2-2, AG-3, AG-4, AG-5, AG-6, AG-8, AG-9, AG-D.



Slika 19. *Rhizoctonia* spp. makroskopski i mikroskopski izgled hifalnih anastomoza: A - C1 reakcija između AG-2-1 i AG-2-2; B - C2 reakcija između AG-3 iz Srbije i AG-3 tester izolatom; C - C0 reakcija između AG-3 i AG-4 HGI; D - C2 reakcija između AG-U i AG-D; E - hifalna anastomoza na pločici, fazni kontrasti; F - hifalna anastomoza na pločici, tamno polje

5.3.2. Teleomorfni stadijum

U uslovima postavljenog eksperimenta, ukupno 11 izolata dvojedarnih *Rhizoctonia* spp. AG-A (izolat 107-13), *Rhizoctonia* spp. AG-G (296-17), *Rhizoctonia* spp. AG-F (190G-18), *Rhizoctonia* spp. AG-U (314-16) i višejedarnih *R. solani* AG-2-1 (137-17), *R. solani* AG-2-2 (270-15), *R. solani* AG-3 (98-16), *R. solani* AG-4 HGI (433-16), *R. solani* AG-4 HGII (238-15), *R. solani* AG-6 (251G-18), kao i *W. circinata* var. *zeae* (299-17) poreklom sa devet različitih biljaka i sa 11 lokaliteta nisu formirali teleomorfni stadijum čije bi se morfološke osobine potom proučile. Iako su izolati postavljeni na dve različite hranljive podloge u 10 ponavljanja, inkubirani na 24°C i u mraku nijedan od izolata nije formirao polne strukture u uslovima postavljenih oglada ni nakon osam nedelja.

5.4. Molekularne karakteristike izolata *Rhizoctonia* spp.

Molekularne analize u cilju identifikacije i određivanja filogenetskih međuodnosa *Rhizoctonia* spp. poreklom iz Srbije uspešno su razdvojena ukupno 43 izolata u 11 genotipova, odnosno AG (AG-A, AG-G, AG-F, AG-U, AG-2-1, AG-2-2, AG-3, AG-4 HGI, AG-4 HGII, AG-6, *W. circinata* var. *zeae*). Pored toga, razvijena su ili prilagođena dva protokola za direktnu detekciju i identifikaciju u cilju poboljšanja raspoložive dijagnostike u našoj zemlji.

5.4.1. Molekularna identifikacija

Potvrda morfološke identifikacije obavljena je sekvenciranjem ITS regiona rDNA ukupno 43 izolata, odnosno najmanje jednog izolata iz svake morfološke grupe, iz svake biljke domaćina i sa svakog lokaliteta. Pored ITS regiona, za odabrane izolate predstavnike detektovanih AG, identifikacija je potvrđena na osnovu još pet genskih regiona i to: LSU, *rpb2*, *tef-1a*, *atp6*, i β -*tubulin*. Analizom sekvenci amplifikovanih fragmenata obavljena je dalja molekularna identifikacija i karakterizacija ispitivanih izolata. U toku ovog ispitivanja ukupno je generisano 77 različitih sekvenci odabranih izolata predstavnika svih AG (Tabela 5).

Amplifikacijom ITS regiona izolata *Rhizoctonia* izdvojenih tokom izrade ove disertacije, dobijeni su fragmenti veličine oko 700 bp. Do amplifikacije nije došlo kod negativne kontrole u svim PCR reakcijama. Nakon sekvenciranja i obrade sekvenci, višestrukim poređenjem sa dostupnim sekvencama odgovarajućeg regiona genoma gljiva u GenBank bazi podataka, kao i proračunom genetičke sličnosti pomoću BLAST analize i softverskog paketa MEGA 6 potvrđena je identifikacija obavljena na osnovu morfoloških osobina i AG uparivanja. Identifikacija izolata je pokazala da se svi izolati mogu razvrstati u 11 različitih AG ili varijeteta. Ukupno je molekularno okarakterisano pet izolata dvojedarne *Rhizoctonia* spp. AG-A, tri izolata AG-G, jedan izolat AG-F, dva izolata AG-U, kao i jedan izolat *R. solani* AG-2-1, dva izolata AG-2-2, šest izolata AG-3, devet izolata AG-4 HGI, jedan izolat AG-4 HGII, jedan izolat AG-6 i 12 izolata *W. circinata* var. *zeae*.

Dvojedarna *Rhizoctonia* spp. AG-A. Analizom homologije nukleotidnih sekvenci ITS regiona rDNA potvrđeni su rezultati konvencionalne identifikacije pet odabranih izolata dvojedarne *Rhizoctonia* spp. AG-A (107-13, 101-16, 293-16, BJ4-18, 255G-18). Za izolat 107-13 dvojedarne *Rhizoctonia* spp. AG-A urađena je i dodatna karakterizacija na osnovu četiri genska regiona (LSU, *tef-1a*, *rpb2* i *atp6*). Poređenjem svih pet ITS sekvenci rDNA ispitivanih izolata utvrđena je visoka međusobna nukleotidna sličnost (98,6-99,5 %, do 5 bp razlike), kao i visoka nukleotidna sličnost (98,25-99,85%) sa oko 100 sekvenci izolata *Rhizoctonia* spp. AG-A dostupnih u GenBank bazi podataka. Najviši stepen sličnosti (99,85%) utvrđen je sa sekvencama izolata iz soje iz SAD-a (KX118364), iz duvana iz Turske (FR734288) i iz jagode iz Izraela (DQ102411). Visoka nukleotidna sličnost (97,7-99,3%) ispitivanih izolata *Rhizoctonia* spp. AG-A utvrđena je i sa preko 80 sekvenci dostupnih u BOLD Systems bazi podataka, dok je najviša sličnost od 99,4% utvrđena sa sekvencom izolata *Rhizoctonia* spp. AG-A iz šećerne repe iz Kine (JX073669). U Q-bank bazi

podataka nije bilo raspoloživih sekvenci *Rhizoctonia* spp. za poređenje. Dodatna karakterizacija izolata 107-13 pokazala je da je sekvenca LSU regiona rDNA ispoljila nukleotidnu sličnost od 95,25-98,55% sa preko 100 sekvenci *Rhizoctonia* spp., a bila je najbližnja sa jedinom sekvencom izolata *Rhizoctonia* spp. AG-A dostupnom u GenBank bazi podataka iz zemljišta iz Japana (AF354092) (99,56%). Sekvenca *tef-1a* regiona 107-13 dvojedarne *Rhizoctonia* spp. AG-A ispoljila je nukleotidnu sličnost od 90,25-94,9% sa preko 10 sekvenci *Rhizoctonia* spp., a bila je najbližnja sa jedinom sekvencom izolata *Rhizoctonia* spp. AG-A dostupnom u GenBank bazi podataka sa krompira iz Kine (KJ866479) (94,9%). Sekvenca *rpb2* regiona 107-13 ispoljila je nukleotidnu sličnost od 85,75-97,9% sa preko 100 sekvenci *Rhizoctonia* spp., a najbližnja je bila sa sekvencom izolata *Rhizoctonia* spp. AG-A dostupnom u GenBank bazi podataka iz Holandije (DQ301695) (97,9%). Bez obzira na brojne pokušaje i modifikacije protokola, amplifikacija *atp6* gena izolata dvojedarne *Rhizoctonia* spp. AG-A, nije bila moguća u primenjenim eksperimentalnim uslovima.

Dvojedarna *Rhizoctonia* spp. AG-G. Analizom homologije nukleotidnih sekvenci ITS regiona rDNA potvrđeni su rezultati konvencionalne identifikacije tri odabrana izolata dvojedarne *Rhizoctonia* spp. AG-G (140-16, 163-17, 296-17). Za izolat 296-17 dvojedarne *Rhizoctonia* spp. AG-G urađena je i dodatna karakterizacija na osnovu četiri genska regiona (LSU, *tef-1a*, *rpb2* i *atp6*). Poređenjem sve tri ITS sekvence rDNA ispitivanih izolata *Rhizoctonia* spp. AG-G utvrđena je visoka međusobna nukleotidna sličnost (99,85 %, 1 bp razlike), kao i visoka nukleotidna sličnost (98,6-100%) sa preko 60 sekvenci izolata *Rhizoctonia* spp. AG-G dostupnih u GenBank bazi podataka. Nukleotidna identičnost (100%) utvrđena je sa dve sekvence *Rhizoctonia* spp. AG-G iz jagode iz Italije (AY927329 i AY738627), kao i sa sekvencom izolata iz jagode iz Turske (MG547910). Visoka nukleotidna sličnost (91,6-99,9%) ispitivanih izolata *Rhizoctonia* spp. AG-G utvrđena je i sa preko 40 sekvenci izolata *Rhizoctonia* spp. AG-G dostupnih u BOLD Systems bazi podataka, dok je nukleotidna identičnost (100%) utvrđena sa dve sekvence izolata *Rhizoctonia* spp. AG-G iz jagode iz Italije (AY927329 i AY738627). Visoka nukleotidna sličnost od 99,9% utvrđena sa sekvencom izolata *Rhizoctonia* spp. AG-G iz jabuke iz Italije (JF519835). Sekvenca LSU regiona rDNA izolata 296-17 ispoljila je nukleotidnu sličnost od 95,55-98,65% sa preko 100 sekvenci izolata *Rhizoctonia* spp., a bila je najbližnja sa jedinom sekvencom izolata *Rhizoctonia* spp. AG-G dostupnom u GenBank bazi podataka iz zemljišta iz Japana (DQ097889) (98,65%). Sekvenca *tef-1a* regiona rDNA izolata 296-17 ispoljila je nukleotidnu sličnost od 86,9-89,9% sa preko 100 sekvenci izolata *Rhizoctonia* spp., a sekvenca je bila najbližnja sa sekvencom izolata *Rhizoctonia* spp. dostupnom u GenBank bazi podataka iz Kine (MH938397) (89,9%). Bez obzira na brojne pokušaje i modifikacije protokola, amplifikacija *rpb2* i *atp6* gena izolata dvojedarne *Rhizoctonia* spp. AG-G nije bila moguća u primenjenim eksperimentalnim uslovima.

Dvojedarna *Rhizoctonia* spp. AG-F. Analizom homologije nukleotidne sekvence ITS regiona rDNA potvrđeni su rezultati konvencionalne identifikacije izolata 190G-18 dvojedarne *Rhizoctonia* spp. AG-F. Za ovaj izolat urađena je i dodatna karakterizacija na osnovu četiri genska regiona (LSU, *tef-1a*, *rpb2* i *atp6*). Analizom homologije nukleotidne sekvence ITS regiona rDNA ispitivanog izolata *Rhizoctonia* spp. AG-F utvrđena je visoka nukleotidna sličnost (98,6-99,9%) sa preko 50 sekvenci izolata *Rhizoctonia* spp. AG-F dostupnih u GenBank bazi podataka. U BOLD Systems bazi podataka nije bilo podudarajućih sekvenci. Sekvenca LSU regiona rDNA izolata 190G-18 ispoljila je nukleotidnu sličnost od 93,11-99,75% sa preko 100 sekvenci izolata *Rhizoctonia* spp., a bila je najbližnja sa sekvencom izolata *Rhizoctonia* spp. AG-V dostupnom u GenBank bazi podataka iz *Colocasia esculenta* iz Kine (KM280400) (99,77%). Sekvenca *tef-1a* regiona rDNA izolata 190G-18 ispoljila je nukleotidnu sličnost od 86,7-91,44% sa preko 100 sekvenci izolata *Rhizoctonia* spp., a bila je najbližnja sa sekvencom izolata *R. solani* AG-4 dostupnom u GenBank bazi podataka iz krompira iz Kine (KJ866456) (91,44%). Sekvenca *rpb2* regiona izolata 190G-18 ispoljila je nukleotidnu sličnost od 85,75-97,9% sa preko 100 sekvenci izolata *Rhizoctonia* spp. i bila je najbližnja sa sekvencom izolata *Rhizoctonia* spp. AG-F dostupnom u GenBank bazi podataka iz lubenice iz Meksika (KY637074) (97,9%). Bez obzira na brojne pokušaje i modifikacije protokola,

amplifikacija *atp6* gena izolata dvojedarne *Rhizoctonia* spp. AG-F nije bila moguća u primenjenim eksperimentalnim uslovima.

Dvojedarna *Rhizoctonia* spp. AG-U. Analizom homologije nukleotidnih sekvenci ITS regiona rDNA potvrđeni su rezultati konvencionalne identifikacije dva odabrana izolata dvojedarne *Rhizoctonia* spp. AG-U (314-16 i 16G-20). Za izolat 314-16 dvojedarne *Rhizoctonia* spp. AG-U urađena je dodatna karakterizacija na osnovu četiri genska regiona (LSU, *tef-1a*, *rpb2* i *atp6*). Poređenjem dve ITS sekvence rDNA ispitivanih izolata *Rhizoctonia* spp. AG-U utvrđena je visoka međusobna nukleotidna sličnost (99,85 %, 1 bp razlike). Analizom homologije nukleotidnih sekvenci ITS regiona rDNA dva ispitivana izolata *Rhizoctonia* spp. AG-U utvrđena je visoka nukleotidna sličnost (96,6-99,6%) sa preko 40 sekvenci izolata *Rhizoctonia* spp. AG-U dostupnih u GenBank bazi podataka. Najviši stepen sličnosti (96,6%) utvrđen je sa dve sekvence *Rhizoctonia* spp. AG-U iz jabuke iz Italije (KC782936 i JF519829). Visoka nukleotidna sličnost (94,6-99,9%) ispitivanih sekvenci izolata *Rhizoctonia* spp. AG-U utvrđena je i sa preko 15 sekvenci *Rhizoctonia* spp. AG-U dostupnih u BOLD Systems bazi podataka, dok je najviša sličnost od 99,6% utvrđena sa sekvencom izolata *Rhizoctonia* spp. AG-U iz jabuke iz Italije (JF519829). Sekvenca LSU regiona rDNA izolata 314-16 ispoljila je nukleotidnu sličnost od 94,66-98,19% sa preko 100 sekvenci *Rhizoctonia* spp., a bila je najbližnja sa sekvencom izolata *Rhizoctonia* spp. AG-V dostupnom u GenBank bazi podataka poreklom iz *Colocasia esculenta* iz Kine (KM280400) (98,19%). Sekvenca *tef-1a* regiona izolata 314-16 ispoljila je nukleotidnu sličnost od 87,9-91,81% sa preko 100 sekvenci *Rhizoctonia* spp., a bila je najbližnja sa sekvencom izolata *Rhizoctonia* spp. AG-U iz SAD dostupnom u GenBank bazi podataka (DQ301647) (91,81%). Dodatna karakterizacija izolata 314-16 pokazala je da je sekvenca *atp6* regiona ispitivanog izolata *Rhizoctonia* spp. AG-U ispoljila nukleotidnu sličnost od 95,22-99,77% sa preko 60 sekvenci *Rhizoctonia* spp., a bila je najbližnja sa jedinom sekvencom izolata *Rhizoctonia* spp. AG-U dostupnom u GenBank bazi podataka iz Brazila (DQ301573) (99,77%). Bez obzira na brojne pokušaje i modifikacije protokola, amplifikacija *rpb2* gena izolata dvojedarne *Rhizoctonia* spp. AG-U nije bila moguća u primenjenim eksperimentalnim uslovima.

Višejedarna *Rhizoctonia solani* AG-2-1. Analizom homologije nukleotidne sekvence ITS regiona rDNA potvrđeni su rezultati konvencionalne identifikacije odabranog izolata višejedarne *R. solani* AG-2-1 (137-17), urađena je i dodatna karakterizacija na osnovu četiri genska regiona (LSU, *tef-1a*, *rpb2* i *atp6*). Analizom homologije nukleotidne sekvence ITS regiona rDNA ispitivanog izolata 137-17 utvrđena je visoka nukleotidna sličnost (98,6-99,6%) sa preko 50 sekvenci izolata *R. solani* AG-2-1 dostupnih u GenBank bazi podataka. Najviši stepen sličnosti (96,6%) utvrđen je sa četiri sekvence izolata *R. solani* AG-2-1 iz salate iz Belgije (MK583651, MK583650, MK583649 i MK583648). Visoka nukleotidna sličnost (98,6-99,9%) ispitivane sekvence izolata *R. solani* AG-2-1 utvrđena je i sa preko 40 sekvenci *R. solani* AG-2-1, dostupnih u BOLD Systems bazi podataka, dok je najviša sličnost od 99,6% utvrđena sa dve sekvence izolata *R. solani* AG-2-1 iz duvana iz Turske (FM867591 i FM867592), sa sekvencom izolata *R. solani* AG-2-1 iz duvana iz Argentine (JF792354), kao i sa sekvencom izolata *R. solani* AG-2-1 iz paradajza iz Japana (AB547378). Dodatna karakterizacija izolata 137-17 pokazala je da je sekvenca LSU regiona rDNA ispitivanog izolata ispoljila nukleotidnu sličnost od 95,85-99,55% sa preko 100 sekvenci *R. solani*, a bila je najbližnja sa sekvencom izolata *R. solani* AG-10 dostupnom u GenBank bazi podataka iz zemljišta iz Meksika (AF354111) (95,85-99,55%). Sekvenca *tef-1a* regiona izolata 137-17 ispoljila je nukleotidnu sličnost od 86,82-97,77% sa preko 100 sekvenci *Rhizoctonia* spp., a bila je najbližnja sa četiri sekvence izolata *R. solani* AG-2-1 dostupne u GenBank bazi podataka iz krompira iz Kine (KJ866644, KJ866439, KJ866438, KJ866437) (97,77%). Sekvenca *rpb2* regiona izolata 137-17 ispoljila je nukleotidnu sličnost od 86,75-95,22% sa preko 30 sekvenci *R. solani*, a bila je najbližnja sa sekvencom izolata *R. solani* AG-2-1 dostupnom u GenBank bazi podataka iz Holandije (DQ301749) (95,22%). Bez obzira na brojne pokušaje i modifikacije protokola, amplifikacija *atp6* gena izolata višejedarne *R. solani* AG-2-1 nije bila moguća u primenjenim eksperimentalnim uslovima.

Višejedarna *Rhizoctonia solani* AG-2-2. Analizom homologije nukleotidnih sekvenci ITS regiona rDNA potvrđeni su rezultati konvencionalne identifikacije dva odabrana izolata višejedarne *R. solani* AG-2-2 (270-15 i 271-15). Za izolat 270-15 višejedarne *R. solani* AG-2-1 urađena je i dodatna karakterizacija na osnovu još četiri genska regiona (LSU, *tef-1α*, *rpb2* i *atp6*). Poređenjem dve ITS sekvence rDNA ispitivanih izolata utvrđena je visoka međusobna nukleotidna sličnost (99,5%, 3 bp razlike), a daljom BLAST analizom utvrđena je visoka nukleotidna sličnost (97,4-98,7%) sa preko 100 sekvenci izolata *R. solani* AG-2-2 dostupnih u GenBank bazi podataka. Najviši stepen sličnosti (98,7%) utvrđen je sa sekvencom izolata *R. solani* AG-2-2 iz šećerne repe iz Koreje (KJ489330). Visoka nukleotidna sličnost (95,5-98,6%) ispitivane sekvence izolata *R. solani* AG-2-2 utvrđena je i sa preko 100 sekvenci *R. solani* AG-2-2, dostupnih u BOLD Systems bazi podataka, dok je najviša sličnost od 98,6% utvrđena sa izolatom *R. solani* AG-2-2 iz šećerne repe iz Kine (KC413984). Sekvenca *tef-1α* regiona izolata 270-15 ispoljila je nukleotidnu sličnost od 86,45-89,15% sa preko 90 sekvenci *Rhizoctonia* spp., a najveću nukleotidnu sličnost od 89,15% ispoljila je sa sekvencom izolata *R. solani* AG-2-1 dostupnom u GenBank bazi podataka iz krompira iz Kine (KJ866441). Sekvenca *rpb2* regiona izolata 270-15 višejedarne *R. solani* AG-2-2 ispoljila je nukleotidnu sličnost od 83,33-99,88% sa preko 80 sekvenci *Rhizoctonia* spp., a bila je najbližnja sa dve sekvence izolata *R. solani* AG-2-2 (neobjavljene, bez podataka o domaćinu) dostupne u GenBank bazi podataka iz Holandije (DQ301745 i DQ301734) (99,88%). Bez obzira na brojne pokušaje i modifikacije protokola, amplifikacija LSU i *atp6* gena izolata višejedarne *R. solani* AG-2-2 nije bila moguća u primenjenim eksperimentalnim uslovima.

Višejedarna *Rhizoctonia solani* AG-3. Analizom homologije nukleotidnih sekvenci ITS regiona rDNA potvrđeni su rezultati konvencionalne identifikacije šest odabranih izolata višejedarne *R. solani* AG-3 (98-16, 14G-18, 252G-18, 270G-18, 271G-18, 2G-19). Za izolat 14G-18 višejedarne *R. solani* AG-3 urađena je i dodatna karakterizacija na osnovu četiri genska regiona (LSU, *tef-1α*, *rpb2* i *atp6*). Poređenjem svih šest ITS sekvenci rDNA ispitivanih izolata *R. solani* AG-3 utvrđena je visoka međusobna nukleotidna sličnost (98,8-100 %, do 6 bp razlike), a daljom BLAST analizom utvrđena je visoka nukleotidna sličnost (97,7-99,85%) sa preko 100 sekvenci izolata *R. solani* AG-3 dostupnih u GenBank bazi podataka. Najviši stepen sličnosti (99,85%) utvrđen je sa sekvencama izolata *R. solani* AG-3 iz krompira iz Kine (JQ219359, MF070636, KR006217). Visoka nukleotidna sličnost (98,6-99,6%) ispitivane sekvence izolata *R. solani* AG-3 utvrđena je i sa preko 100 sekvenci *R. solani* AG-3, dostupnih u BOLD Systems bazi podataka, dok je najviša sličnost od 99,6% utvrđena sa sekvencom izolata *R. solani* AG-3 iz krompira iz Maroka (AY387526). Sekvenca LSU regiona rDNA izolata 14G-18 ispoljila je nukleotidnu sličnost od 91,55-99,56% sa preko 100 sekvenci *R. solani*, a bila je najbližnja sa sekvencom izolata *R. solani* AG-3 dostupnom u GenBank bazi podataka iz krompira iz Kanade (DQ369859) (100%). Sekvenca *tef-1α* regiona izolata 14G-18 ispoljila je nukleotidnu sličnost od 86,75-98,66% sa preko 100 sekvenci *Rhizoctonia* spp., a bila je najbližnja sa tri sekvence izolata *R. solani* AG-3 dostupne u GenBank bazi podataka iz krompira iz Kine (KJ866451, KJ866446, KJ866449) (98,66%). Sekvenca *rpb2* regiona izolata 14G-18 ispoljila je nukleotidnu sličnost od 82,80-99,06% sa preko 30 sekvenci *Rhizoctonia* spp., a bila je najbližnja sa sekvencom izolata *R. solani* AG-3 dostupnom u GenBank bazi podataka iz krompira iz Holandije (DQ301746) (99,06%). Bez obzira na brojne pokušaje i modifikacije protokola, amplifikacija *atp6* gena izolata višejedarne *R. solani* AG-3 nije bila moguća u primenjenim eksperimentalnim uslovima.

Višejedarna *Rhizoctonia solani* AG-4 HGI. Analizom homologije nukleotidnih sekvenci ITS regiona rDNA potvrđeni su rezultati konvencionalne identifikacije devet odabranih izolata višejedarne *R. solani* AG-4 HGI (433-16, 439-16, 443-16, 446-16, 452-16, 455-16, 297-17, 301-17, 303-17). Za izolat 433-16 višejedarne *R. solani* AG-4 HGI urađena je i dodatna karakterizacija na osnovu četiri genska regiona (LSU, *tef-1α*, *rpb2* i *atp6*). Poređenjem svih devet ITS sekvenci rDNA ispitivanih izolata *R. solani* AG-4 HGI utvrđena je visoka međusobna nukleotidna sličnost (99,5-100%, do 2 bp razlike), a BLAST analiza je pokazala visoku nukleotidnu sličnost (97,7-98,8%) sa preko 70 sekvenci izolata *R. solani* AG-4 HGI dostupnih GenBank bazi podataka. Najviši stepen

sličnosti (97,8%) utvrđen je sa sekvencom izolata *R. solani* AG-4 HGI iz spanaća iz Kine (KF819386) i sa sekvencom izolata *R. solani* AG-4 HGI iz ehinacee iz Italije (MK430998). Visoka nukleotidna sličnost (98,6-99,6%) ispitivane sekvence izolata *R. solani* AG-4 HGI utvrđena je i sa preko 70 sekvenci *R. solani* AG-4 HG1, dostupnih u BOLD Systems bazi podataka, dok je najviša sličnost od 99,6% utvrđena sa sekvencom izolata *R. solani* AG-4 HGI iz suncokreta iz Vijetnama (EF203247). Sekvenca LSU regiona rDNA izolata 443-16 ispoljila je nukleotidnu sličnost od 95,25-99,56% sa preko 100 sekvenci *R. solani*, a najveću sličnost je pokazala sa sekvencom izolata *R. solani* AG-4 HGI dostupnom u GenBank bazi podataka iz Holandije (nema podataka o domaćinu) (MH868410) (100%). Sekvenca *tef-1a* regiona izolata 443-16 ispoljila je nukleotidnu sličnost od 86,87-98,97% sa preko 100 sekvenci *Rhizoctonia* spp., a najveću sličnost pokazala je sa tri sekvence izolata *R. solani* AG-4 HGI dostupne u GenBank bazi podataka iz krompira iz Kine (KJ866462, KJ866457, KJ866458) (98,97%). Sekvenca *rpb2* regiona izolata 443-16 ispoljila je nukleotidnu sličnost od 85,30-98,37% sa preko 30 sekvenci *Rhizoctonia* spp., a najveću sličnost sa sekvencom izolata *R. solani* AG-4 HGI dostupnom u GenBank bazi podataka iz Holandije (bez podataka o domaćinu) (DQ301736) (98,37%). Bez obzira na brojne pokušaje i modifikacije protokola, amplifikacija *atp6* gena izolata višejedarne *R. solani* AG-4 HGI nije bila moguća u primenjenim eksperimentalnim uslovima.

Višejedarna *Rhizoctonia solani* AG-4 HGII. Analizom homologije nukleotidne sekvence ITS regiona rDNA potvrđeni su rezultati konvencionalne identifikacije jednog odabranog izolata višejedarne *R. solani* AG-4 HGII (238-15), za koji je urađena i dodatna karakterizacija na osnovu četiri genska regiona (LSU, *tef-1a*, *rpb2* i *atp6*). Analizom homologije nukleotidne sekvence ITS regiona rDNA ispitivanog izolata *R. solani* AG-4 HGII utvrđena je visoka nukleotidna sličnost (99,2-100%) sa preko 100 sekvenci izolata *R. solani* AG-4 HGII dostupnih u GenBank bazi podataka, a nukleotidna identičnost (100%) utvrđena je sa sekvencom izolata *R. solani* AG-4 HGII iz *Microthlaspi perfoliatum* iz Hrvatske (KT268768) i sa sekvencom izolata *R. solani* AG-4 HGII iz trave iz Teksasa (FJ746956). Visoka nukleotidna sličnost (98,6-100%) sekvence ispitivanog izolata *R. solani* AG-4 HGII utvrđena je i sa preko 40 sekvenci *R. solani* AG-4 HGII, dostupnih u BOLD Systems bazi podataka, dok je najviša sličnost od 100% utvrđena sa preko 10 sekvenci *R. solani* AG-4 HGII, među kojima sa sekvencom izolata iz suncokreta iz Velike Britanije (FJ435140) i sekvencom izolata iz *Lepidium draba* iz Francuske (JF831083). Sekvenca LSU regiona rDNA izolata 238-15 ispoljila je nukleotidnu sličnost od 96,94-100% sa preko 100 sekvenci *R. solani*, a pokazala je najveću sličnost (100%) sa četiri sekvence izolata *R. solani* AG-4 HGII dostupne u GenBank bazi podataka iz Holandije (MH868410 i MH867320) i iz SAD (DQ917658 i AF518655) (bez podataka o domaćinu). Dodatna karakterizacija izolata 238-15 pokazala je da je sekvenca *tef-1a* regiona ispitivanog izolata ispoljila nukleotidnu sličnost od 86,11-100% sa preko 100 sekvenci *Rhizoctonia* spp., a pokazala je najveću sličnost (100%) sa tri sekvence izolata *R. solani* AG-4 HGII dostupne u GenBank bazi podataka iz Kine (MH938393, KJ866467, MH938394) (nema podataka o domaćinu). Sekvenca *rpb2* regiona izolata 238-15 ispoljila je nukleotidnu sličnost od 86,54-99,56% sa preko 30 sekvenci *Rhizoctonia* spp., a bila je najbližnja (99,56%) sa sekvencom izolata *R. solani* AG-4 HGII dostupnom u GenBank bazi podataka iz Holandije (DQ301737) (bez podataka o domaćinu). Bez obzira na brojne pokušaje i modifikacije protokola, amplifikacija *atp6* gena izolata višejedarne *R. solani* AG-4 HGII nije bila moguća u primenjenim eksperimentalnim uslovima.

Višejedarna *Rhizoctonia solani* AG-6. Analizom homologije nukleotidnih sekvenci ITS regiona rDNA potvrđeni su rezultati konvencionalne identifikacije jednog odabranog izolata višejedarne *R. solani* AG-6 (251G-18), za koji je urađena i dodatna karakterizacija na osnovu četiri genska regiona (LSU, *tef-1a*, *rpb2* i *atp6*). Analizom homologije nukleotidne sekvence ITS regiona rDNA ispitivanog izolata *R. solani* AG-6 utvrđena je visoka nukleotidna sličnost (96,2-100%) sa preko 60 sekvenci izolata *R. solani* AG-6 dostupnih u GenBank bazi podataka. Nukleotidna identičnost (100%) utvrđena je sa sekvencom izolata *R. solani* AG-6 iz jabuke iz Italije (JF519844). Visoka nukleotidna sličnost (96,6-100%) sekvence izolata *R. solani* AG-6 utvrđena je i sa preko 30 sekvenci *R. solani* AG-6, dostupnih u BOLD Systems bazi podataka, dok je nukleotidna identičnost

(100%) utvrđena sa istom sekvencom izolata kao u GenBank bazi podataka. Sekvenca LSU regiona rDNA izolata 251G-18 ispoljila je nukleotidnu sličnost od 95,63-98,98% sa preko 80 sekvenci *R. solani*, a najbližnja (98,98%) je bila sa sekvencom izolata *R. solani* AG-6 dostupnom u GenBank bazi podataka iz Meksika (AF354061). Sekvenca *tef-1a* regiona izolata 251G-18 ispoljila je nukleotidnu sličnost od 88,43-90,69% sa preko 100 sekvenci *Rhizoctonia* spp., a pokazala je najveću sličnost (90,69%) sa sekvencom izolata *R. solani* AG-1 IB dostupnom u GenBank bazi podataka iz krompira iz Kine (KJ866434). Sekvenca *rpb2* regiona izolata 251G-18 ispoljila je nukleotidnu sličnost od 85,31-94,78% sa preko 30 sekvenci *Rhizoctonia* spp., a najveću sličnost (94,78%) pokazala je sa sekvencom izolata *R. solani* AG-6 dostupnom u GenBank bazi podataka iz Holandije (DQ301740) (bez podataka o domaćinu). Bez obzira na brojne pokušaje i modifikacije protokola, amplifikacija *atp6* gena izolata višejedarne *R. solani* AG-6 nije bila moguća u primenjenim eksperimentalnim uslovima.

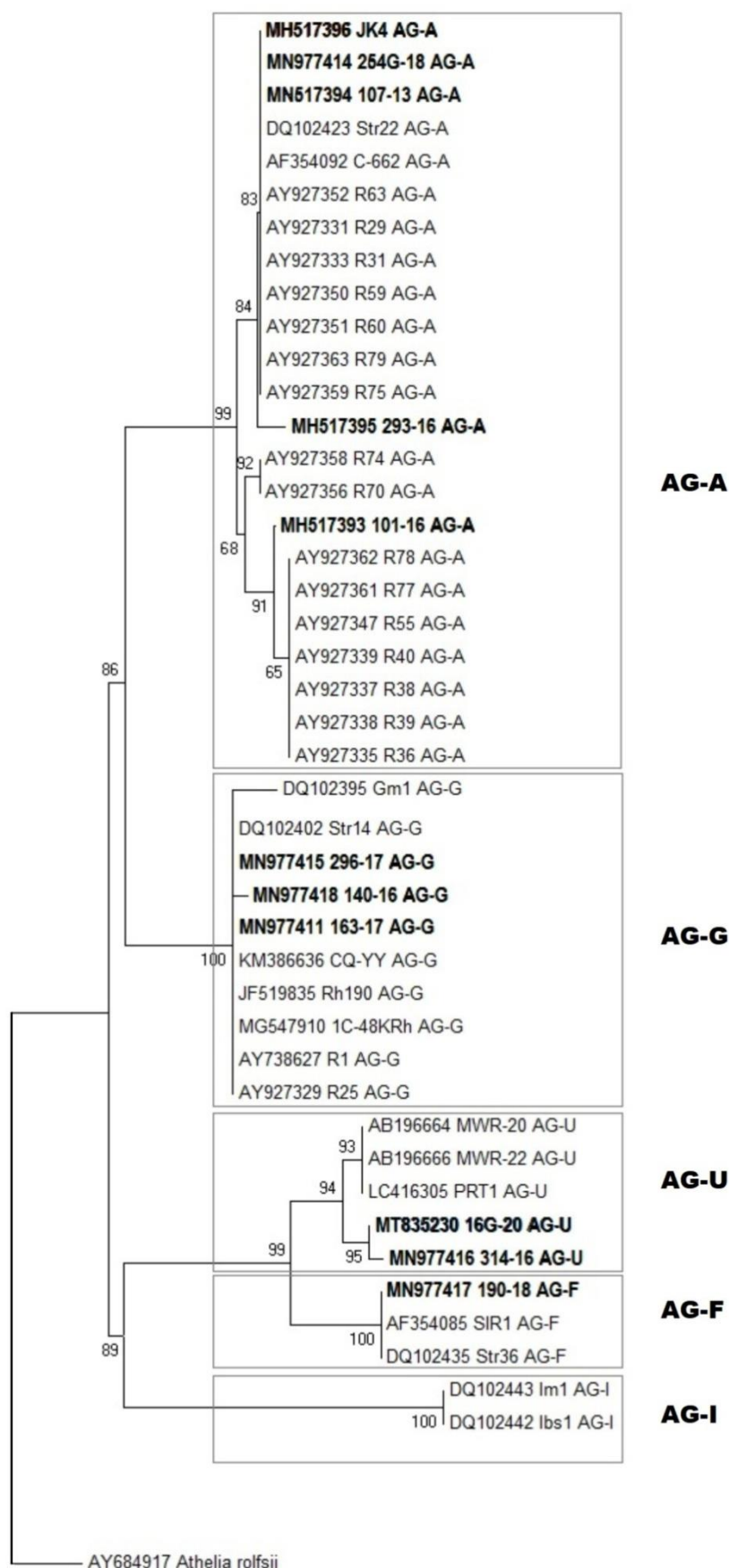
Višejedarna *Waitea circinata* var. *zeae*. Analizom homologije nukleotidnih sekvenci ITS regiona rDNA potvrđeni su rezultati konvencionalne identifikacije 12 odabranih izolata *W. circinata* var. *zeae* (299-17, 299-17-1, 299-17-2, 299-17-3, 299-17-4, 299-17-5, 300-17, 300-17-1, 300-17-2, 300-17-3, 300-17-4, 300-17-5). Za dva izolata 299-17 i 300-17 višejedarne *W. circinata* var. *zeae* urađena je i dodatna karakterizacija na osnovu četiri genska regiona (LSU, *rpb2*, β -*tubulin* i *atp6*). Poređenjem svih 12 ITS sekvenci rDNA ispitivanih izolata *W. circinata* var. *zeae* utvrđena je visoka međusobna nukleotidna sličnost (99,62-100%, 0-2 bp razlike), kao i visoka nukleotidna sličnost (96,2-100%) sa preko 60 sekvenci izolata *W. circinata* var. *zeae* dostupnih u GenBank bazi podataka. Nukleotidna identičnost (100%) utvrđena je sa sekvencama *W. circinata* var. *zeae* iz kukuruza iz Kine (MN472875, MN472871 i MN472870). Visoka nukleotidna sličnost (97,2-99,7%) ispitivanih sekvenci izolata *W. circinata* var. *zeae* utvrđena je i sa preko 20 sekvenci *W. circinata* var. *zeae*, dostupnih u BOLD Systems bazi podataka, dok je najviša sličnost od 99,7% utvrđena sa sekvencom izolata *W. circinata* var. *zeae* sa šećerne repe iz Kine (JX073667). Sekvence LSU regiona rDNA izolata 299-17 i 300-17 ispoljile su nukleotidnu sličnost od 92,91-99,98% sa pet sekvenci *Waitea circinata*, a bile su najbližnje (99,98%) sa jedinom sekvencom izolata *W. circinata* var. *zeae* dostupnom u GenBank bazi podataka iz Holandije (MH867457). Sekvence *RPB2* regiona izolata 299-17 i 300-17 ispoljile su nukleotidnu sličnost od 90,36-91,12% sa 15 sekvenci *Waitea circinata*, a pokazali su najveću sličnost (91,12%) sa jedinom sekvencom izolata *W. circinata* var. *zeae* dostupnom u GenBank bazi podataka iz SAD (DQ846899). Sekvence β -*tubulin* regiona izolata 299-17 i 300-17 ispoljile su nukleotidnu sličnost od 93,24-100% sa 10 sekvenci *Waitea circinata*, a najveću sličnost (100%) pokazale su sa sekvencom izolata *W. circinata* var. *zeae* dostupnom u GenBank bazi iz Turske iz zemljišta na kome je gajen duvan (KT347127). Bez obzira na brojne pokušaje i modifikacije protokola, amplifikacija *atp6* i *tef-1a* gena izolata višejedarne *W. circinata* var. *zeae* nije bila moguća u primenjenim eksperimentalnim uslovima.

5.4.2. Filogenetski međuodnosi izolata *Rhizoctonia* spp.

Molekularna karakterizacija i filogenetske analize evolutivnih međuodnosa zasnovane na analizi sekvenci ITS regiona rDNA, pokazale su srodnost i međuodnos izolata iz Srbije u odnosu na odabrane izolate *Rhizoctonia* spp. iz drugih delova sveta. Filogenetske analize obavljene su rekonstrukcijom tri odvojena filogenetska stabla, radi dobijanja povećane rezolucije, odvojeno za dvojedarne *Rhizoctonia* spp. (teleomorf *Ceratobasidium* spp.), višejedarne *R. solani* (*Thanatephorus* spp.) i *R. zeae* i srodne vrste (*Waitea circinata*), pokazale su očekivanu topologiju, ali i postojanje diverziteta u okviru AG.

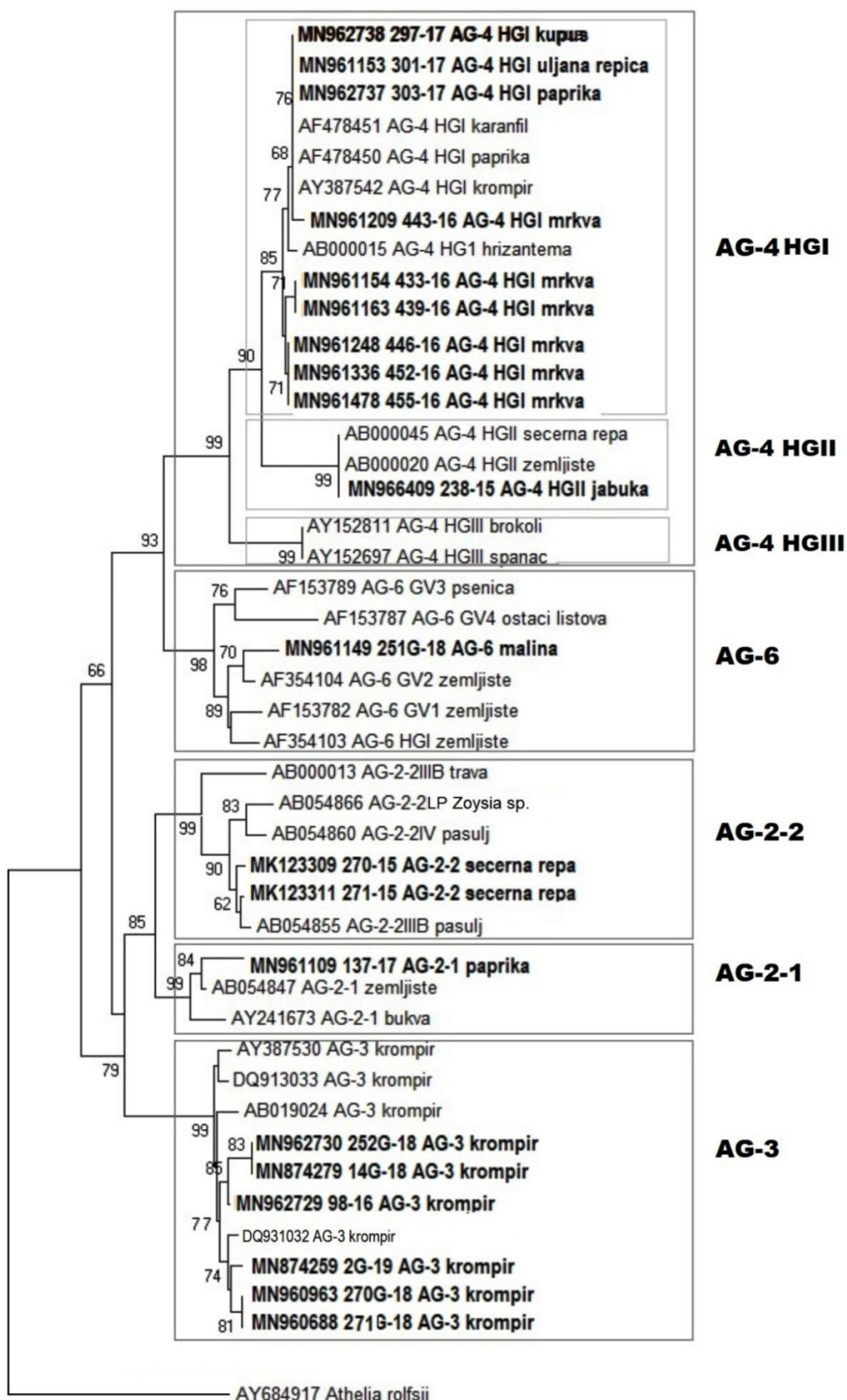
Filogenija dvojedarnih *Rhizoctonia* spp. (*Ceratobasidium* spp.). Za molekularnu karakterizaciju dvojedarnih *Rhizoctonia* spp. i za rekonstrukciju filogenetskog stabla na osnovu sekvenci ITS regiona rDNA korišćene su sekvence 11 izolata dvojedarnih *Rhizoctonia* spp. poreklom iz Srbije generisane u ovom radu i 32 sekvence reprezentativnih izolata dvojedarnih *Rhizoctonia* spp.-tipskih predstavnika svih AG detektovanih u ovom radu, odnosno AG-A, AG-G, AG-F, AG-U i

AG-I. Sekvenca *Athelia rolfsi* odabrana je kao autgrupa. Nakon uparivanja 44 odabrane sekvence, one su skraćene na 677 karaktera. Filogenetsko stablo je rekonstruisano korišćenjem Neighbour joining metode i "bootstrap" podrške od 1000 ponavljanja. Primenjen je Gamma raspored Tamura-Nei model (G+I) nukleotidne supstitucije. "Bootstrap" vrednosti manje od 60% nisu prikazane. Generisano je filogenetsko stablo u kojem je uspostavljeno razdvajanje i topologija koja odgovara podeli AG dvojedarnih *Rhizoctonia* spp. (Slika 20). Svi izolati iz ovog rada grupisali su se uz tipske predstavnike odgovarajućih AG sa "bootstrap" podrškom od preko 80%. U okviru ovog klastera pojedinačnih AG ustanovljeno je postojanje nekoliko nižih podgrupa. Izolati *Rhizoctonia* spp. AG-A iz Srbije grupisali su se uz reprezentativne izolate *Rhizoctonia* spp. AG-A. U okviru ovog klastera formirale su se dve grupe i u okviru svake grupe po dve podgrupe. Izolati iz Srbije grupisali u tri od formirane četiri podgrupe, što govori o diverzitetu prisutnom između izolata ove AG u Srbiji. Izolati *Rhizoctonia* spp. AG-G, *Rhizoctonia* spp. AG-F, *Rhizoctonia* spp. AG-U iz Srbije grupisali su se uz reprezentativne izolate AG-G, AG-F i AG-U, potvrđujući identifikaciju, kao i bližu evolutivnu srodnost sa predstavnicima ovih AG. Poredeći rezoluciju dobijenu u rekonstruisanom filogenetskom stablu između izolata u okviru iste AG u celom filogenetskom stablu postojala je razlika od 0-8 nukleotida, dok je između izolata koji su pripadali različitim AG nukleotidna razlika bila preko 20 nukleotida.



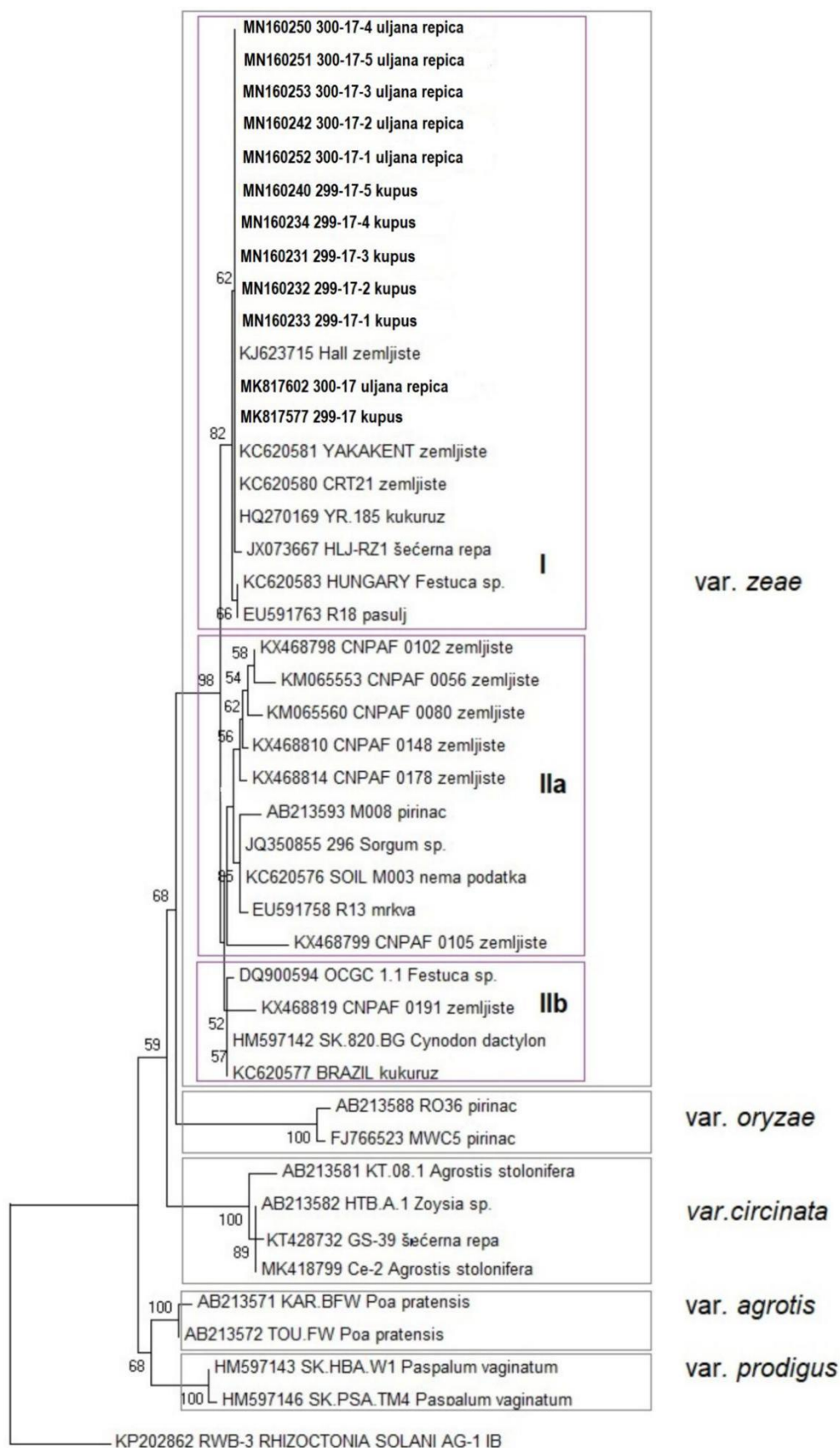
Slika 20. Dvojedarne *Rhizoctonia* spp.: filogenetsko stablo rekonstruisano Neighbour-joining metodom na osnovu ITS rDNA sekvenci 11 izolata iz Srbije i 32 sekvence izolata dvojedarnih *Rhizoctonia* AG-A, AG-G, AG-F, AG-U i AG-I iz Italije, Izraela, Japana i SAD; kao autgrupa korišćena je sekvenca *Athelia rolfsii*; izolati iz Srbije su označeni boldom

Filogenija višejedarnih *Rhizoctonia solani* (*Thanatephorus* spp.). Za rekonstrukciju filogenetskog stabla na osnovu sekvenci ITS regiona rDNA korišćene su sekvence 20 izolata višejedarnih *Rhizoctonia* spp. poreklom iz Srbije koje su generisane u ovom radu, kao i 23 sekvence reprezentativnih izolata višejedarnih *R. solani* – tipskih predstavnika svih AG detektovanih u ovom radu AG-2-1, AG-2-2, AG-3, AG-4 HGI, AG-4 HGII, AG-4 HGIII, AG-6 GV1, AG-6 GV2, AG-6 GV3, AG-6 GV4, AG-6 HGI. Kao autgrupa korišćena je sekvenca *Athelia rolfsi*. Nakon uparivanja, ukupno 44 odabrane sekvence, one su skraćene na 592 karaktera, a filogenetsko stablo rekonstruisano je korišćenjem Neighbour joining metode i “bootstrap” podrške od 1000 ponavljanja. Primenjen je Gamma raspored Tamura-Nei model (G+I) nukleotidne supstitucije. “Bootstrap” vrednosti manje od 60% nisu prikazane. Generisano filogenetsko stablo pokazalo je razdvajanje i topologiju koja odgovara podeli AG višejedarnih *Rhizoctonia* spp. (Slika 21). Svi izolati iz ovog rada grupisali su se uz tipske predstavnike AG kojima pripadaju sa “bootstrap” podrškom od preko 60%. U okviru klastera pojedinačnih AG ustanovljeno je postojanje diverziteta i razdvajanje izolata u više nižih podgrupa. Izolati *R. solani* AG-2-1 i AG-2-2 iz Srbije grupisali su se uz reprezentativne izolate navedenih AG. Izolati *R. solani* AG-3 iz Srbije grupisali su se uz odgovarajuće reprezentativne izolate navedene AG u jedan klaster koji je podeljen na tri grupe. Srpski izolati uglavnom su se grupisali u odvojene podgrupe ili zajedno sa izolatom iz Norveške. U okviru klastera *R. solani* AG-4 HGI izolati su se grupisali u dve grupe, a izolati iz Srbije grupisali su se u obe grupe u skladu sa biljkama iz kojih su izolovani, odnosno u prvoj grupi su izolati poreklom sa različitih biljaka, a u drugoj grupi su izolati poreklom samo sa mrkve. Izolati *R. solani* AG-4 HGII i *R. solani* AG-6 iz Srbije grupisali se uz reprezentativne izolate navedenih AG. Između izolata u okviru iste AG postojala je razlika od 0-10 nukleotida, dok je između izolata koji su pripadali različitim AG nukleotidna razlika bila preko 10 nukleotida, dodatno potvrđujući rezoluciju rekonstruisanog stabla.



Slika 21. Višejedarne *Rhizoctonia solani*: filogenetsko stablo rekonstruisano Neighbour-joining metodom na osnovu sekvenci ITS rDNA 20 izolata iz Srbije i 23 sekvence izolata višejedarnih *Rhizoctonia solani* AG-2-1, AG-2-2IIIB, AG-2-2LP, AG-2-2IV, AG-3, AG-4 HGI, AG-4 HGII, AG-4 HGIII, AG-4 HGIII, AG-6 GV1, AG-6 GV2, AG-6 GV3, AG-6 GV4 i AG-6 HGI iz Italije, Izraela, Japana i SAD; kao autgrupa korišćena je sekvenca *Athelia rolfsii*; izolati iz Srbije su označeni boldom

Filogenija višejedarnih *Waitea circinata* i srodnih vrsta. Za rekonstrukciju filogenetskog stabla na osnovu sekvenci ITS regiona rDNA korišćene su sekvence 12 izolata *W. circinata* var. *zeae* poreklom iz Srbije, 31 sekvenca reprezentativnih izolata *Waitea circinata* - tipskih predstavnika varijeteta *zeae*, *circinata*, *oryzae*, *agrotis*, *prodigus* i sekvenca *R. solani* AG-1 IB kao autgrupe. Kako su izolati iz Srbije izolovani iz dikotiledonih biljaka, a *W. circinata* var. *zeae* je prevashodno patogen monokotiledonih biljaka, u filogenetsku analizu uključene su sve pronađene sekvence izolata *W. circinata* var. *zeae* sa dikotiledonih domaćina, bez obzira da li su publikovane ili ne. Nakon uparivanja ukupno 44 odabrane sekvence, skraćene na 606 karaktera, rekonstruisano je filogenetsko stablo korišćenjem Neighbour joining metode i "bootstrap" podrške od 1000 ponavljanja. Primenjen je Gamma raspored Tamura-Nei model (G+I) nukleotidne supstitucije. "bootstrap" vrednosti manje od 50% nisu prikazane. Generisano je filogenetsko stablo u kojem je uspostavljeno razdvajanje i topologija koja odgovara prethodno ustanovljenoj podeli varijeteta *Waitea circinata* (Slika 22). Svi izolati iz ovih istraživanja grupisali su se uz tipske predstavnike svog varijeteta *zeae*, sa značajnom "bootstrap" podrškom. U okviru klastera varijeteta *zeae* odvojila su se dva podklastera, označeni kao I i II, gde je II klaster podeljen na dve niže podgrupe. Svi izolati iz Srbije grupisali su se u I grupu, zajedno sa izolatima poreklom iz *Festuca* sp. iz Mađarske, i izolatima poreklom iz šećerne repe i pasulja iz SAD. U okviru I grupe postoji visoka nukleotidna sličnost sa svega 0-2 nukleotida razlike, dok je između izolata u okviru IIa i IIb razlika veća i iznosi 0-15 odnosno 0-6 nukleotida. Osim izolata R13 poreklom sa mrkve iz SAD, svi ostali izolati sa dikotiledonih domaćina (sa pasulja, šećerne repe, kao i iz zemljišta gde je prethodni usev bio duvan) grupisali su se u grupu I zajedno sa izolatima iz Srbije.



Slika 22. Višejedarne *Waitea* spp.: filogenetsko stablo rekonstruisano Neighbour-joining metodom na osnovu sekvenci ITS rDNA 12 izolata iz Srbije i 31 sekvence izolata višejedarnih *Waitea circinata* var. *zeae*, *oryzae*, *circinata*, *agrotis* i *prodigus* iz Italije, Izraela, Japana i SAD; kao autgrupa korišćena je sekvenca *Rhizoctonia solani* AG-1 IB; Izolati iz Srbije su označeni boldom

5.5. Direktna detekcija anastomoznih grupa *Rhizoctonia* spp.

U cilju direktne i specifične detekcije pojedinih AG *Rhizoctonia* spp. razvijena su dva protokola zasnovana na konvencionaloj ili qPCR metodi.

5.5.1. Protokol za detekciju primenom specifičnih prajmera

Direktna detekcija različitih AG primenom PCR i specifičnih prajmera za pojedinačne AG bila je uspešna za više različitih AG (Slika 23). Po jedan izolat iz svake od 11 detektovanih AG *Rhizoctonia* spp. (AG-A, AG-G, AG-F, AG-U, AG-2-1, AG-2-2, AG-3, AG-4 HGI, AG-4 HGII, AG-6, *W. circinata* var. *zeae*) odabran je za proučavanje specifičnosti odabranih prajmera. Korišćeni su specifični prajmeri za detekciju devet AG: AG-A, AG-G, AG-F, AG-2-1, AG-2-2, AG-3, AG-4 HGI, AG-4 HGII i AG-6.

Detekcija dvojedarne *Rhizoctonia* spp. AG-A primenom para prajmera AG-A_F/ThanaCera-R pokazala se kao uspešna. Kao rezultat PCR reakcije amplifikovani su fragmenti ITS regiona veličine 300 bp izolata dvojedarne *Rhizoctonia* spp. AG-A. U reakcijama sa izolatima ostalih AG, kao ni u negativnoj kontroli, nije došlo do amplifikacije.

Detekcija dvojedarne *Rhizoctonia* spp. AG-G primenom para prajmera AG-G_F/ThanaCera-R pokazala se kao specifična. Kao rezultat PCR reakcije amplifikovani su fragmenti ITS regiona veličine 150 bp izolata dvojedarne *Rhizoctonia* spp. AG-G, ali i izolata višejedarne *R. solani* AG-2-1. Međutim, amplikoni u nespecifičnim reakcijama gde je amplifikovana AG-2-1 bili su kraći od očekivane dužine (veličine oko 100 bp). Zbog ove razlike, prajmeri su pogodni za specifičnu detekciju AG-G. U reakcijama sa izolatima ostalih AG, kao ni u negativnoj kontroli, nije došlo do amplifikacije.

Detekcija dvojedarne *Rhizoctonia* spp. AG-F primenom para prajmera AG-F_F/ThanaCera-R pokazala se kao delimično specifična. Kao rezultat PCR reakcije amplifikovani su fragmenti ITS regiona veličine 150 bp izolata dvojedarne *Rhizoctonia* spp. AG-F, ali i izolata višejedarne *R. solani* AG-2-1 i AG-2-2. Međutim, amplikoni nisu bili odgovarajuće dužine. Zbog ove razlike, prajmeri mogu biti primenjeni za specifičnu detekciju AG-F. U reakcijama sa izolatima ostalih AG, kao ni u negativnoj kontroli, nije došlo do amplifikacije.

Detekcija višejedarne *Rhizoctonia solani* AG-2-1 primenom para prajmera AG-2-1_F/AG-2-1_R bila je sa nezadovoljavajućim nivoom specifičnosti za rutinsku primenu. Kao rezultat PCR reakcije amplifikovani su fragmenti ITS regiona veličine 150 bp izolata višejedarne *R. solani* AG-2-1, ali i izolata AG-2-2 i AG-3. U reakcijama sa izolatima ostalih AG, kao ni u negativnoj kontroli, nije došlo do amplifikacije.

Detekcija višejedarne *Rhizoctonia solani* AG-2-2 primenom para prajmera AG-2-2_F/AG-2-2_R pokazala se kao vrlo specifična. Kao rezultat PCR reakcije amplifikovani su fragmenti ITS regiona veličine oko 100 bp izolata višejedarne *R. solani* AG-2-2. U reakcijama sa izolatima ostalih AG, kao ni u negativnoj kontroli, nije došlo do amplifikacije.

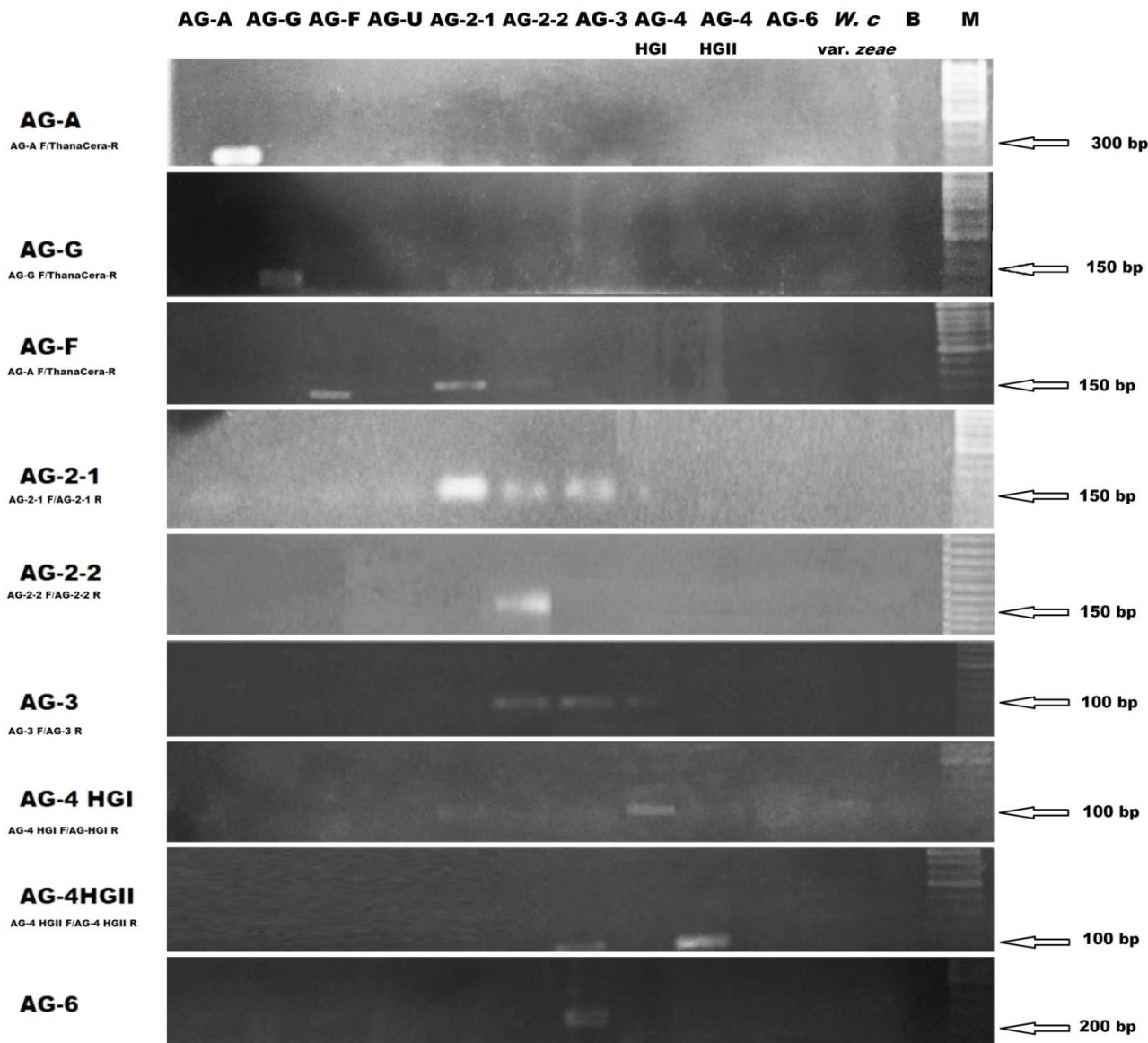
Detekcija višejedarne *Rhizoctonia solani* AG-3 primenom para prajmera AG-3_F/AG-3_R nije bila dovoljno specifična. Kao rezultat PCR reakcije amplifikovani su fragmenti β -*tubulin* regiona veličine 100 bp izolata višejedarne *R. solani* AG-3, ali i izolata AG-4 HGI i AG-4 HGII. U reakcijama sa izolatima ostalih AG, kao ni u negativnoj kontroli, nije došlo do amplifikacije.

Detekcija višejedarne *Rhizoctonia solani* AG-4 HGI primenom para prajmera AG-4 HGI_F/AG-4 HGI_R pokazala se kao veoma specifična. Kao rezultat rezultata PCR reakcije amplifikovani su fragmenti ITS regiona veličine 100 bp izolata višejedarne *R. solani* AG-4 HGI. U reakcijama sa izolatima ostalih AG, kao ni u negativnoj kontroli, nije došlo do amplifikacije.

Detekcija višejedarne *Rhizoctonia solani* AG-4 HGII primenom para prajmera AG-4 HGII_F/AG-4 HGII_R pokazala se kao delimično specifična. Kao rezultat PCR reakcije amplifikovani su

fragmenti β -tubulin regiona veličine 100 bp izolata višejedarne *R. solani* AG-4 HGII, ali i izolata AG-3. Međutim, ampliconi AG-3 nisu bili odgovarajuće dužine, bili oko 50 bp kraći od očekivanih, zbog čega se ovi prajmeri ipak mogu koristiti u rutinskim analizama. U reakcijama sa izolatima ostalih AG, kao ni u negativnoj kontroli, nije došlo do amplifikacije.

Detekcija višejedarne *Rhizoctonia solani* AG-6 primenom para prajmera AG-6_F/ThanaCera-R nije bila moguća. Kao rezultat PCR reakcije amplifikovani su fragmenti ITS regiona veličine 200 bp izolata višejedarne *R. solani* AG-3, dok ciljani izolat višejedarne *R. solani* AG-6 nije amplifikovan. U reakcijama sa izolatima ostalih AG, kao ni u negativnoj kontroli, nije došlo do amplifikacije.

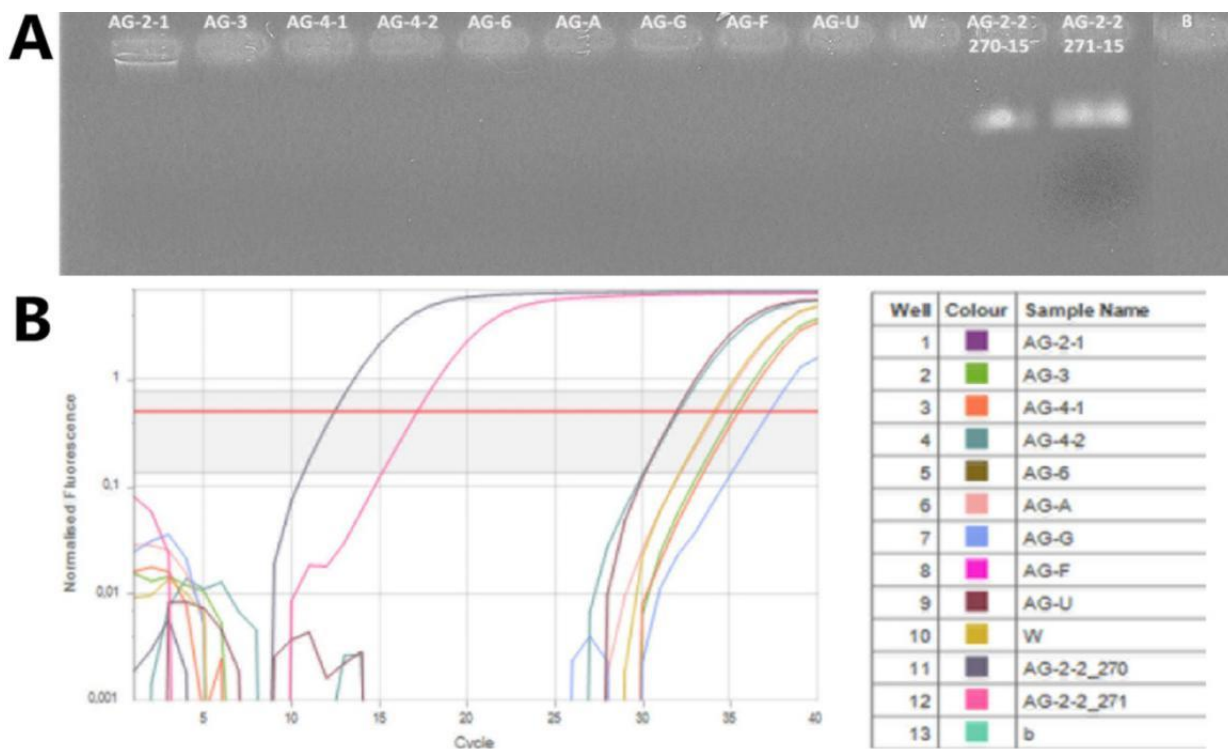


Slika 23. *Rhizoctonia* spp. vizuelizacija produkata PCR reakcija sa specifičnim prajmerima: AG-A_F/ThanaCera-R za *Rhizoctonia* spp. AG-A, AG-G_F/ThanaCera-R za *Rhizoctonia* spp. AG-G, AG-F_F/ThanaCera-R za *Rhizoctonia* spp. AG-F, AG-2-1_F/AG-2-1_R za *R. solani* AG-2-1, AG-2-2_F/AG-2-2_R za *R. solani* AG-2-2, AG-3_F/AG-3_R za *R. solani* AG-3, AG-4 HGI_F/AG-4 HGI_R za *R. solani* AG-4 HGI, AG-4 HGII_F/AG-4 HGII_R za *R. solani* AG-4 HGII, AG-6_F/ThanaCera-R za *R. solani* AG-6

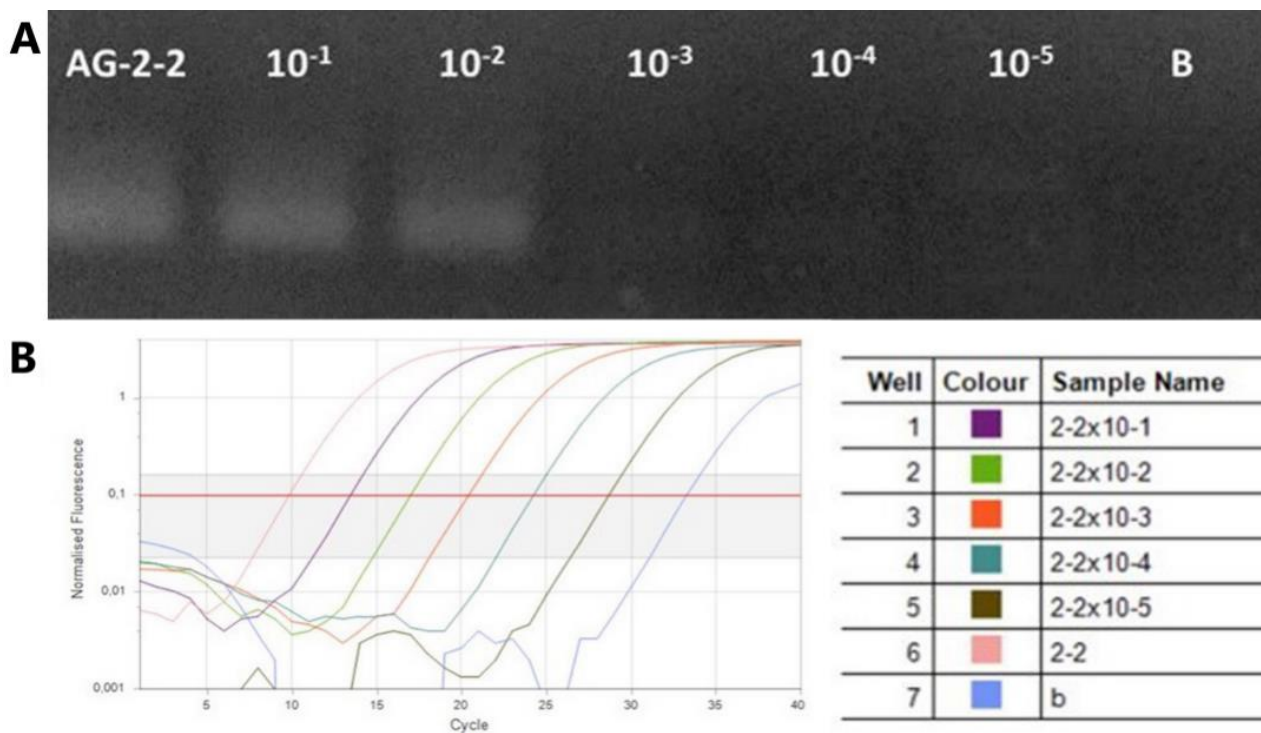
5.5.2. qPCR protokol za specifičnu detekciju *Rhizoctonia solani* AG-2-2

Razvijeni qPCR protokol specifično je detektovao *R. solani* AG-2-2 i nijedan od preostalih 10 genotipova uključujući četiri dvojedarne *Rhizoctonia* spp. AG-A - izolat 107-13; AG-G - izolat 140-16; AG-F - izolat 190G-18; AG-U - izolat 314-16 i šest višejedarnih *R. solani* AG AG-2-1 - izolat 137-17; AG-3 - izolat 98-16; AG-4 HGI - izolat 433-16; AG-4 HGII - izolat 238-15; AG-6- izolat 251G-18 i *W. circinata* var. *zeae* - izolat 299-17. Kao ciljani, korišćeni su izolati *R. solani* AG-2-2 270-15 i 271-15 iz Srbije. qPCR protokol i primenjeni prajmeri ispoljili su visoku specifičnost i uspešno amplifikovali oba izolata *R. solani* AG-2-2 bez unakrsnih reakcija sa ostalim AG. Navedeni protokol se pored toga pokazao i kao vrlo osetljiv, detektujući ciljanu DNA u velikim razređenjima. Specifičnost ispitivanih prajmera za *R. solani* AG-2-2 je potvrđena primenom qPCR i konvencionalne PCR metode. Izolati 270-15 i 271-15 *R. solani* AG-2-2 detektovani su u qPCR metodi posle 8-10 ciklusa, što je najmanje 15 ciklusa pre amplifikacije ostalih AG. Melting temperatura bila je od 81,3°C do 81,27°C (Slika 24A, B).

Osetljivost protokola za qPCR i konvencionalni PCR testirana je na različitim razređenjima DNA izolata 270-15 *R. solani* AG-2-2 i pokazala se značajno različitom. U qPCR protokolu došlo je do umnožavanja DNA svih razređenja (10^{-1} do 10^{-5}), dok je u konvencionalnom PCR poslednje umoženo razređenje 10^{-3} , što predstavlja 100x manju osetljivost (Slika 25A, B).



Slika 24. Specifična detekcija *Rhizoctonia solani* AG-2-2: A - konvencionalni PCR: bunar 1 - izolat 137-17 *Rhizoctonia solani* AG-2-1; bunar 2 - izolat 98-16 *R. solani* AG-3; bunar 3 - izolat 433-16 *R. solani* AG-4 HGI; bunar 4 - izolat 238-15 *R. solani* AG-4 HGII; bunar 5 - izolat 251G-18 *R. solani* AG-6; bunar 6 - izolat 107-13 *Rhizoctonia* spp. AG-A; bunar 7 - izolat 296-17 *Rhizoctonia* spp. AG-G; bunar 8 - izolat 190G-18 *Rhizoctonia* spp. AG-F; bunar 9 - izolat 314-16 *Rhizoctonia* spp. AG-U; bunar 10 - izolat 299-17 *W. circinata* var. *zeae*; bunar 11 - izolat 270-15 *R. solani* AG-2-2; bunar 12 - izolat 271-15 *R. solani* AG-2-2; bunar 13 - negativna kontrola; B - dijagram amplifikacije primenom qPCR (levo) i oznake izolata (desno)



Slika 25. Usporedna osetljivost detekcije *Rhizoctonia solani* AG-2-2 izolat 270-15 razređenja $0-10^{-5}$ i negativna kontrola: A - amplifikacija primenom konvencionalne PCR metode; B - amplifikacija primenom qPCR

5.6. Krug domaćina i virulentnost

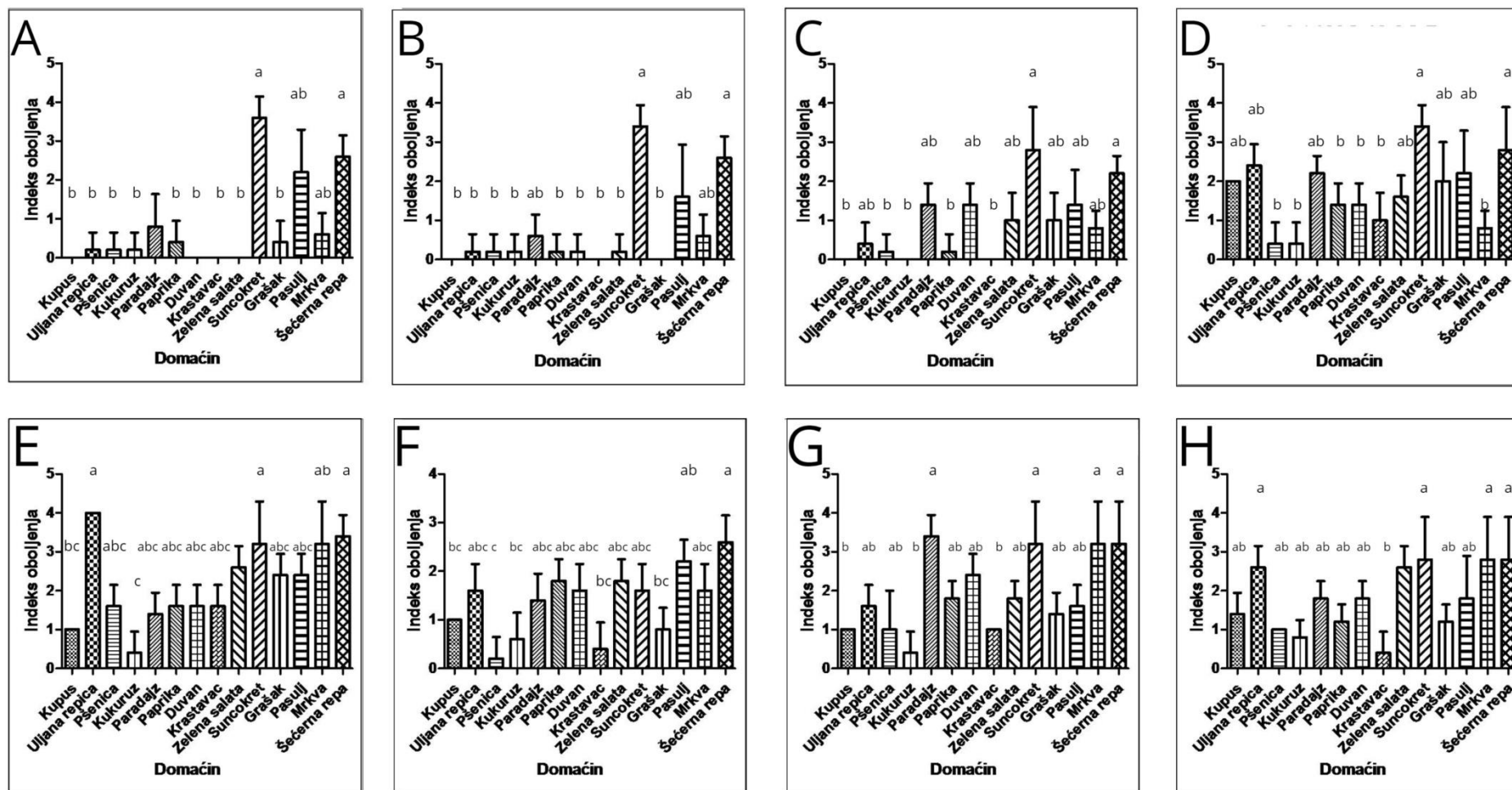
Virulentnost 25 odabranih izolata dvojedarnih i višejedarnih *Rhizoctonia* spp. bila je veoma različita i pre svega je zavisila od AG kojoj izolat pripada. Ispitivana je u tri sistema, na sejancima 14 vrsta biljaka iz osam botaničkih familija, na fragmentima lisnih peteljki jagode i na isečcima stabla krompira.

Krug domaćina i virulentnost na sejancima biljaka. Krug domaćina 25 odabranih izolata i to 10 izolata identifikovanih kao dvojedarne *Rhizoctonia* spp. AG-A, AG-G, AG-F, AG-U, kao i 15 izolata višejedarnih *R. solani* AG-2-1, AG-2-2, AG-3, AG-4 HGI, AG-4 HGII, AG-6 i višejedarne *W. circinata* var. *zeae*, bio je vrlo različit nakon inokulacija sejanaca 14 biljnih vrsta (Slika 26). Ispitivane AG ispojile su različitu sposobnost da ostvare infekciju pojedinih biljnih vrsta, a razlike su uočene kako između AG, tako i između izolata iste AG (Grafikon 1-3).

Od dvojedarnih *Rhizoctonia* spp., kao slabije virulentni pokazali su se izolati AG-A na uljanoj repici, pšenici, paradajzu, paprici, suncokretu, pasulju, mrkvi i šećernoj repi, dok uopšte nisu uspjeli da zaraze određeni broj biljnih vrsta, među kojima kupus, kukuruz, duvan, krastavac i grašak. Varijabilnost u virulentnosti bila je izražena između izolata *Rhizoctonia* spp. AG-A. Izolati *Rhizoctonia* spp. AG-F, AG-G i AG-U bili u manjoj ili većoj meri virulentni za sve eksperimentalne domaćine.

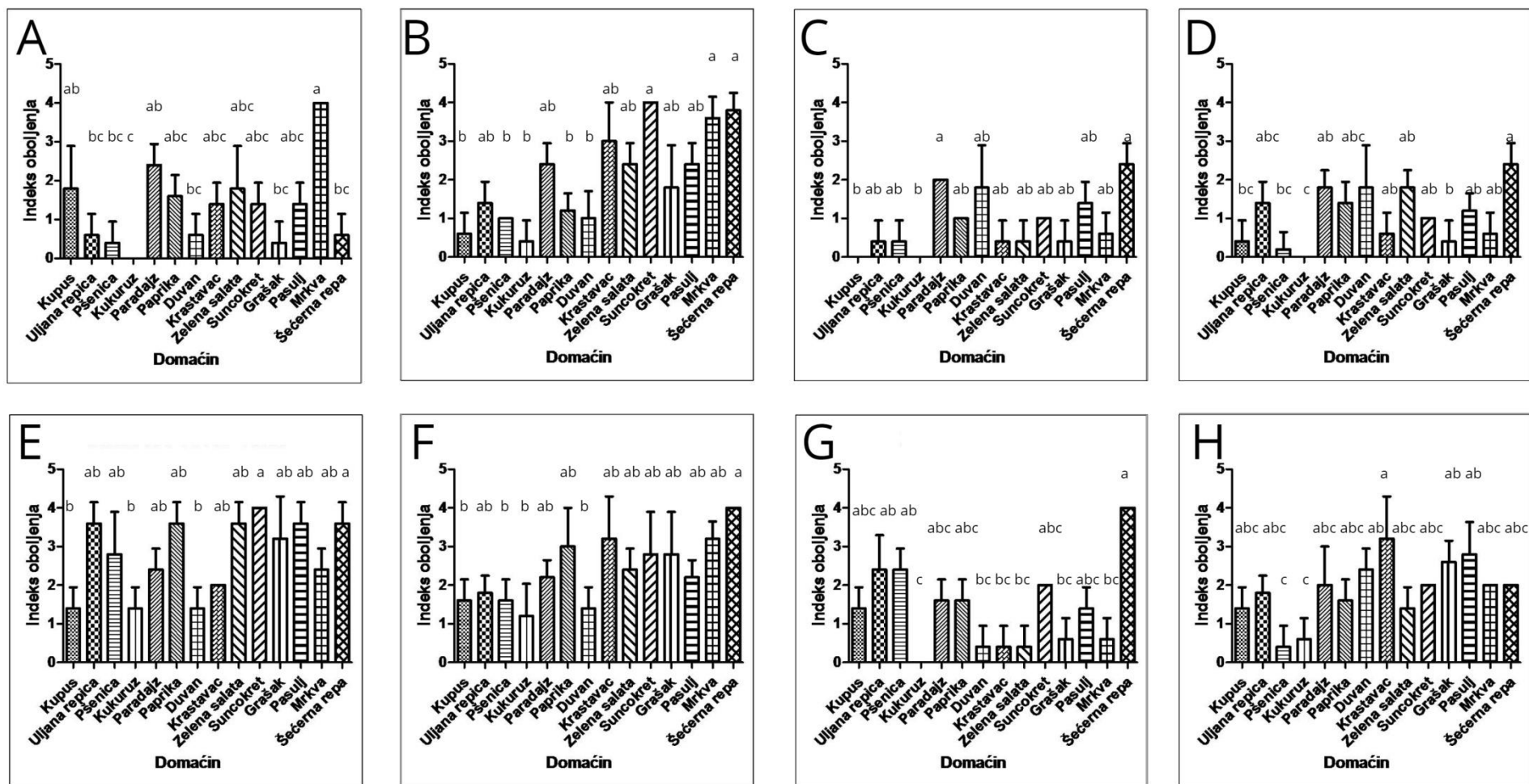
Razlike u virulentnosti izolata višejedarnih *R. solani* takođe su bile izražene. Najuzi krug domaćina imali su izolati *R. solani* AG-2-1, AG-4 HGII i AG-3, koji nisu uspjeli da zaraze kukuruz, odnosno kupus. Razlika u virulentnosti postojala je unutar AG-3. Izolati *R. solani* AG-2-2, AG-4 HGI i AG-6 bili u manjoj ili većoj meri virulentni za sve eksperimentalne domaćine. Svi odabrani izolati *R. solani* AG-4 HGI ispoljili su izraženu virulentnost na svim testiranim biljkama.

Oba izolata *W. circinata* var. *zeae* uspjela su da zaraze sejance svih testiranih biljaka, pri čemu je izolat 299-17 *W. circinata* var. *zeae* iz kupusa ispoljio nešto višu virulentnost na većini testiranih biljaka u odnosu na izolat 300-17.



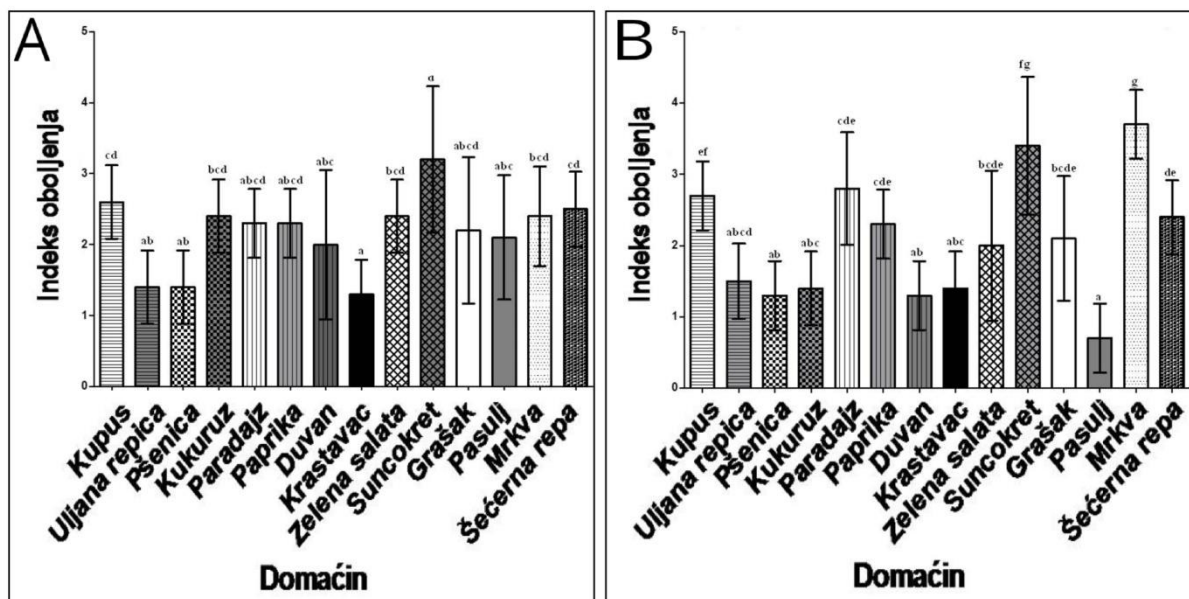
Grafikon 1. Intenzitet nekroze veštački inokulisanih biljaka izolatima dvojedarnih *Rhizoctonia* spp. posle sedam dana*

*A - Dvojedarna *Rhizoctonia* spp. AG-A izolat 107-13; B - AG-A izolat 293-16; C - AG-A izolat BJ4-18; D - AG-F izolat 190G-18; E - AG-G izolat 140-16; F - AG-G izolat 163-17; G - AG-G izolat 296-17; H - AG-U izolat 314-16; ista latinična mala slova navedena iznad vrednosti označavaju da razlika u vrednostima nije statistički značajna (Tuckey test, $p < 0,01$)



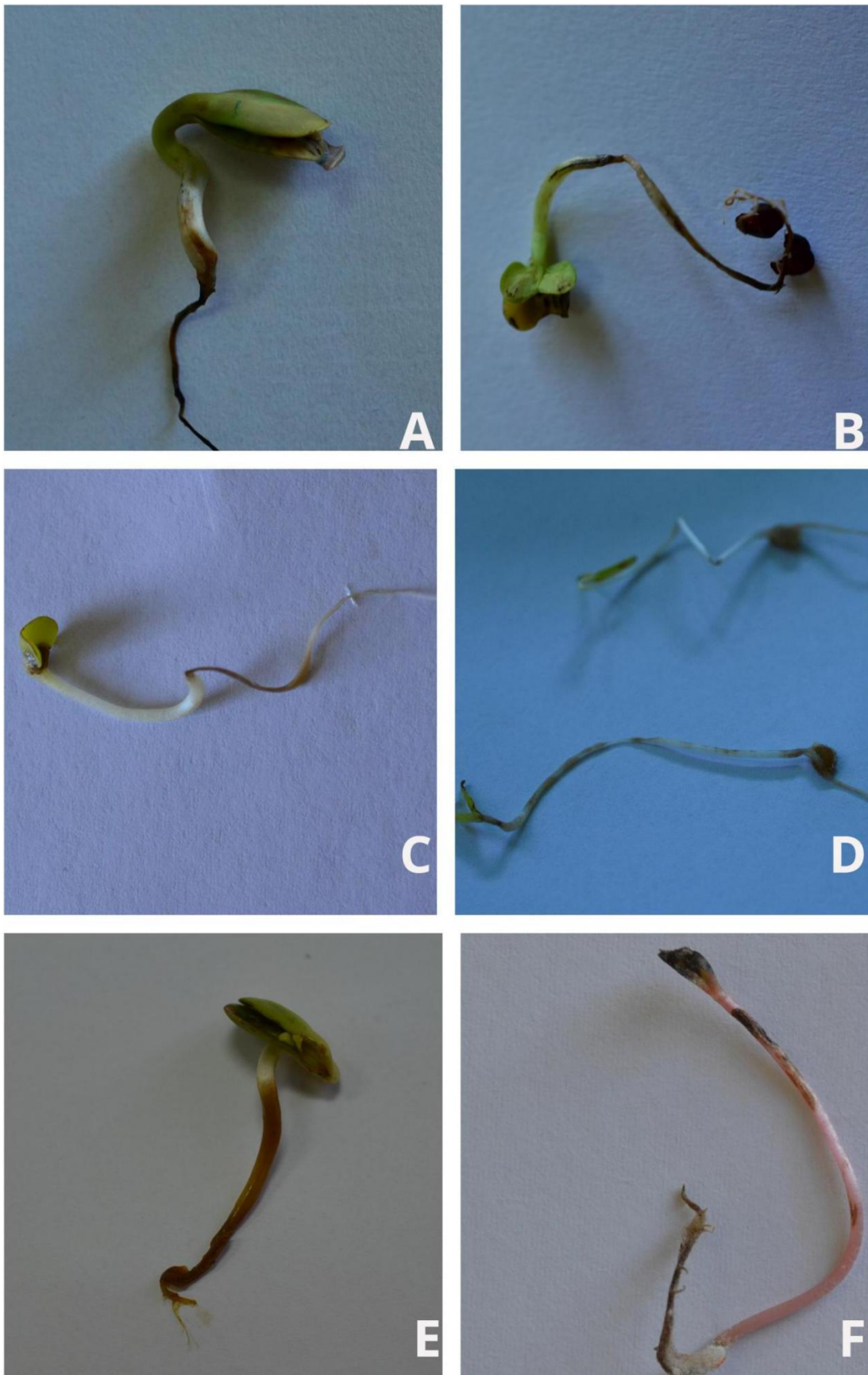
Grafikon 2. Intenzitet nekroze biljaka veštački inokuliranih izolatima višejedarnih *Rhizoctonia solani* posle sedam dana *

*A - Višejedarna *Rhizoctonia solani* AG-2-1 izolat 137-17; B - AG-2-2 izolat 270-15; C - AG-3 izolat 98-16; D - AG-3 izolat 14G-18; E - AG-4 HGI izolat 433-16; F - AG-4 HGI izolat 301-17; G - AG-4 HGII 238-15; H - AG-6 izolat 251G-18; ista latinična mala slova navedena iznad vrednosti označavaju da razlika u vrednostima nije statistički značajna (Tuckey test, $p < 0,01$)



Grafikon 3. Intenzitet nekroze biljaka veštački inokulisanih izolatima višejedarnih *Waitea circinata* var. *zeae* posle sedam dana*

*A - Višejedarna *Waitea circinata* var. *zeae* izolat 299-17, B - izolat 300-17; ista latinična mala slova navedena iznad vrednosti označavaju da razlika u vrednostima nije statistički značajna (Tuckey test, $p < 0,01$)



Slika 26. *Rhizoctonia* spp. nekroza stabla i korena na veštački inokulisanim sejancima: A - suncokret inokulisan izolatom dvojedarne *Rhizoctonia* spp. AG-A; B - uljana repica inokulisana izolatom AG-F; C - kupus inokulisan izolatom višejedarne *Rhizoctonia solani* AG-2-1; D - paradajz inokulisan izolatom AG-2-2; E - pasulj inokulisan izolatom AG-4 HGI; F - šećerne repa inokulisana izolatom *Waitea circinta* var. *zeae*

Virulentnost izolata na lisnim peteljka jagode. Ukupno 14 odabranih izolata dvojedarnih i višejedarnih *Rhizoctonia* spp. svrstanih u 11 AG ispoljilo je različitu virulentnost na lisnim peteljka jagode izazivajući pojavu nekroze različite dužine od 0,63-20 mm, sedam dana nakon inokulacije (Slika 27). Prema virulentnosti, ispitivani izolati grupisali su se u pet grupa (Tabela 17), koje su se statistički vrlo značajno razlikovale ($p < 0,01$). Izdvojio se izolat 299-17 *W. circinata* var. *zeae*, kao najslabije virulentan koji je izazvao najmanji intenzitet nekroze, dok je izolat 270-15 *R. solani* AG-2-2 bio najvirulentniji i izazvao je najveći intenzitet nekroze.

Virulentnost izolata na isečcima stabla krompira. Ukupno 10 odabranih izolata dvojedarnih i višejedarnih *Rhizoctonia* spp. svrstanih u osam različitih AG (Tabela 18) ispoljilo je različitu virulentnost. Svi izolati su na isečcima stabla sedam sorti krompira izazvali nekrozu sedam dana nakon inokulacije (Slika 28). Prema virulentnosti, ispitivani izolati su se grupisali u četiri grupe, koje su se statistički razlikovale ($p < 0,01$). Izdvojio se izolat 299-17 *W. circinata* var. *zeae* kao najslabije virulentan (prosečna ocena 0,88), dok je izolat 98-16 *R. solani* AG-3 koji je bio najvirulentniji, prosečno 3,51. Preliminarna ocena relativne osetljivosti sedam različitih sorti krompira u uslovima postavljenog eksperimenta, pokazala je da je sorta na kojoj je indeks oboljenja bio najviši bila Crisps4all, a da je Orwell sorta sa najnižim indeksom oboljenja (Tabela 19).

Tabela 17. *Rhizoctonia* spp.: dužina nekroze (mm) na lisnim peteljka jagode

Izolat	<i>Rhizoctonia</i> AG/ <i>Waitea circinata</i> var.	Prosečna dužina nekroze ± standardna devijacija
299-17	var. <i>zeae</i>	0,63±0,81 a*
14G-18	AG-3	2,75±0,91 b
190G-18	AG-F	3±1,83 b
238-15	AG-4 HGII	13±3,89 c
433-16	AG-4 HGI	13,63±5,46 c
BJ4-18	AG-A	13,63±3,71 c
251G-18	AG-6	13,63±3,30 c
101-16	AG-A	14,25±5,14 c
140-16	AG-G	14,75±3,88 c
137-17	AG-2-1	15,34±3,56 cd
107-13	AG-A	15,75±4,26 cd
314-16	AG-U	15,88±1,91 cd
293-16	AG-A	17±2,62 cd
270-15	AG-2-2	20±0 d

*-Vrednosti obeležene istim slovom ne razlikuju se statistički značajno (Duncan test, $p < 0,01$)

Tabela 18. Ocena virulentnosti različitih AG *Rhizoctonia* izolata na isečcima stabla krompira

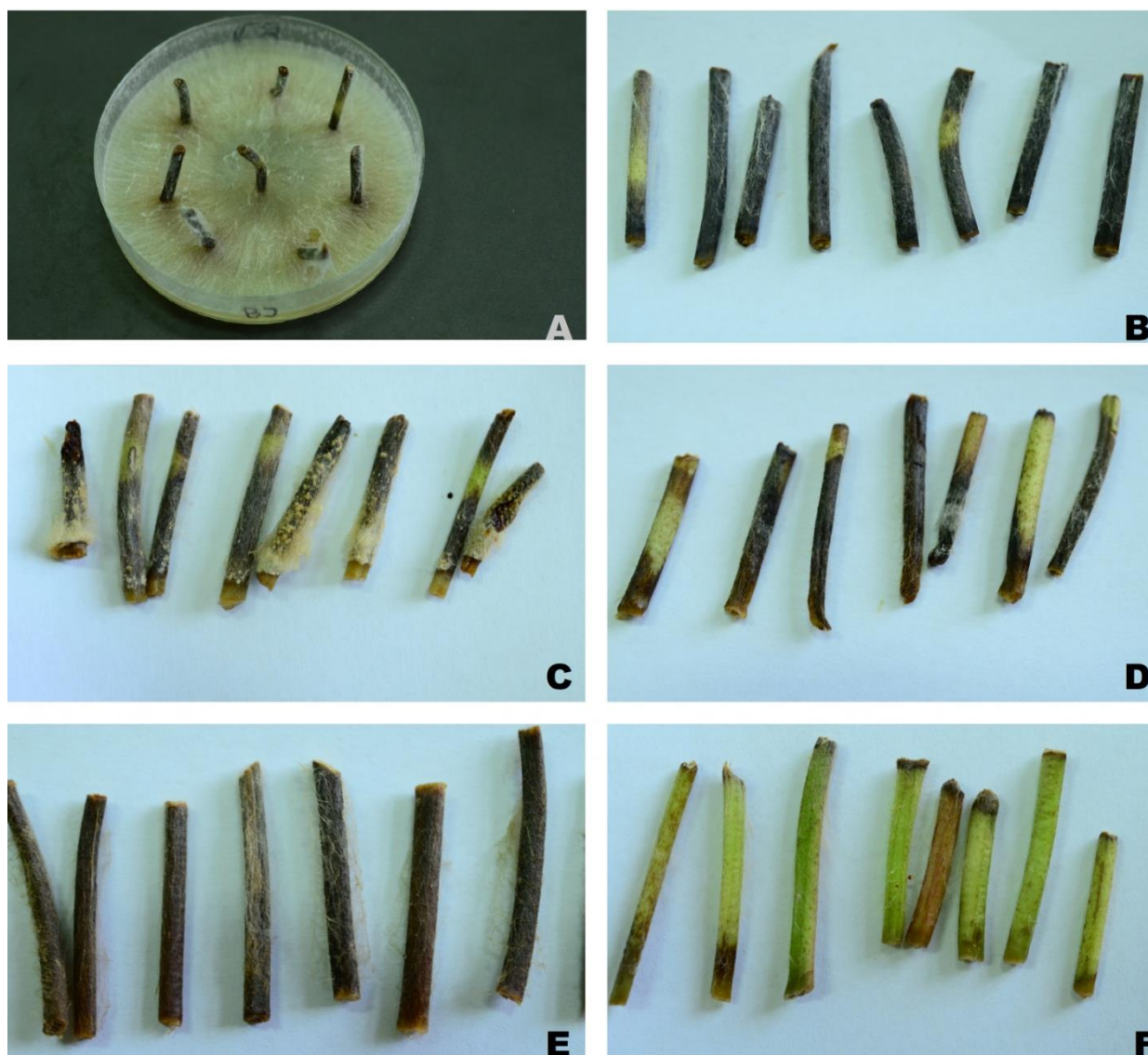
Izolat	<i>Rhizoctonia</i> AG/ <i>Waitea circinata</i> var.	Prosečna ocena intenziteta oboljenja ± standardna devijacija
299-17	var. <i>zeae</i>	0,88±0,19 a*
238-15	AG-4 HGII	0,89±0,32 a
107-13	AG-A	0,90±0,23 ab
140-16	AG-G	0,92±0,19 ab
297-17	AG-4 HGI	0,96±0,25 ab
271-15	AG-2-2	1,14±0,65 bc
314-16	AG-U	1,24±0,38 c
R14	AG-3	3,14±0,46 d
14G-18	AG-3	3,26±1,07 d
98-16	AG-3	3,51±0,76 d

*-Vrednosti obeležene istim slovom ne razlikuju se statistički značajno (Duncan test, $p < 0,01$)

Tabela 19. Intezitet oboljenja na isečcima stabla sedam različitih sorti krompira inokulisanim izolatima *Rhizoctonia* spp.

Sorta	Prosečna ocena intenziteta oboljenja ± standardna devijacija
Orwel	1,66±1,46 a*
Almera	1,69±0,6 ab
Brooke	1,72±1,45 ab
Sofra	1,78±0,81 abc
Liseta	1,80±1,4 abc
Lucinda	1,86±0,96 bc
Crsp4all	1,98±1,19 c

*-Vrednosti obeležene istim slovom ne razlikuju se statistički značajno (Duncan test, $p < 0,01$)



Slika 27. *Rhizoctonia* spp. nekroza lisnih peteljki jagode: A - izolat 107-13 *Rhizoctonia* spp. AG-A; B - izolat 107-13 dvojedarne *Rhizoctonia* spp. AG-A; C - izolat 140-16 dvojedarne *Rhizoctonia* spp. AG-G; D - izolat 137-17 višejedarne *Rhizoctonia solani* AG-2-1; E - izolat 270-15 višejedarne *Rhizoctonia solani* AG-2-2; F - izolat 299-17 višejedarne *Waitea circinata* var. *zeae*



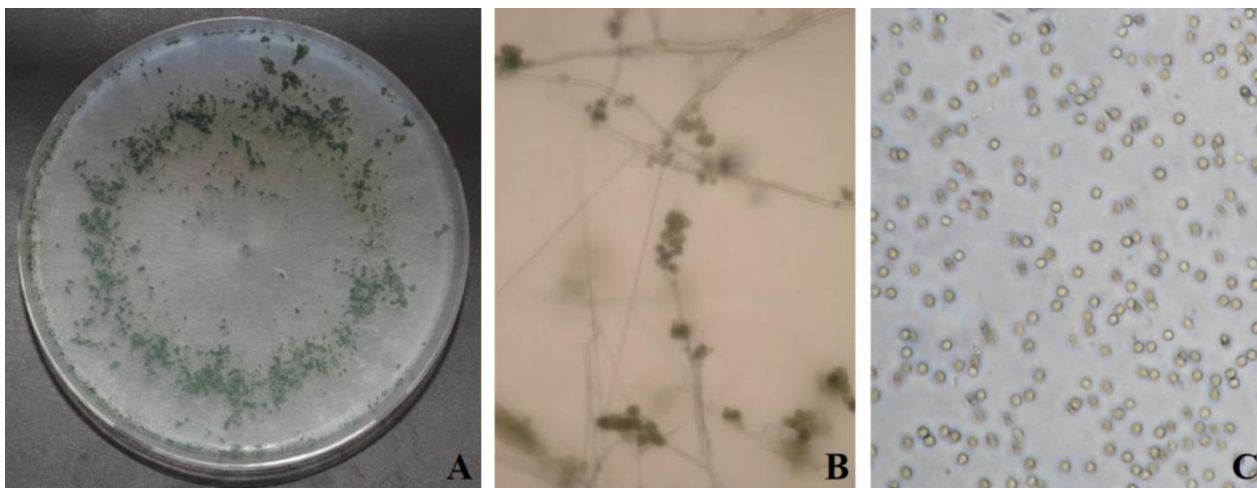
Slika 28. *Rhizoctonia* spp.: nekroza isečaka stabla krompira veštački inokulisanih višejedarnom *Waitea circinata* var. *zeae* izolat 299-17; višejedarnom *Rhizoctonia solani* AG-4 HGI izolat 297-17; dvojedarnom *Rhizoctonia* spp. AG-U izolat 314-16; višejedarnom *R. solani* AG-3 izolat 98-16 (sa leva na desno)

5.8. Biološka kontrola izolatom 167-17 *Trichoderma harzianum*

Prilikom prikupljanja uzoraka obolelih biljaka i procesa izolacije za izradu ove disertacije, u toku 2017. godine prikupljeni su i uzorci borovnice iz kojih su dobijeni izolati, preliminarno identifikovani kao *Trichoderma* spp. Od prikupljenih izolata odabran je jedan izolat 167-17 za dalju identifikaciju i karakterizaciju, zato što je u preliminarnim ispitivanjima ispoljio izraženu antagonističku aktivnost prema *Rhizoctonia* spp. Izolat je dalje korišćen u *in vitro* i *in vivo* ogledima za testiranje biološke aktivnosti, gde je ispoljio različit stepen inhibicije različitih AG *Rhizoctonia* spp.

5.8.1. Morfološke i molekularne odlike izolata 167-17 *Trichoderma* sp. iz Srbije

U okviru proučavanja morfoloških osobina, utvrđeno je da je izolat 167-17 na PDA obrazovao u početku belu koloniju, koja je nakon sedam dana odgovala tipičnom izgledu kolonija vrsta roda *Trichoderma*. Kolonija je poprimala svetlozelenu boju sa praškastom konzistencijom (Slika 29A). Brzorastuća je, sa prosečnim dnevnim porastom od 12,5 mm. Direktnim mikroskopiranjem kolonije na SNA utvrđeno je postojanje razgranatih konidiofora (Slika 29B) sa okruglim konidijama zelene boje (Slika 29C). Dimenzije konidija bile su 2,8-3,4 x 2,6-3,1 μm , u proseku 3,1 x 2,9 μm , a konidiofora 7,1 x 3,5 μm . Do formiranja hlamidospora i struktura polnog razmnožavanja nije došlo, ni šest nedelja od zasejavanja. Na osnovu ovih makroskopskih i mikroskopskih morfoloških karakteristika utvrđeno je da ispitivani izolat pripada rodu *Trichoderma*.



Slika 29. Izgled kolonije i mikroskopskih struktura izolata 167-17 *Trichoderma harzianum*: A - kolonija na PDA nakon 15 dana; B - konidiofore na SNA nakon 21 dan; C - konidije na SNA nakon 21 dan

Izolat 167-17 identifikovan je na osnovu analize sekvence ITS regiona rDNA veličine 650 bp, dobijenog korišćenjem univerzalnih prajmera ITS1F i ITS4. Nakon sekvenciranja, obrade sekvence i BLAST analize ispitivani izolat identifikovan je kao *T. harzianum*. Analizom homologije nukleotidne sekvence ITS regiona rDNA izolata 167-17 (pristupni broj MT138806) utvrđena je visoka nukleotidna sličnost (98,25-99,15%) sa 100 sekvenci izolata *T. harzianum* dostupnih u GenBank bazi podataka. Najviši stepen sličnosti (99,15%) utvrđen je sa sekvencama izolata *T. harzianum* iz Kine (HQ259308) i Austrije (EF191302).

Za dalju karakterizaciju amplifikovani su geni *tef-1a* i *rpb2*, korišćenjem parova prajmera EF1-728F/EF1-1199R i fRPB2-5f/fRPB2-7cr i dobijeni su fragmenti veličine 550 bp (*tef-1a*) odnosno 800bp (*rpb2*). Do amplifikacije nije došlo kod negativne kontrole. Nakon sekvenciranja i obrade BLAST analize, potvrđeno je da izolat pripada vrsti *T. harzianum*. Sekvenca *tef-1a* regiona izolata 167-17 (pristupni broj MT161367) ispoljila je nukleotidnu sličnost od 96,09-100% sa preko 60 sekvenci *T. harzianum*, dostupnih u GenBank bazi podataka, a najbližnja je bila sa sekvencom *T. harzianum* iz zemljišta iz SAD-a (MK516086). Sekvenca *rpb2* regiona izolata 167-7 (pristupni broj MT150073) ispoljila je nukleotidnu sličnost od 97,55-99,53% sa preko 30 sekvenci *T. harzianum*, a najveću od 99,53% sa dve sekvence *T. harzianum* iz Japana (AB856750 i AB856750).

5.8.2. *In vitro* efekti delovanja *Trichoderma harzianum* na ispitivane izolate *Rhizoctonia* spp.

Odabrani izolat 167-17 *T. harzianum* ispoljio je različit intenzitet antagonističke aktivnosti prema svim izolatima *Rhizoctonia* spp. *in vitro*. Antagonistička aktivnost *T. harzianum* prema devet različitih AG i varijeteta *Rhizoctonia* spp. (AG-A, AG-G, AG-U, AG-2-1, AG-2-2, AG-3, AG-4 HGI, AG-4 HGII, *W. circinata* var. *zeae*) utvrđena je merenjem promena u brzini porasta *Rhizoctonia* spp. i poređenjem sa kontrolama (utvrđivanje procenta inhibicije) (Tabela 20). Prosečna inhibicija porasta iznosila je od 3,56 do 17,94%. Izolati *Rhizoctonia* spp. su se po inhibiciji koju su ispoljili grupisali u četiri grupe osetljivosti, koje su se statistički razlikovale na nivou značajnosti $p < 0,01$. Izdvojio se izolat *Rhizoctonia* spp. AG-U gde je bio najmanji procenat inhibicije i *W. circinata* var. *zeae* gde je bio najveći procenat inhibicije.

Morfološke promene u koloniji i hifama ispitivanih AG *Rhizoctonia* spp. bile su veoma različite i prikazane su u Tabeli 21. Uočeno je da hife različitih izolata *Rhizoctonia* spp. različito reaguju na kontakt sa hifama *T. harzianum*. Zapaženo je nekoliko tipova reakcija: obmotavanje hifa izolata *T. harzianum* oko hifa izolata *Rhizoctonia* spp., penetracija hifa izolata *T. harzianum* u hife izolata *Rhizoctonia* spp., paralelni rast hifa dve gljive, pucanje hifa izolata *Rhizoctonia* spp. Najčešće prisutna reakcija uočena kod svih predstavnika različitih AG ispitivanih *Rhizoctonia* spp. jeste

obmotavanje hifa *T. harzianum* oko hifa *Rhizoctonia* spp (Slika 30A, B). Obmotavanje hifa javljalo se 24 h nakon kontakta hifa dve gljive, dok je do zaustavljanja porasta hifa *Rhizoctonia* spp. dolazilo 24 h nakon početka obmotavanja. Paralelni porast hifa dve gljive bio je uočljiv kod šest predstavnika različitih AG *Rhizoctonia* spp. (AG-A, AG-U, AG-2-2, AG-3, AG-4 HGI, *W. circinata* var. *zeae*) nakon 48h od zasejavanja. Najmanje su bile zastupljene dve pojave i to: pucanje hifa *Rhizoctonia* spp. kod predstavnika *Rhizoctonia* spp. AG-U i *R. solani* AG-2-2, i penetracija hifa *T. harzianum* u hife *Rhizoctonia* spp. koja se javljala kod *Rhizoctonia* spp. AG-U i *R. solani* AG AG-2-1 i AG-2-2.

Od makroskopskih promena najčešće je uočeno potpuno prerastanje micelije *T. harzianum* preko micelije *Rhizoctonia* spp. koje je zabeleženo kod svih ispitivanih AG, ali u različito vreme. Česta je bila i promena boje podloge u zoni kontakta kolonija, do koje je dolazilo kod pet ispitivanih AG *Rhizotonia* spp. (AG-U, AG-2-1, AG-2-2, AG-3, AG-4 HGI, *W. circinata* var. *zeae*).

Prilikom uparivanja izolata *Rhizoctonia* spp. AG-A i izolata *T. harzianum* u dualnim kulturama, utvrđeno je prisustvo srednje jakog antagonističkog delovanja. Kolonije gljiva srele su se između 24 h i 48 h, a prerastanje micelije *T. harzianum* preko micelije *Rhizoctonia* spp. AG-A moglo se uočiti nakon 72 h. Do potpunog prerastanja došlo je nakon sedam dana. Nakon 72 h moglo se uočiti obmotavanje hifa *T. harzianum* oko pojedinih hifa *Rhizoctonia* AG-A, a svakog sledećeg dana dolazilo je do obmotavanja sve većeg broja hifa.

Prilikom uparivanja izolata *Rhizoctonia* spp. AG-G i *T. harzianum* u dualnim kulturama, utvrđeno je prisustvo srednje jakog antagonističkog delovanja. Kolonije gljiva srele su se između 24 h i 48 h. Do delimičnog prerastanja micelije *T. harzianum* preko *Rhizoctonia* spp. AG-G došlo je tek nakon 144 h, iako je zaustavljanje porasta hifa zabeleženo između 72 h i 96 h. Do potpunog prerastanja micelije *Rhizoctonia* spp. AG-G nije došlo ni nakon sedam dana (Slika 30C).

Prilikom uparivanja izolata *Rhizoctonia* spp. AG-U i *T. harzianum* u dualnim kulturama, utvrđeno je prisustvo srednje jakog antagonističkog delovanja. Kolonije gljiva srele su se nakon 24 h. Do slabog prerastanja micelije *T. harzianum* preko micelije *Rhizoctonia* spp. AG-U došlo je već nakon 72 h, kada se uočavala i jasna promena obojenosti u zoni kontakta. Međutim, ni sedam dana nakon kontakta nije došlo do potpunog prerastanja. Do obmotavanja hifa *T. harzianum* oko pojedinačnih hifa *Rhizoctonia* spp. AG-G došlo je nakon 48 h, dok se svakog narednog dana uočavao sve veći broj obmotanih hifa. U istom periodu zabeleženo je i pucanje hifa *Rhizoctonia* spp. AG-U i penetracija hifa *T. harzianum* u hife *Rhizoctonia* spp. AG-U, kao i paralelni rast hifa dve gljive.

Tabela 20. Prosečan dnevni porast i intenzitet inhibicije porasta kolonije *Rhizoctonia* spp. u dualnim kulturama sa izolatom 167-17 *Trichoderma harzianum*

<i>Rhizoctonia</i> AG/ <i>Waitea</i> <i>circinata</i> var.	Izolat	Prosečan porast <i>Rhizoctonia</i> spp. (mm) ± standardna devijacija	Prosečan porast <i>Rhizoctonia</i> spp. u dualnoj kulturi sa <i>Trichoderma harzianum</i> ± standardna devijacija	Procenat inhibicije (%)
AG-4 HGII	238-15	40±0,34	34,78±0,68*	14,9
AG-2-1	137-17	21,94±0,65	19,3±0,33	15,4
AG-G	296-17	39,7±0,57	33,9±0,36	17,0
AG-A	107-13	34,74±0,62	29,4±0,90	17,9
AG-4 HGI	303-17	54,80±0,41	50,52±0,32	8,6
AG-2-2	270-15	38,94±0,54	35,1±1,04	11,3
AG-3	98-16	29,22±0,29	23,78±0,55	22,4
var. <i>zeae</i>	299-17	54,98±0,29	42,94±0,26	24,0
AG-U	314-16	44,86±0,32	43,44±0,49	3,6

*-dnevni porast u mm nakon 48 h

Prilikom uparivanja *R. solani* AG-2-1 i *T. harzianum* u dualnim kulturama, utvrđeno je jako antagonističko delovanje. Kolonije gljiva srele su se nakon 24 h, a prerastanje micelije *T. harzianum* preko *R. solani* AG-2-1 moglo se uočiti nakon 48 h. Do promene boje podloge u zoni kontakta došlo je nakon 96 h. Nakon 48 h moglo se uočiti i obmotavanje hifa *T. harzianum* oko hifa *R. solani* AG-2-1 i njihov paralelni rast.

Prilikom uparivanja *R. solani* AG-2-2 i *T. harzianum* u dualnim kulturama, utvrđeno je jako antagonističko delovanje. Slično kao kod *R. solani* AG-2-1, veoma brzo, već nakon 24 h je došlo do kontakta i prerastanja micelije *T. harzianum* preko *R. solani* AG-2-2. Do promene boje podloge u zoni kontakta došlo je nakon 72 h. U slučaju ove AG bilo je prisutno pucanje hifa *R. solani* AG-2-2 i penetracija hifa *T. harzianum* u hife *R. solani* AG-2-2. Izražena je bila i pojava paralelnog rasta hifa dve gljive i obmotavanje hifa *T. harzianum* oko hifa *R. solani* AG-2-2. Od svih ispitivanih AG, *T. harzianum* je pokazala najjaču agresivnost prema ovoj AG (Slika 30D).

Prilikom uparivanja *R. solani* AG-3 i *T. harzianum* u dualnim kulturama, utvrđeno je srednje jako antagonističko delovanje. Do kontakta kolonija došlo je posle 48 h. Do promene boje podloge u zoni kontakta došlo je nakon 72 h. Nakon 48 h moglo se uočiti obmotavanje hifa *T. harzianum* oko pojedinih hifa *R. solani* AG-3, dok se svakog narednog dana moglo uočiti obmotavanje oko sve većeg broja hifa *R. solani* AG-3. Do potpunog prerastanja micelije *T. harzianum* preko *R. solani* AG-3 došlo je posle sedam dana.

Tabela 21. Način i vreme ispoljavanja agresivnosti izolata 167-17 *Trichoderma harzianum* prema različitim *Rhizoctonia* spp. AG

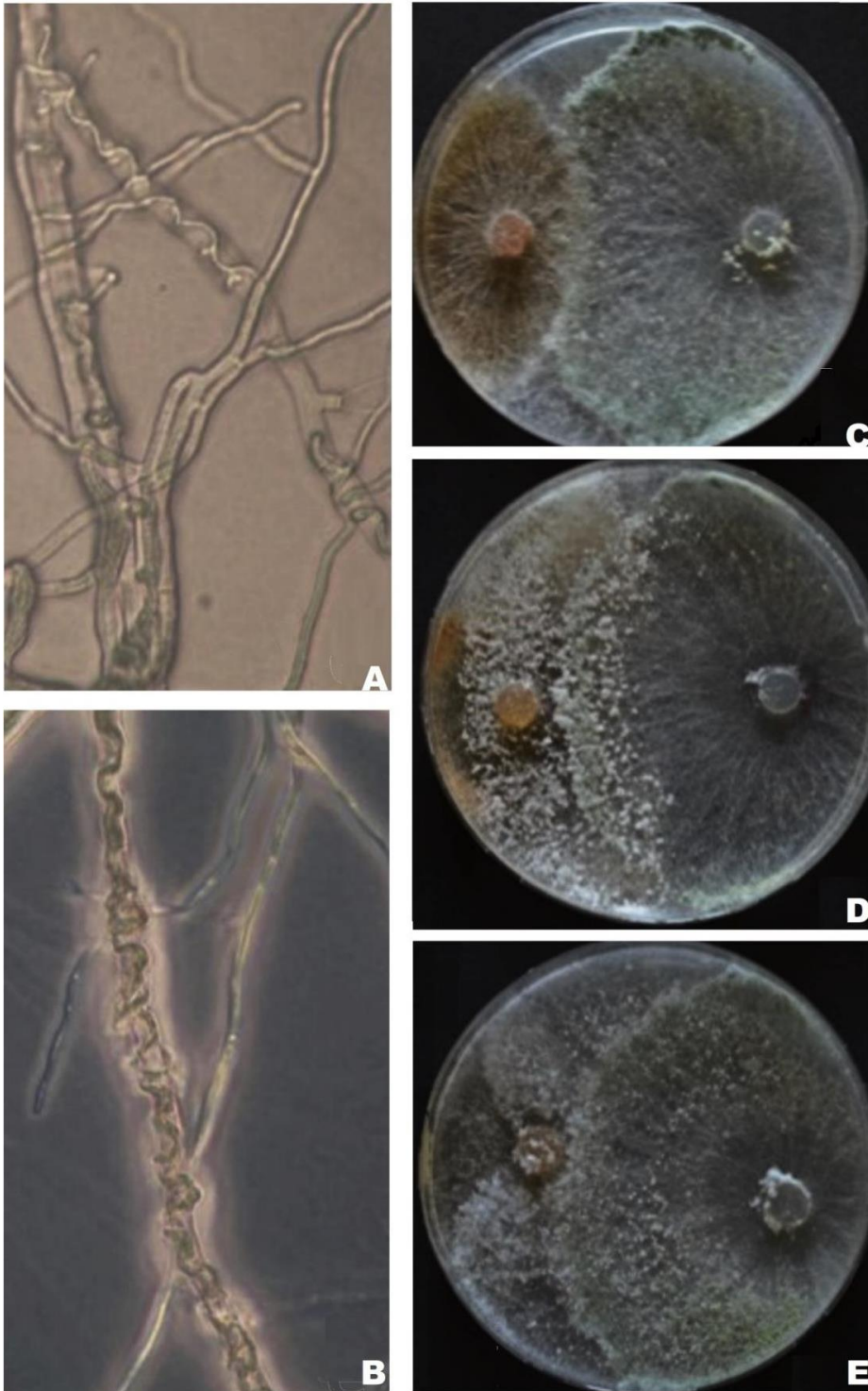
<i>Rhizoctonia</i> AG/ <i>Waitea</i> <i>circinata</i> var.	Kontakt	Potpuno prerastanje	Obmotav anje hifa	Penetracija u hife	Paralelni porast hifa	Pucanje hifa	Promena boje podloge kod kontakta
AG-A	+	+	+	-	+	-	-
	48 h	96 h	72 h		48 h		
AG-G	+	+	-	-	-	-	-
	48 h	96 h					
AG-U	+	+	+	+	+	+	+
	24 h	48 h	48 h	48 h	48 h	48 h	72 h
AG-2-1	+	+	+	+	-	-	+
	24 h	72 h	48 h	48 h			96 h
AG-2-2	+	+	+	+	+	+	+
	24 h	96 h	48 h	48 h	48 h	48 h	72 h
AG-3	+	+	+	-	+	-	+
	48 h	72 h	48 h		48 h		72 h
AG-4 HGI	+	+	+	-	+	-	+
	24 h	72 h	48 h		48 h		72 h
AG-4 HGII	+	+	+	-	-	-	-
	48 h	96 h	96 h				
var. <i>zeae</i>	+	+	-	-	+	-	+
	24 h	48 h			48 h		48 h

Prilikom uparivanja *R. solani* AG-4 HGI i *T. harzianum* u dualnim kulturama, utvrđeno je srednje jako antagonističko delovanje. Do kontakta kolonija došlo je posle 24 h. Nakon 48 h došlo je do promene obojenosti zone kontakta i prerastanja micelije *T. harzianum* preko *R. solani* AG-4 HGI. Nakon 48 h zabeleženo je obmotavanje hifa *T. harzianum* oko hifa *R. solani* AG-4 HGI.

Prilikom uparivanja *R. solani* AG-4 HGII i *T. harzianum* u dualnim kulturama, utvrđeno je prisustvo slabog antagonističkog delovanja. Kolonije gljiva srele su se posle 48 h. Tek nakon 120 h

zabeleženo je obmotavanje hifa *T. harzianum* oko hifa *R. solani* AG-4 HGII i njihov paralelni rast. Moglo se uočiti da ova AG brže raste od izolata *T. harzianum*.

Prilikom uparivanja *W. circinata* var. *zeae* i *T. harzianum* u dualnim kulturama, utvrđeno je prisustvo jakog antagonističkog delovanja. Kolonije gljiva srele su se nakon 24 h. U zoni njihovog kontakta je već nakon 48 sati došlo do promene obojenosti podloge. Prerastanje micelije *T. harzianum* preko *W. circinata* var. *zeae* se moglo uočiti nakon 96 h (Slika 30E).



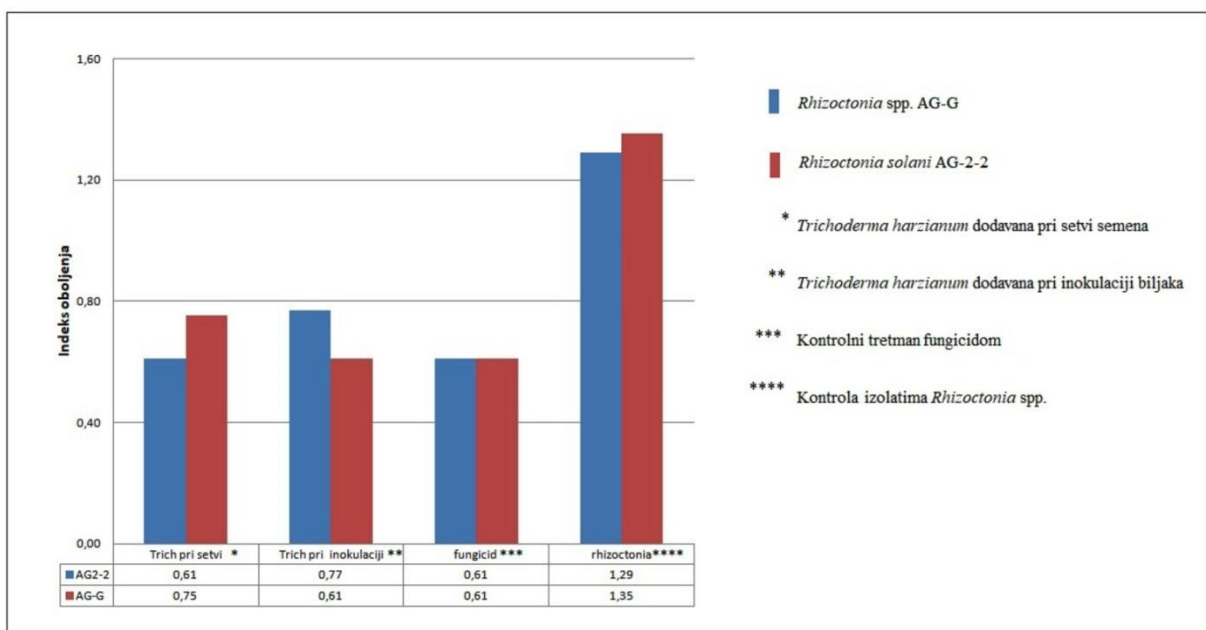
Slika 30. Delovanje izolata 167-17 *Trichoderma harzianum* prema različitim *Rhizoctonia* spp. posle 96 h: A - delimično obmotavanje hifa *T. harzianum* oko hifa *Rhizoctonia* spp.; B - potpuno obmotavanje hifa *T. harzianum* oko hifa *Rhizoctonia* spp.; C - dualna kultura sa dvojedarnom *Rhizoctonia* spp. AG-G; D - dualna kultura sa višejedarnom *Rhizoctonia solani* AG-2-2; E - dualna kultura sa višejedarnom *Waitea circinata* var. *zeae*

5.8.3. *In vivo* efekti delovanja *Trichoderma harzianum* na *Rhizoctonia* spp.

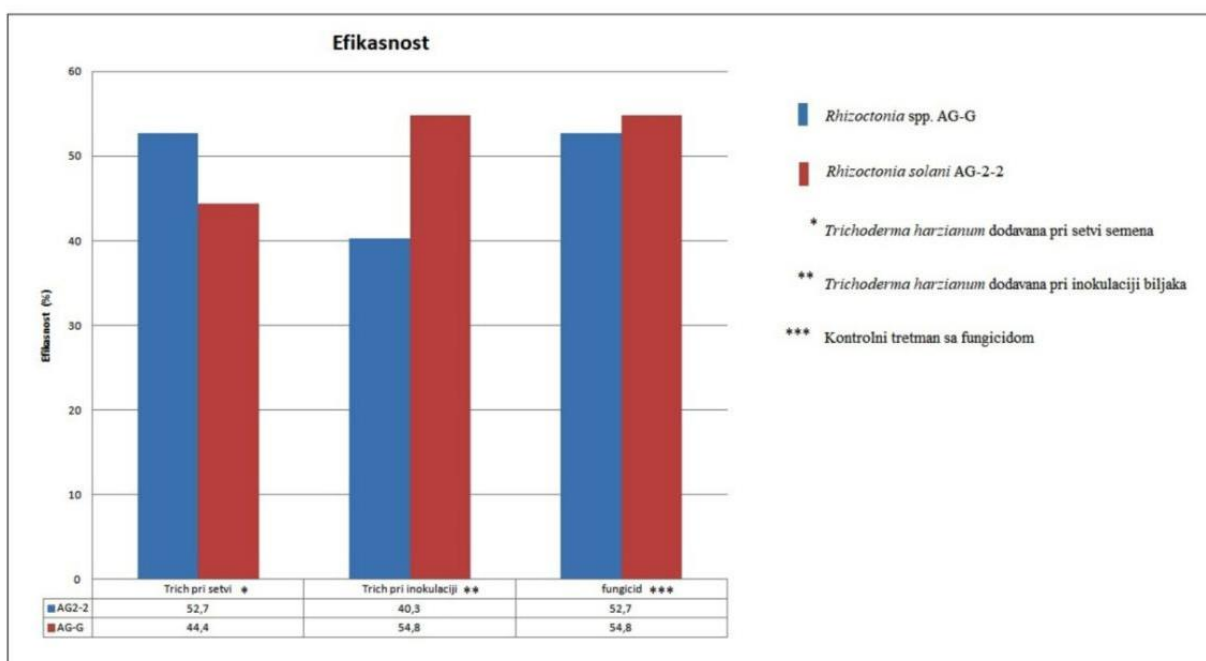
Ispitivanje biološke aktivnosti u uslovima staklenika na biljkama pasulja. Biološka aktivnost izolata *T. harzianum* ispoljena je u uslovima staklenika na sejancima pasulja inokulisanim izolatom 296-17 dvojedarne *Rhizoctonia* spp. AG-G i izolatom 270-15 višejedarne *R. solani* AG-2-2. Antagonistička aktivnost izolata 167-17 *T. harzianum* prema dve različite AG iz Srbije nakon deset dana ogledala se u smanjenju intenziteta nekroze i pojave simptoma u svim tretmanima. Ocenjivanje antagonističke aktivnosti, kao i efikasnosti *T. harzianum*, utvrđeno je na osnovu broja preživelih biljaka, prisustva nekroze korena i poređenjem sa kontrolama. Ispoljena efikasnost određivana je i u odnosu na efikasnost konvencionalnog fungicida tiofanat-metila. Kao pozitivna kontrola korišćene su biljke pasulja inokulisane odabranim izolatima *Rhizoctonia* spp. koje su ispoljile prosečni indeks oboljenja 1,29 (AG-G), odnosno 1,35 (AG-2-2). Ni u jednoj od negativnih kontrola uključujući biljke inokulisane sterilnim semenom ječma, izolatom 167-17 *T. harzianum* prilikom setve ili sedam dana kasnije ili tretirane preporučenom koncentracijom tiofanat-metila nije došlo do razvoja simptoma. Indeks oboljenja u svim negativnim kontrolama iznosio je 0. Rezultati ocene oboljenja izazvanog ispitivanim izolatima *Rhizoctonia* spp. delovanje izolata 167-17 *T. harzianum*, kao i ispoljena efikasnost prikazani su na Grafikonima 4 i 5.

Ispitivani izolat 167-17 *T. harzianum* ispoljio je slabo antagonističko delovanje prema izolatu 296-17 *Rhizoctonia* spp. AG-G u uslovima postavljenog *in vivo* eksperimenta na biljkama pasulja. U oba tretmana izolatom 167-17 *T. harzianum*, pri setvi i sedam dana nakon toga, razvili su se blaži simptomi, a indeks oboljenja je ocenjen prosečnom ocenom 0,61, odnosno 0,75 (Grafikon 4, Slika 31A). Poredeći vreme primene, *T. harzianum* je bila efikasnija u slučaju primene istovremeno sa inokulacijama. Pri odloženoj primeni, sedam dana nakon inokulacija, *T. harzianum* je ispoljila manju efikasnost, ali je ipak delovala na smanjenje indeksa oboljenja u poređenju sa netretiranom kontrolom. U netretiranoj pozitivnoj kontroli, kada su sejanci pasulja inokulisani izolatom 296-17 *Rhizoctonia* spp. AG-G razvila se nekroza korena (Slika 31B), a indeks oboljenja ocenjen je prosečnom ocenom 1,35. Efekat delovanja *T. harzianum* bio je sličan kao efekat tiofanat-metila. Biljke tretirane fungicidom nakon inokulacija izolatom *Rhizoctonia* spp. AG-G, takođe su razvile simptome nekroze korena, a indeks oboljenja ocenjen je prosečnom ocenom 0,61. Na Grafikonu 5 prikazana je efikasnost tretmana izolatom *T. harzianum* u oba vremena primene i poređenje sa tiofanat-metilom, gde je uočljivo da je *T. harzianum* ispoljila efikasnost delovanja na izolat *Rhizoctonia* spp. AG-G.

Ispitivani izolat 167-17 *T. harzianum* ispoljio je izuzetno jako antagonističko delovanje prema izolatu 270-15 *R. solani* AG-2-2 u uslovima postavljenog *in vivo* eksperimenta na biljkama pasulja. U oba tretmana izolatom 167-17 *T. harzianum*, pri setvi i sedam dana nakon toga, razvili su se blaži simptomi, a indeks oboljenja je ocenjen prosečnom ocenom 0,61, odnosno 0,77 (Grafikon 4, Slika 31C). Poredeći vreme primene *T. harzianum*, efikasnija je bila primena sedam dana nakon inokulacija. Primena *T. harzianum* prilikom setve bila je slabije efikasna, ali je ipak delovala na smanjenje indeksa oboljenja u poređenju sa netretiranom kontrolom. U netretiranoj pozitivnoj kontroli, kada su sejanci pasulja inokulisani izolatom 270-15 *R. solani* AG-2-2 razvila se nekroza korena (Slika 31D), a indeks oboljenja ocenjen je prosečnom ocenom 1,29. Delovanje *T. harzianum* bilo je slično kao delovanje fungicida, koji je uključen kao standard. Biljke tretirane fungicidom nakon inokulacija izolatom *Rhizoctonia* spp. AG-G, takođe su razvile simptome nekroze korena, a indeks oboljenja ocenjen je prosečnom ocenom 0,61. Na Grafikonu 5 prikazana je efikasnost u oba vremena primene izolata *T. harzianum* i poređenjem sa efikasnošću fungicida uočljivo je da je *T. harzianum* ispoljila sličnu efikasnost delovanja na izolat *R. solani* AG-2-2, naročito ukoliko je primenjena u momentu inokulacije.



Grafikon 4. Indeks oboljenja na biljkama pasulja inokulisanih dvojedarnom *Rhizoctonia* spp. AG-G i višejedarnom *R. solani* AG-2-2 nakon tretmana izolatom 167-17 *Trichoderma harzianum* i tiofanat-metilom



Grafikon 5. Efikasnost delovanja izolata 167-17 *Trichoderma harzianum* na dvojedarnu *Rhizoctonia* spp. AG-G i višejedarnu *R. solani* AG-2-2 i poređenje sa efikasnošću delovanja tiofanat-metila na biljkama pasulja

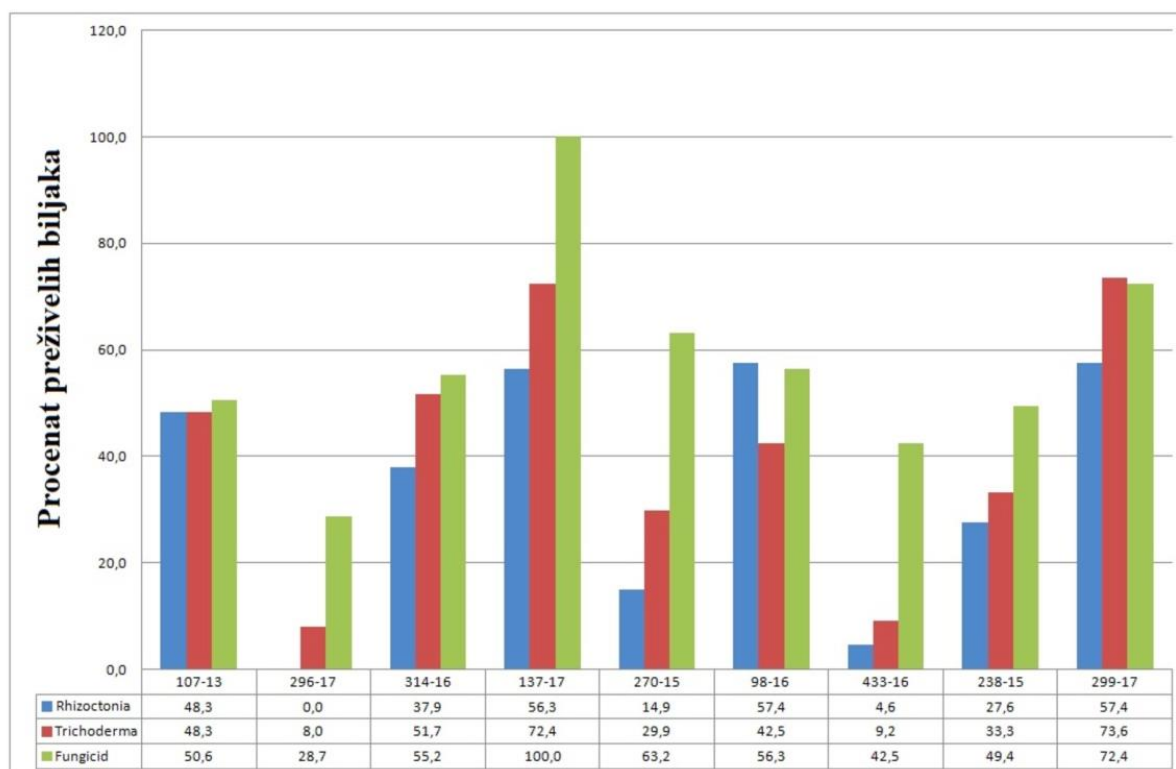


Slika 31. Intenzitet nekroze korena veštački inokulisanih biljaka pasulja: A - *Rhizoctonia* spp. AG-G + *Trichoderma harzianum* izolat 167-17, tretman pri setvi; B - *Rhizoctonia* spp. AG-G netretirana kontrola; C - *Rhizoctonia solani* AG-2-2 + *T. harzianum* izolat 167-17, tretman pri setvi; D - *Rhizoctonia solani* AG-2-2 netretirana kontrola

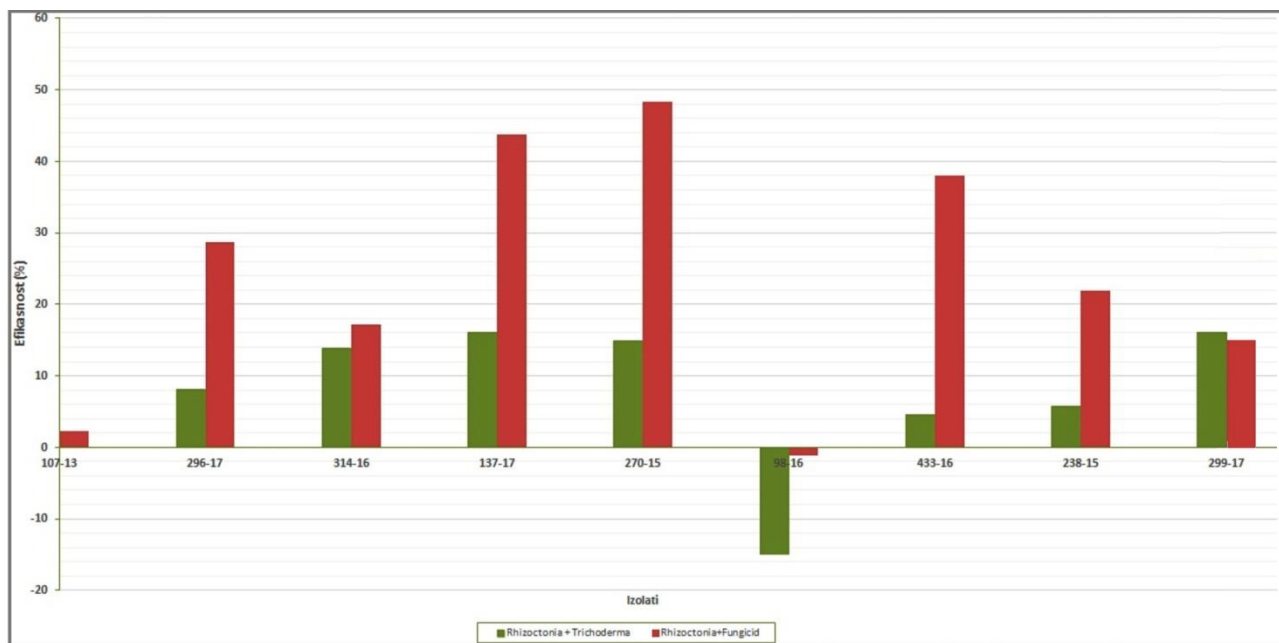
Ispitivanje biološke aktivnosti na biljkama mrkve u uslovima staklenika. Izolat 167-17 *T. harzianum* ispoljio je različitu antagonističku aktivnost prema ispitivanim AG *Rhizoctonia* spp. (*Rhizoctonia* spp. AG-A, AG-G, AG-U, *R. solani* AG-2-1, AG-2-2, AG-3, AG-4 HGI, AG-4 HGII i *W. circinata* var. *zeae*) što je ocenjeno na osnovu broja izniklih biljaka mrkve u odnosu na odgovarajuće kontrole. U Tabeli 22 dat je pregled vrednosti prosečnog broja izniklih biljaka mrkve u različitim tretmanima i kontrolama. Kod većine različitih *Rhizoctonia* sp. AG tretman izolatom 167-17 *T. harzianum* smanjio je efekat *Rhizoctonia* spp. na klijanje i nicanje semena (Grafikon 6) (Slika 33). U poređenju sa vrednostima koje su dobijene u odgovarajućim tretmanima hemijskim fungicidom, uočljiva je bolja klijavost i izraženija efikasnost u poređenju sa delovanjem *T. harzianum*. Inokulacije ispitivanim izolatima *Rhizoctonia* sp. u netretiranim kontrolama ukazale su na različitu agresivnost, tako da je u zavisnosti od izolata zabeleženo smanjenje nicanja od 0% (*Rhizoctonia* spp. AG-G) do 57,4% (*R. solani* AG-3; *W. circinata* var. *zeae*). Tretman izolatom *T. harzianum* doveo je do smanjenja broja uginulih biljaka, tako da je zabeleženo nicanje od 8,0% (*Rhizoctonia* spp. AG-G) do 73,6% (*W. circinata* var. *zeae*). Mada prilikom kontrolnog tretmana samo izolatom *T. harzianum* nisu zabeleženi negativni efekti na nicanje, pri inokulaciji izolatom *R. solani* AG-3 zabeležen je negativni efekat kako tretmana izolatom *T. harzianum* (nicanje smanjeno sa 57,4 na 42,5%), tako i tretmana fungicidom (nicanje smanjeno sa 57,4% na 56,3%). U uslovima postavljenog eksperimenta, izolat 167-17 *T. harzianum* ispoljio je slab potencijal za korišćenje u kontroli bolesti. U zavisnosti od AG, efikasnost *T. harzianum* kretala se od 0% (*Rhizoctonia* spp. AG-A) do 16,10% (*W. circinata* var. *zeae*). Međutim, efikasnost fungicida takođe nije bila zadovoljavajuća, a u zavisnosti od AG kretala se od 2,28 (kod *Rhizoctonia* spp. AG-A) do 48,28% (kod *R. solani* AG-2-2). Efikasnost *T. harzianum* je očekivano bila niža u poređenju sa fungicidom, sem u slučaju inokulacija izolatom *W. circinata* var. *zeae* koja je bila viša u odnosu na efikasnost fungicida, odnosno moglo se uočiti poboljšanje delovanja od 16,10% u poređenju sa tretmanom samo izolatom *W. circinata* var. *zeae* (Grafikon 7) (Tabela 22). *T. harzianum* je ispoljila višu efikasnost, odnosno poboljšanje u poređenju tretmana i kontrola tretiranih samo *Rhizoctonia* spp. AG-A i AG-U, kao i *R. solani* AG-2-1. Izuzetak je kod *R. solani* AG-3, gde nije zabeleženo poboljšanje. Razlika između delovanja tretmana i pozitivnih kontrola bila je statistički značajna ($p < 0,01$).

Tabela 22. Prosečan broj izniklih sejanaca mrkve i efikasnost delovanja izolata *Trichoderma harzianum* na različite dvojedarne višejedarne *Rhizoctonia* spp. i *Waitea circinata* var. *zeae* u uslovima staklenika 28 dana od inokulacije

<i>Rhizoctonia</i> AG/ <i>Waitea circinata</i> var.	Izolot	<i>Rhizoctonia</i> spp.: broj biljaka (%)	<i>Rhizoctonia</i> + <i>Trichoderma</i> : broj biljaka (%)	<i>Rhizoctonia</i> +Fungicid: broj biljaka (%)	Efikasnost <i>Trichoderma</i> %	Efikasnost fungicida %
AG-A	107-13	14,00 (48,3)	14,00 (48,3)	14,66 (50,6)	0,00	2,28
AG-G	296-17	0,00 (0,0)	2,33 (8,0)	8,33 (28,7)	8,03	28,72
AG-U	314-16	11,00 (37,9)	15,00 (51,7)	16,00 (55,2)	13,79	17,24
AG-2-1	137-17	16,33 (56,3)	21,00 (72,4)	30,00 (100)	16,10	43,69
AG-2-2	270-15	4,33 (14,9)	8,66 (29,9)	18,33 (63,2)	14,93	48,28
AG-3	98-16	16,66 (57,4)	12,33 (42,5)	16,33 (56,3)	-14,93	-1,14
AG-4 HGI	433-16	1,33 (4,6)	2,66 (9,2)	12,33 (42,5)	4,59	37,93
AG-4 HGII	238-15	8,00 (27,6)	9,66 (33,3)	14,33 (49,4)	5,72	21,83
var. <i>zeae</i>	299-17	16,66 (57,4)	21,33 (73,6)	21,00 (72,4)	16,10	14,97
Kontrola	Sterilna voda	29	/	/	/	/



Grafikon 6. Procenat preživelih sejanaca mrkve nakon inokulacija različitim dvojedarnim i višejedarnim *Rhizoctonia* spp. AG, *Waitea circinata* var. *zeae* i izolatom 167-17 *Trichoderma harzianum* posle 28 dana



Grafikon 7. Efikasnost delovanja izolata 167-17 *Trichoderma harzianum* na različite dvojedarne i višejedarne *Rhizoctonia* spp. AG i *Waitea circinata* var. *zae* na biljkama mrkve posle 28 dana



Slika 33. Veštački inokulisna mrkva i efikasnost delovanja izolata 167-17 *Trichoderma harzianum*: A- sejanci mrkve mesec dana od inokulacije *Rhizoctonia* spp. AG-G (levo), *Rhizoctonia* spp. AG-G + *T. harzianum* (u sredini) i *Rhizoctonia* spp. AG-G + tiofanat-metil (desno); B- sejanci mrkve mesec dana od inokulacije *Rhizoctonia solani* AG-2-2 (levo), *R. solani* AG-2-2 + *T. harzianum* (u sredini) i *R. solani* AG-2-2 + tiofanat-metil (desno)

6. DISKUSIJA

6.1. Pojava i simptomi bolesti izazvanih izolatima *Rhizoctonia* spp. u Srbiji

Kao rezultat višegodišnjih istraživanja u okviru ove disertacije identifikovano je ukupno 11 različitih taksona vrsta iz roda *Rhizoctonia* prouzrokovaca truleži korena biljaka u Srbiji. Potvrđeno je prisustvo dvojedarnih *Rhizoctonia* spp. AG-A, AG-F, AG-G, AG-U, višejedarnih *R. solani* AG-2-1, AG-2-2, AG-3, AG-4 HGI, AG-4 HGII, AG-6 i *W. circinata* var. *zeae*. Od navedenih AG u Srbiji su do ovih istraživanja bile opisane *Rhizoctonia* spp. AG-A, kao i *R. solani* AG-2-2, AG-3, i AG-4 HGII (Vico, 1997; Stojšin et al., 2007; Rekanović i sar., 2015). Kao prouzrokovaci truleži biljaka u Srbiji prvi put su opisane *Rhizoctonia* spp. AG-G, AG-F, AG-U, *R. solani* AG-2-1, AG-4 HGI, AG-4 HGII (na jabuci), AG-6 i *W. circinata* var. *zeae*. Među njima, pojava *Rhizoctonia* spp. AG-G na trešnji, AG-U na *Poa* sp., *R. solani* AG-4 HGI na mrkvi i paprici, AG-4 HGII na jabuci, AG-6 na malini i *W. circinata* var. *zeae* na kupusu i uljanoj repici predstavljaju prve zabeležene slučajeve u svetu. Najrasprostranjenije i najznačajnije bile su *R. solani* AG-3 na krompiru, i AG-4 HGI i *Rhizoctonia* spp. AG-G na raznim domaćinima.

Sve zaražene biljke domaćini ispoljavale su raznovrsne simptome bolesti korena i nadzemnih delova, kako sejanaca, tako i odraslih biljaka. Simptomi su se razlikovali u zavisnosti od starosti, vrste biljke i faze razvoja oboljenja. Najčešće su se javljali u zoni korenovog vrata, u vidu nekroze različitog intenziteta. Drugi najčešći simptom bila je trulež korena, a potom i trulež celih biljaka. U okviru zaraženog tkiva često su bile prisutne sklerocije. Identifikacija prouzrokovaca na osnovu uočenih simptoma nije bila moguća, jer slične simptome može da prouzrokuje više vrsta gljiva i pseudogljiva koje se održavaju u zemljištu.

Rhizoctonia spp. AG-A. Pojava truleži korena jagode koju prouzrokuje *Rhizoctonia* spp. AG-A u toku ovog istraživanja zabeležena je na pet sorti jagode na pet lokaliteta. Simptomi su se uglavnom odnosili na sušenje biljaka i nekrozu na poprečnom preseku korenovog vrata, kao i nekrozu korenovog sistema. Učestalost bolesti razlikovala se u zasadima, ali je srednja vrednost procenjena na 27,5%. U Srbiji su na jagodi detektovane AG-A i AG-I (Vico, 1992; 1994a; 1994b; 1997) primenom konvencionalne i serološke identifikacije, dok je ovom radu *Rhizoctonia* spp. AG-A dodatno okarakterisana na osnovu bioloških i molekularnih osobina. U Evropi postoji ograničen broj studija o identifikaciji, štetnosti i rasprostranjenosti *Rhizoctonia* spp. AG-A. Manici and Bonora (2007) detektovali su u Italiji *Rhizoctonia* spp. AG-A i AG-G, kao prouzrokovace truleži korena jagode i to su *Rhizoctonia* spp. AG-A detektovali u južnom, a *Rhizoctonia* spp. AG-G u severnom delu zemlje. U svetu postoje brojna istraživanja koja govore o prevalentnosti ove AG na jagodi u poređenju sa drugim AG. U SAD (Martin, 2000), u Južnoj Africi (Botha et al., 2003) i u Izraelu (Sharon et al., 2007), *Rhizoctonia* spp. AG-A navodi se kao najznačajnija i najučestalija AG na jagodi. Kako je našoj zemlji *Rhizoctonia* spp. AG-A detektovana na pet lokaliteta i na pet trenutno najčešće gajenih sorti, po svemu sudeći predstavlja značajan problem u proizvodnji jagode. Sličan nivo zaraze javljao se i u mlađim i u starijim zasadima. Istraživanja Martin (1988) ukazuju da se virulentnost AG na jagodi razlikuje u zavisnosti od temperature. *Rhizoctonia* spp. AG-I bila je češća i virulentnija na temperaturi od 15°C, dok je na višim temperaturama zastupljenija bila *Rhizoctonia* spp. AG-A. Globalno otopljavanje i rast prosečnih temperatura, moguće je objašnjenje prevalentnosti *Rhizoctonia* spp. AG-A u našoj zemlji u poređenju sa situacijom iz sredine 1990-tih godina.

Rhizoctonia spp. AG-G. Pojava truleži korena koju prouzrokuje *Rhizoctonia* spp. AG-G detektovana je na trešnji i na dve povrtarske biljke, paradajzu i pasulju. Simptomi bolesti bili su u vidu sušenja listova, nekroze i truleži korena sa vidljivom nekrozom na poprečnom preseku, što se završavalo sušenjem celih biljaka. U isto vreme ovo je i prvi nalaz *Rhizoctonia* spp. AG-G na trešnji u svetu. U Mađarskoj je na trešnji detektovana *Rhizoctonia* spp., kao endofit na korenu, ali nema

detalja o pripadnosti AG (**Haddadrafshi et al.**, 2011). U Tunisu, na podlozi za kalemljenje *Prunus amygdalus* × *Prunus persica* detektovana je *R. solani* AG-1 IC, koja je prouzrokovala trulež nadzemnog i podzemnog dela mladih biljaka (**Jemai et al.**, 2019). U toku ovih istraživanja u Srbiji je prvi put detektovana *Rhizoctonia* spp. AG-G na paradajzu i proučavane su njene morfološke, biološke i molekularne osobine. Simptomi koje je ova AG prouzrokovala na paradajzu bili su u vidu sušenja u nivou korenovog vrata i nekroze na poprečnom preseku korena, praćeno sušenjem i propadanjem biljaka. U Turskoj je AG-G opisana kao patogen paradajza (**Demirci and Döken**, 1995), kao i dvojedarna *Rhizoctonia* spp. AG-A i AG-K (**Eken and Tuncer**, 2019). U svetu na paradajzu značajan problem predstavljaju i višejedarne *R. solani*, među kojima se izdvajaju AG-3, AG-2-1, AG-2-2, AG-4 HGI, AG-5 (**Yildiz and Doken**, 2002; **Misawa and Kuninaga**, 2010; **Gondal et al.**, 2019). Navedene AG izazivaju nekrozu i trulež nadzemnog i podzemnog dela, kako mladih tako i starijih biljaka. U Turskoj je *Rhizoctonia* spp. AG-G opisana kao značajan patogen paprike (**Tuncer and Eken**, 2013), koje se u našoj zemlji često smenjuju u plodoredu, zbog čega može imati dodatni značaj za proizvodnju. Ovaj rad predstavlja i prvi nalaz *Rhizoctonia* spp. AG-G na pasulju u Srbiji. Simptomi na pasulju bili su vidu truleži korena biljaka i mestimične nekroze korenovih žila. Na pasulju *Rhizoctonia* spp. AG-G opisana je u Turskoj, gde je nanela značajne štete i propadanje velikog broja biljaka (**Eken and Demirci**, 2004). Vrste roda *Rhizoctonia* na pasulju predstavljaju ozbiljan problem u proizvodnji, naročito u ranim fazama razvoja biljaka. U svetu su na pasulju pored *Rhizoctonia* spp. AG-G, zabeležene i druge AG: *Rhizoctonia* spp. AG-A, AG-E, AG-F, AG-I, AG-K, kao i *R. solani* AG-1, AG-2-1, AG-2-2, AG-4, AG-5 (**Sumner**, 1985; **Bolkan and Ribeiro**, 1985; **Ogoshi**, 1987; **Demirci and Döken**, 1995). *Rhizoctonia* spp. AG-G je u svetu opisana kao polifagna AG (**Yang et al.**, 2015b), što objašnjava situaciju u Srbiji, gde je detektovana na tri domaćina.

Rhizoctonia spp. AG-F. Tokom 2018. godine na jednom lokalitetu, detektovana *Rhizoctonia* spp. AG-F na paprici u Srbiji. Prouzrokovala je simptome u vidu sušenja biljaka, nekroze korena i mestimične nekroze bočnih žila. U Turskoj je *Rhizoctonia* spp. AG-F detektovana na paprici, a simptomi su bili u vidu sušenja i truleži biljaka (**Demirci and Döken**, 1995). U Turskoj je AG-F detektovana i na pasulju (**Eken and Demirci**, 2004) i duvanu (**Gurkanli and Ozkoc**, 2011), ukazujući na sklonost ka povrtarskim biljkama. Vrste roda *Rhizoctonia* na paprici predstavljaju veoma ozbiljan problem, a do sada su detektovane brojne AG na ovoj biljci: *Rhizoctonia* spp. AG-A i AG-F i *R. solani* AG-1, AG-2-1, AG-3, AG-4 i AG-8 (**Eken and Demirci**, 2004).

Rhizoctonia spp. AG-U. Na jabuci u toku 2016. godine u Srbiji je prvi put detektovana *Rhizoctonia* spp. AG-U. Tokom 2020. godine ova AG detektovana je na *Poa* sp. što je prvi nalaz u Srbiji, ali i u svetu. Simptomi na jabuci uglavnom su u vidu paleži listova i mestimične nekroze korenovih žila a sa razvojem bolesti dolazilo je do propadanje glavnog korena jabuke. *Rhizoctonia* spp. AG-U detektovana je do sada na svega nekoliko domaćina u svetu, pre svega na ukrasnim biljkama u Japanu i južnom delu SAD (**Hyakumanchi et al.**, 2005; **Rinehart et al.**, 2007; **Misawa and Toda**, 2013), luku i mrkvi u Japanu (**Misawa and Toda**, 2013; **Misawa et al.**, 2017), kao i na krompiru u Kini (**Yang et al.**, 2014). Uglavnom je izazivala nekrotične zone na korenovom vratu, propadanje korena i uginuće biljaka. Izolovana je u Italiji iz zemljišta u zasadu jabuke (**Kelderer et al.**, 2012). Na jabuci je do sada detektovano nekoliko AG: *Rhizoctonia* spp. AG-A, AG-G, AG-I, AG-J, AG-Q i *R. solani* AG-5 i AG-6 (**Mazzola**, 1997). Simptomi koje je AG-U prouzrokovala u travnom usevu *Poa* spp. bili su u vidu sušenja biljaka u nepravilno raspoređenim oazama, dok je na pojedinačnim biljkama uočena mestimična nekroza i trulež korena. Na *Poa* sp. do sada je registrovano prisustvo dvojedarne *Rhizoctonia* spp. AG-B i višejedarnih *R. solani* AG-1, AG-2-1, AG-2-2, AG-4, AG-5 i *Waitea* spp. (**Hsiang and Dean**, 2001; **Amaradasa et al.**, 2013).

R. solani AG-2-1. Na paprici je prvi put u Srbiji u toku 2017. godine detektovana *R. solani* AG-2-1. Simptomi su bili u vidu nekroze korena, koja je bila vidljiva i na poprečnom preseku korenovog vrata. Ova AG detektovana je na paprici u Turskoj, gde je prouzrokovala sušenje i trulež biljaka (**Tuncer and Eken**, 2013), što je u potpunoj saglasnosti sa simptomima uočenim u našoj zemlji. Vrste roda *Rhizoctonia* na paprici predstavljaju veoma ozbiljan problem (**Eken and Demirci**,

2004), a bolesti mogu biti izazvane brojnim AG, što potvrđuju i rezultati ovih istraživanja u kojima su potvrđene tri nove AG kao patogeni paprike u Srbiji.

R. solani AG-2-2. Na šećernoj repi u toku 2015. godine *R. solani* AG-2-2 detektovana na dva lokaliteta. Na ovom domaćinu vrste roda *Rhizoctonia* spadaju među najznačajnije prouzrokovaoče bolesti korena, a pored AG-2-2 se u svetu se još navode i *Rhizoctonia* spp. AG-A, AG-E, AG-K i *R. solani* AG-4, AG-5, AG-8 (Strausbaugh et al., 2011; Miles et al., 2013). Najčešće detektovana i najznačajnija je *R. solani* AG-2-2 (Kiewnick et al., 2001; Jacobsen, 2006; Bolton et al., 2010; Abbas et al., 2014). Simptomi koji se pripisuju ovoj AG uglavnom obuhvataju nekrozu i propadanje sejanaca, trulež korena, sa pojavom kružnih nekrotičnih zona na poprečnom preseku korena, praćeno sušenjem listova (Harveson et al., 2009). Važna osobina *R. solani* AG-2-2 je da se može održavati duži niz godina u zemljištu ili u biljnim ostacima u obliku sklerocija ili micelije (Kiewnick et al., 2001; Jacobsen, 2006; Harveson et al., 2009). Uzimajući u obzir štetnost i dugovečnost u zemljištu, kao i sve češću praksu gajenja šećerne repe u monokulturi, mere kontrole bolesti koje izaziva *R. solani* AG-2-2 su ograničene. *R. solani* AG-2-2 je ranije detektovana u Srbiji. U istraživanjima Stojšin et al. (2006) i Vico et al. (2006) navode se podaci o rasprostranjenosti i značaju *R. solani* u našoj zemlji, što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u ovim istraživanjima. Molekularnim analizama dokazano je da su u našoj zemlji na šećernoj repi prisutne *R. solani* AG-4 HGII (Stojšin et al., 2007) i *R. solani* AG-2-2 (Stojšin et al., 2011; Vojvodić et al., 2019a).

R. solani AG-3. U uzorcima krtola merkantilnog krompira na tržištu u našoj zemlji detektovana je *R. solani* AG-3. U brojnim radovima predstavljena je kao najučestalija i najznačajnija AG na krompiru u Evropi i svetu (Campion et al., 2003; Woodhall et al., 2007; Lehtonen et al., 2008; Ferrucho et al., 2012; Muzhinji et al., 2015). U našoj zemlji nema konkretnih podataka o prisustvu *R. solani*, a kao patogen krompira navedena je u nekoliko preglednih radova (Milošević, 2009; Rekanović i sar., 2015). U ovim istraživanjima izolati *R. solani* AG-3 prvi put su morfološki, biološki i molekularno okarakterisani. Simptomi su bili u vidu nekroze i truleži korena, sa pojavom tamnih sklerocija na krtolama krompira. Banville (1989) navodi da *R. solani* AG-3 izaziva 30% gubitaka u proizvodnji krompira, a dodatni problem predstavlja i održavanje patogena na krtolama, što za posledicu ima korišćenje zaraženog sadnog materijala. Pored toga, *R. solani* AG-3 se može održavati i u zemljištu i biljnim ostacima duži niz godina, pomoću sklerocija i micelije. Uzimajući u obzir polifagnost *R. solani* AG-3, koja pored krompira, napada i paradajz i duvan (Kuninaga et al., 2000b; Misawa and Kuninaga, 2010) iz familije Solanaceae, neophodno je obratiti pažnju u kreiranju plodoređa. *R. solani* AG-3 je često bila detektovana u ovim istraživanjima, kao i u svetu (Banville et al., 1996; Woodhall et al., 2008; Ferrucho et al., 2012; Dass et al., 2013), što ukazuje na potrebu za kontrolom zdravstvenog stanja semenskih krtola.

R. solani AG-4 HGI. Na biljkama mrkve, paprike, kupusa i uljane repice *R. solani* AG-4 HGI do sada nije bila zabeležena u Srbiji, takođe do sada ova AG nije bila zabeležena kao patogen mrkve i paprike u svetu. Na mrkvi se javljala nekroza korenovog vrata, što je dovelo do povijanja i lomljenja biljaka. Zaražene biljke su se ubrzo sušile i propadale. Na mrkvi je u Japanu kao prouzrokovaoč crne truleži korena detektovana *Rhizoctonia* spp. AG-U (Misawa and Toda, 2013) i *R. solani* AG-4 HGII, koja je prouzrokovala propadanje sejanaca (Yonemoto et al., 2008). Sumner et al. (2003b) su u Džordžiji na mrkvi detektovali *R. solani* AG-2-4, dok su Kurt et al. (2005) u Turskoj opisali vrstu *Rhizoctonia carotae*, kao prouzrokovaoča nekroze krune mrkve i nekrotičnih lezija na korenu, ne objašnjavajući njenu vezu sa ostalim opisanim AG. Na paprici je *R. solani* AG-4 HGI izazvala simptome sušenja listova i nekrotične pege u zoni korenovog vrata, koje su često dovodile do suženja tkiva i lomljenja biljaka. U Turskoj je *R. solani* AG-4 opisana kao patogen paprike (Demirci and Döken, 1995; Tuncer and Eken, 2013) bez detalja o intraspecijskoj pripadnosti, dok su u Iraku kao prouzrokovaoče truleži korena paprike Kareem and Hassan (2013) detektovali *R. solani* AG-4 HGIII i *Rhizoctonia* spp. AG-5. U literaturi je *R. solani* AG-4 HGI opisana kao značajan patogen biljaka iz familije Solanaceae, uključujući krompir (Anguiz and Martin, 1988; Muzhinji et al., 2015) i paradajz (Kuramae et al., 2003; Taheri and Pourmahdi, 2013). Do ovih istraživanja *R. solani* AG-4 HGI nije bila poznata kao patogen kupusa ni uljane

repice u Srbiji. Na kupusu u našoj zemlji izazvala je pojavu nekroze u nivou korenovog vrata i propadanje korena, dok je ranije opisana u Kini kao značajan patogen kupusa, izazivajući trulež glavice (Yang et al., 2006b; Ireland et al., 2015). Na kupusu i srodnim varijetetima opisane su brojne AG uključujući *R. solani* AG-1 IA, AG-1 IB, AG-1 IC, AG-2-1 AG-2-IIIB, AG-2-2IV, AG-3, AG-4 HGII, AG-4 HGIII, AG-5, AG-7, kao i *Rhizoctonia* spp. AG-A (Abawi and Martin, 1985; Keinath and Farnham, 1997; Kubota and Abiko, 1997; Sayama, 2000; Kuramae et al., 2003; Yang et al., 2006b; Ohkura et al., 2009; Pannecouque and Höfte, 2009; Budge et al., 2009b; Kubota et al., 2009; Hua et al., 2014; Ireland et al., 2015; Misawa et al., 2015; Misawa and Aoki, 2017). Na uljanoj repici *R. solani* AG-4 HGI je prouzrokovala pojavu nekrotičnih zona i suženja u nivou korenovog vrata. Kataria and Verma (1992) su na uljanoj repici detektovali AG-4, ali bez podataka o kojoj intraspecijskoj grupi je reč. Na uljanoj repici su do sada detektovane *R. solani* AG-2-1, AG-2-2, AG-10, AG-4, AG-5, AG-8, AG-9, AG-10, kao i *Rhizoctonia* spp. AG-K (Yang et al., 1996; Khangura et al., 1999; Paulitz et al., 2006; Schroeder and Paulitz, 2012; Broders et al., 2014; Zhou et al., 2014; Hannukkala et al., 2016).

R. solani AG-4 HGII. Na biljkama jabuke u toku 2015. godine po prvi put u Srbiji detektovana je *R. solani* AG-4 HGII. Zaražene biljke ispoljavale su simptome ljuštenja kore stabla, truleži korena i nekroze sprovodnih sudova u zoni korenovog vrata. Nakon određenog vremena kod takvih sadnica dolazilo je do sušenja. Ovaj rezultat predstavlja i prvi nalaz *R. solani* AG-4 HGII na jabuci u svetu. Ranije u tekstu, kod opisa nalaza dvojedarne *Rhizoctonia* spp. AG-U takođe na jabuci u Srbiji, navedeno je koje su sve AG opisane kao patogene za jabuku (Mazzola, 1997). Među njima nije navedena ni jedna od podgrupa AG-4. Polifagna *R. solani* AG-4 HGII opisana je kao značajan patogen uljane repice u Velikoj Britaniji (Budge et al., 2009b), luka u Japanu (Misawa et al., 2017), pasulja i tikava u Turskoj (Cebi Kilicoglu and Ozkoc, 2013; Erper et al., 2016), paradajza u Iranu (Taheri and Pourmahdi, 2013), ječma i deteline u Južnoafričkoj Republici (Tewoldemedhin et al., 2006) i krompira u Kini (Yang and Wu, 2013).

R. solani AG-6. Na biljkama maline u toku 2018. godine detektovana je *R. solani* AG-6, što je prvi nalaz u Srbiji i svetu. Zaražene biljke ispoljavale su simptome na korenu, u vidu truleži korena, ljuštenja kore i ogoljavanja korena, što je na kraju dovelo do sušenja biljaka. Vrste roda *Rhizoctonia* opisane su odavno kao patogeni korena maline (Berkeley, 1936), pre svega kao deo kompleksa prouzrokovala truleži korena. U još nekoliko radova vrste roda *Rhizoctonia* navode se kao patogeni maline (Hoashi-Erhardt et al., 2008), ali bez karakterizacije do nivoa AG. Woodhall et al. (2019) detektovali su *R. solani* AG-E na malini u državi Ajdaho (SAD), gde je prouzrokovala hlorozu listova, smanjen porast kao posledicu zaraze stabla sa vidljivom nekrozom na poprečnom preseku. *R. solani* AG-6 je u literaturi opisana kao patogen ukrasnih biljaka u Australiji (Pope and Carter, 2001), jabuke u Americi (Mazzola, 1997), paprike u Turskoj (Tuncer and Eken, 2013) i lucerke u Australiji (Anderson et al., 2004).

W. circinata var. *zeae*. U toku ovih istraživanja prvi put u Srbiji i u svetu zabeležene su zaraze kupusa i uljane repice. Na kupusu je registrovana trulež korena i sušenje biljaka, a na uljanoj repici pojava hloroze, sušenja i propadanja biljaka. Ranije u tekstu kod analize pojave *R. solani* AG-4 HGI navedene su AG *Rhizoctonia* spp. do sada opisane kao patogeni kupusa i uljane repice i one ne uključuju ni jedan od pet opisanih varijeteta *W. circinata*. Zaraza kupusa i uljane repice gljivom *W. circinata* var. *zeae* prva je prirodna zaraza neke biljke iz familije Brassicaceae ovim patogenom detektovana u svetu. *W. circinata* var. *zeae* je po svom krugu domaćina pre svega usmerena na monokotiledone domaćine, a u svetu postoji svega nekoliko navoda o prirodnim zarazama dikotiledonih familija i to iz familija Fabaceae (Erper et al., 2005, 2011; Ohkura et al., 2009; Sharma-Poudyal et al., 2015; Tewoldemedhin et al., 2015), Apiaceae i Chenopodiaceae (Kuznia and Windels, 1994; Ohkura et al., 2009; Zhao et al., 2019a). U Evropi je *W. circinata* var. *zeae* do ovih istraživanja detektovana samo jednom i to u Mađarskoj na monokotiledonim *Festuca* spp. (Vajna and Oros, 2005).

6.2. Patogenost ispitivanih izolata *Rhizoctonia* spp.

Svih 26 odabranih izolata *Rhizoctonia* spp., po jedan ili nekoliko izolata od svake AG i sa svakog domaćina ispoljili su patogenost na odgovarajućim biljkama sa kojih su izolovani. U različitim testovima patogenosti prouzrokovali su pojavu simptoma koji su odgovarali prirodnim zarazama. Nakon pojave simptoma je urađena reizolacija čime su zadovoljeni Koch-ovi postulati i dokazano je da su prouzrokovali bolesti većeg broja biljaka domaćina u Srbiji.

Sva četiri ispitivana izolata *Rhizoctonia* spp. AG-A prouzrokovali su iste simptome na inokulisanim živićima jagode. Uočena je nekroza na korenu, ali nije dolazilo do uginuća biljaka, što odgovara opisu patogenosti italijanskih izolata u istraživanjima **Manici and Bonora** (2007). Izolati *Rhizoctonia* spp. AG-A u svetu opisani su kao grupa koja obuhvata izolate različite virulentnosti, od slabo do izraženo patogenih (**Botha et al.**, 2003; **Manici and Bonora**, 2007; **Sharon et al.**, 2007; **Fang et al.**, 2013), a pominju se i mikorizni predstavnici (**Sneh et al.**, 1996; **Mazzola**, 1997). Najčešće korišćen test za proveru patogenosti jeste upravo inokulacija živića jagoda, jer najviše odgovara prirodnim zarazama. U ovim istraživanjima ovaj test patogenosti bio je uspešan, mada je dugo trajao. **Sharon et al.** (2007) navode da inokulacijom živića jagode nisu uspeli da dokažu patogenost izolata iz jagode, koji su u prirodnim zarazama prouzrokovali značajne probleme u Izraelu.

Sva tri ispitivana izolata *Rhizoctonia* spp. AG-G ispoljili su patogenost u dve odvojene metode, zavisno od biljke domaćina. Izolat sa trešnje ispoljio je patogenost na liskama i lisnim peteljka trešnje. O vrstama roda *Rhizoctonia* na trešnji i uopšte na rodu *Prunus* u svetu postoje svega dva navoda. Međutim, **Haddadrafshi et al.** (2011) ne navode metodu provere patogenosti, dok su **Jemaji et al.** (2019) patogenost izolata *R. solani* AG-1 IC poreklom sa sadnica *Prunus amygdalus* × *Prunus persica* potvrdili na sadnicama, a izolati su prouzrokovali nekrotične lezije na stablu. U Vašingtonu i Italiji, AG-G je detektovana kao patogen jabuke, a patogenost je potvrđena na sadnicama jabuke (**Mazzola**, 1997; **Kelderer et al.**, 2012). Patogenost izolata sa paradajza i pasulja, u okviru ovih istraživanja, potvrđena je na inokulisanim sejancima. Izolat *Rhizoctonia* spp. AG-G iz Srbije poreklom sa paradajza izazvao je nekrozu korenovog vrata i korena na sejancima paradajza. Do ovih istraživanja *Rhizoctonia* spp. AG-G opisana je na paradajzu samo u Turskoj (**Demirci and Döken**, 1995), ali nema podataka o načinu provere patogenosti izolata. Na paradajzu su u svetu opisane brojne druge AG, među kojima *Rhizoctonia* spp. AG-A i AG-K, kao i *R. solani* AG-1, AG-2-1, AG-2-2, AG-4 HGI i AG-5. **Eken and Tuncer** (2019) su poredili virulentnost izolata na paradajzu i utvrdili da su višejedarne vrste AG-2-1 i AG-4 virulentnije od dvojedarnih AG-A i AG-K. Izolat *Rhizoctonia* AG-G iz Srbije sa pasulja izazvao je nekrozu korenovog vrata i žilica na korenu na sejancima iste biljke. Ova AG opisana je na pasulju u Turskoj (**Eken and Demirci**, 2004), gde je u testovima patogenosti ispoljila slabu patogenost na sejancima pasulja. Na pasulju su još opisane *R. solani* AG-1 IB, AG-2-1, AG-2-2, AG-5, kao i *Rhizoctonia* spp. AG-A, AG-G, AG-E, AG-I, AG-K, a ako najvirulentnija navodi se AG-4 (**Sumner**, 1985; **Ogoshi**, 1987; **Demirci and Döken**, 1995).

Odabrani izolat *Rhizoctonia* spp. AG-F ispoljio je patogenost na sejancima paprike, gde je izazvao nekrozu korenovog vrata i korena. Slične rezultate u svojim istraživanjima na izolatima iz Turske dobili su i **Demirci and Döken** (1995) čiji rad predstavlja jedini nalaz ove AG na paprici u svetu. **Tuncer and Eken** (2013) opisali su druge dvojedarne *Rhizoctonia* spp. AG-A, AG-G i AG-K kao slabo patogene ili nepatogene za papriku.

Dva ispitivana izolata *Rhizoctonia* spp. AG-U ispoljila su patogenost u dve odvojene metode u zavisnosti od biljke domaćina. Izolat *Rhizoctonia* spp. AG-U sa jabuke je na sejancima jabuke izazvao nekrozu korenovog vrata i korena, kao i nekrotične pege na listovima i mestimičnu nekrozu na lisnim peteljka. *Rhizoctonia* spp. AG-U nije do sada opisana na jabuci, osim što je u Italiji izolovana iz zemljišta u zasadu jabuke (**Kelderer et al.**, 2012). U svom istraživanju prisustva višejedarnih i dvojedarnih vrsta roda *Rhizoctonia* na korenu jabuke **Mazzola** (1997) je dvojedarne

Rhizoctonia spp. AG-A, AG-G, AG-I, AG-J i AG-Q okarakterisao kao vrlo virulentne, jer su na korenu sadnica jabuke prouzrokovale intenzivnu trulež. Izolat *Rhizoctonia* spp. AG-U iz Srbije poreklom sa *Poa* sp. ispoljio je patogenost i izazvao mestimičnu nekrozu korenovih žilica i listova na sejancima. *Rhizoctonia* sp. AG-U detektovana je na svega nekoliko dikotiledonih domaćina, tako da ovaj nalaz predstavlja prvi nalaz na monokotiledonim domaćinima u svetu.

Odabrani izolat *R. solani* AG-2-1 iz Srbije poreklom sa paprike izazvao je nekrozu korenovog vrata i korena na sejancima paprike. Slične rezultate u svojim istraživanjima na izolatima iz Turske dobili su **Tuncer and Eken** (2013) koji su izolate *R. solani* AG-2-1 na paprici opisali kao vrlo virulentne.

Dva ispitivana izolata *R. solani* AG-2-2 ispoljila su patogenost na sejancima šećerne repe, izazivajući nekrozu korena. Dobijeni rezultati u saglasnosti su sa ranije objavljenim da se AG-2-2 na šećernoj repi opisuje kao veoma virulentna (**Carling et al.**, 2002a; **Bolton et al.**, 2010).

Sva četiri ispitivana izolata *R. solani* AG-3 ispoljili su patogenost na biljkama krompira. Ispitivani izolati izazvali su mestimičnu nekrozu korenovih žila i prizemnog dela stabla krompira. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa ranijim opisom virulentnosti AG-3 na krompiru (**Lehtonen et al.**, 2008; **Woodhall et al.**, 2008; **Dass**, 2013).

Svih šest ispitivanih izolata *R. solani* AG-4 HGI iz Srbije poreklom sa mrkve, paprike, kupusa i uljane repice ispoljili su patogenost na sejancima biljaka domaćina sa kojih su izolovani. Ispitivani izolat sa paprike izazvao je nekrozu korenovog vrata i korena sejanaca paprike. Slične rezultate u proučavanju izolata AG-4 iz paprike u Turskoj dobili su **Tuncer and Eken** (2013), ne precizirajući koja intraspecijska grupa je u pitanju i opisali su je kao jako virulentnu AG. Izolat *R. solani* AG-4 HGI iz Srbije poreklom sa kupusa izazvao je nekrozu korena na inokulisanim sejancima. Slične rezultate u svojim istraživanjima na izolatima u Kini dobili su **Yang et al.** (2006b) koji su AG-4 HGI označili kao jako virulentnu, jer je prouzrokovala trulež i nekrozu biljaka. Izolat *R. solani* AG-4 HGI iz Srbije poreklom sa uljane repice izazvao je nekrozu korena na inokulisanim sejancima. Slične rezultate u svojim istraživanjima dobili su i **Kataria and Verma** (1992) koji su AG-4 na uljanoj repici označili kao jako virulentnu, mada nisu odredili pripadnost intraspecijskoj grupi. Izolat *R. solani* AG-4 HGI sa mrkve iz Srbije izazvao je nekrozu sejanaca mrkve. *R. solani* AG-4 HGI do sada nije opisana na mrkvi, tako da nema podataka za poređenje virulentnosti. Brojne druge *Rhizoctonia* spp. AG (AG-U, AG-2-2, AG-2-4, AG-4 HGII, AG-4 HGIII) opisane su kao patogene na mrkvi (**Sumner et al.**, 2003b; **Kurt et al.**, 2005; **Misawa and Toda**, 2013).

Ispitivani izolat *R. solani* AG-4 HGII iz Srbije poreklom sa jabuke ispoljio je patogenost primenom dve metode, na sejancima, kao i na liskama i lisnim peteljka jabuke. Izazvao je nekrozu sejanaca, pojavu nekrotičnih pega na liskama i mestimičnu nekrozu na lisnim peteljka. *R. solani* AG-4 HGII nije do ovih istraživanja opisana na jabuci, tako da nema podataka za poređenje. U svom istraživanju prisustva višejedarnih i dvojedarnih vrsta roda *Rhizoctonia* na korenu biljaka jabuke, **Mazzola** (1997) je višejedarne *R. solani* AG-5 i AG-6 okarakterisao kao vrlo virulentne, jer su izazivale jaku trulež korena jabuke. *R. solani* AG-4 HGII opisana je kao jako virulentna na različitim šumskim drvenastim biljkama u Poljskoj (**Belka and Manka**, 2014).

Ispitivani izolat *R. solani* AG-6 iz Srbije poreklom sa maline ispoljio je patogenost na listovima i lisnim peteljka maline, tako što je izazvao pojavu nekrotičnih pega. *R. solani* AG-6 nije do sada opisana na malini, nema podataka za poređenje patogenosti. Mada se *R. solani* AG-6 često smatra saprobnom ili slabo patogenom (**Pope and Carter**, 2001), zabeleženo je da je ispoljila značajnu virulentnost na korenu jabuke i izazvala intenzivnu trulež korena (**Mazzola**, 1997).

Ispitivani izolati *W. circinata* var. *zeae* ispoljili su patogenost na sejancima kupusa odnosno uljane repice, u zavisnosti od porekla. Izolat sa kupusa izazvao je nekrozu korena sejanaca kupusa, a izolat sa uljane repice nekrozu korena i korenovog vrata sejanaca uljane repice. Pošto *W. circinata* var. *zeae* nije do sada opisana kao patogen ovih domaćina, nema podataka za poređenje patogenosti, mada su izolati opisani kao virulentni u sličnim testovima na grašku i mrkvi (**Ohkura et al.**, 2009; **Sharma-Poudyal et al.**, 2015).

6.3. Morfološka karakterizacija i AG uparivanje ispitivanih izolata *Rhizoctonia* spp. iz Srbije

Morfološke osobine ukupno 64 izolata svrstana u 11 morfoloških grupa odnosno identifikovanih AG (jedan ili više izolata poreklom sa svake biljke domaćina iz svakog lokaliteta) ukazuju na značajan diverzitet, kako u izgledu kolonije, tako i po prisustvu i vremenu formiranja moniliformnih ćelija i sklerocija. Proučavane osobine predstavljale su, u nekim slučajevima, pouzdan taksonomski karakter, na osnovu koga je bilo moguće morfološki razlikovati neke AG. Međutim, mnoge AG, naročito podgrupe, imaju slične morfološke osobine i za preciznu identifikaciju bilo je neophodno potvrditi dobijene rezultate molekularnim metodama (**Jaffar et al.**, 2016).

Svih pet ispitivanih izolata *Rhizoctonia* spp. AG-A ispoljili su uniformne morfološke osobine, odnosno obrazovali su kolonije bež boje, ravnog oboda na PDA, koje su brzo rasle. Hife su se granale pod pravim uglom i uglavnom su imale po dva jedra u ćelijama. Ispitivani izolati nisu obrazovali sklerocije, što je u saglasnosti sa ranijim rezultatima (**Li et al.**, 2011). Na osnovu izgleda kolonije, **Li et al.** (2011) su opisali tri morfološka tipa *Rhizoctonia* spp. AG-A. Shodno tome izolati iz Srbije pripadaju morfotipu II, koji karakteriše bujna, vazdušasta micelija i odsustvo sklerocija. Izolati iz Srbije nisu formirali anastomoze ni sa jednim od tester izolata sa kojima su bili upareni, osim kada su upareni sami sa sobom, što je u saglasnosti sa rezultatima **Fang et al.** (2013) i **Unal et al.** (2014).

Sva tri ispitivana izolata *Rhizoctonia* spp. AG-G sa tri domaćina ispoljila su uniformne morfološke osobine. Obrazovala su kolonije bež do smeđe boje, ravnog oboda na PDA, koje su brzo rasle. Hife su se granale pod pravim uglom i uglavnom su imale po dva jedra u ćelijama. Ispitivani izolati obrazovali sklerocije smeđe boje, što je u saglasnosti sa rezultatima **Hall et al.** (2019). U svojim istraživanjima **Yang et al.** (2015b) opisali su izolate *Rhizoctonia* spp. AG-G, sa istim osobinama ali koji nisu obrazovali sklerocije. Izolati iz Srbije nisu formirali anastomoze ni sa jednim od tester izolata sa kojima su bili upareni, osim kada su upareni sami sa sobom, što je u saglasnosti sa prethodno publikovanim rezultatima (**Fang et al.**, 2013; **Unal et al.**, 2014).

Ispitivani izolat *Rhizoctonia* spp. AG-F obrazovao je kolonije bež do svetlosmeđe boje, ravnog oboda na PDA, koja je brzo rasla. Hife su se granale pod pravim uglom i uglavnom su imale po dva jedra u ćelijama. Ispitivani izolati obrazovali su sklerocije bež boje. Sve navedene osobine su u saglasnosti sa rezultatima **Alaei et al.** (2017). Izolati iz Srbije nisu formirali anastomoze ni sa jednim od tester izolata sa kojima su bili upareni, osim kada su upareni sami sa sobom. Do sličnih rezultata došli i **Alaei et al.** (2017), u čijim istraživanjima izolati *Rhizoctonia* spp. AG-F nisu formirali anastomoze ni sa tester izolatima *Rhizoctonia* spp. AG-A ni AG-G, ali kada su upareni sa izolatima *Rhizoctonia* spp. AG-F formirali su anastomoze.

Ispitivani izolati *Rhizoctonia* spp. AG-U ispoljili su uniformne morfološke osobine, obrazovali su kolonije bež do svetlosmeđe boje, ravnog oboda na PDA, koje su brzo rasle. Hife su se granale pod pravim uglom i uglavnom su imale po dva jedra u ćelijama. Ispitivani izolati obrazovali su sklerocije bež boje. Sve navedene osobine u potpunosti su u saglasnosti sa ranije objavljenim karakteristikama *Rhizoctonia* spp. AG-U (**Hyakumanchi et al.**, 2005; **Misawa and Toda**, 2013). Izolati iz Srbije nisu formirali anastomoze ni sa jednim od tester izolata sa kojima su bili upareni, osim kada su upareni sami sa sobom. Do sličnih rezultata došli su i **Misawa and Toda** (2013) kada su uparili izolate *Rhizoctonia* spp. AG-U sa 17 različitih AG. C2 reakcija ostvarena je samo sa tester izolatima *Rhizoctonia* spp. AG-U i AG-P, ukazujući na blisko srodne odnose, ali ne i potpunu genetičku uniformnost.

Ispitivani izolat *R. solani* AG-2-1 obrazovao je kolonije svetlosmeđe boje, ravnog oboda na PDA, koja je brzo rasla. Hife su se granale pod pravim uglom, a u ćelijama su se uglavnom nalazila više od dva jedra. Ispitivani izolat obrazovao je sklerocije smeđe boje, što je u saglasnosti sa većinom objavljenih istraživanja (**Dass**, 2013; **Misawa and Kuninaga**, 2013). Izuzetak su rezultati **Jaffar et al.** (2016) čiji izolati *R. solani* AG-2-1 ne obrazuju sklerocije. Izolati iz Srbije ispoljili su C3

reakcije u međusobnom uparivanju, kao i sa tester izolatima AG-2-1 sa kojima su bili upareni, dok je C2 reakcija zabeležena sa tester izolatima AG-2-2, ukazala na blisku srodnost. Ovakvi rezultati u saglasnosti su sa ranije publikovanim rezultatima (**Carling et al.**, 2002a).

Dva ispitivana izolata *R. solani* AG-2-2 pokazala su uniformne morfološke osobine, obrazovali su kolonije žute do smeđe boje, ravnog oboda na PDA, koje su brzo rasle. Hife su se granale pod pravim uglom i uglavnom se u ćelijama nalazilo više od dva jedra. Ispitivani izolati obrazovali su sklerocije smeđe boje. **Misawa et al.** (2015) navode da njihovi izolati *R. solani* AG-2-2 ispoljavaju morfološke osobine koje su u saglasnosti sa opisima izolata iz Srbije. Izolati iz Srbije nisu formirali savršene anastomoze (C3 reakcije) ni sa jednim od tester izolata sa kojima su bili upareni, uključujući i tester izolate AG-2-2, sa kojima su ostvarili C2 reakciju. Kada su upareni sami sa sobom izolati su formirali C3 reakciju. U brojnim istraživanjima autori su se sretali sa sličnom reakcijom između izolata ove AG (**Lehtonen**, 2009). **Hyakumachi and Ui** (1987) su proučavali izolate AG-2-2 sa šećerne repe koji nisu imali sposobnost anastomoze čak ni sami sa sobom.

Svih šest ispitivanih izolata *R. solani* AG-3 pokazali su uniformne morfološke osobine, obrazovali su kolonije smeđe boje ravnog oboda na PDA, koje su brzo rasle. Hife su se granale pod pravim uglom i u ćelijama se uglavnom nalazilo više od dva jedra. Ispitivani izolati obrazovali su sklerocije smeđe boje. U svojim istraživanjima **Dass** (2013) opisuje izolate *R. solani* AG-3 čije osobine su u saglasnosti sa opisima izolata iz Srbije. Izolati iz Srbije nisu formirali C3 anastomozne reakcije ni sa jednim od tester izolata sa kojima su bili upareni (osim kada su upareni sami sa sobom), a sa tester izolatima AG-3 formirali su C2 reakcije. U ovom slučaju C2 reakcija između istih AG ukazuje da to da izolati iz ove disertacije ne pripadaju istoj vegetativnoj kompatibilnoj populaciji sa tester izolatom, što je zabeleženo i u drugim istraživanjima (**MacNish et al.**, 1997; **Lehtonen**, 2009).

Svih 30 ispitivanih izolata *R. solani* AG-4 HGI ispoljili su uniformne morfološke osobine, obrazovali su kolonije bež do svetlosmeđe boje, ravnog oboda na PDA, koje su brzo rasle. Hife su se granale pod pravim uglom i u ćelijama se uglavnom nalazilo više od dva jedra. Ispitivani izolati obrazovali su sklerocije svetlosmeđe boje. U svojim istraživanjima **Stevens-Johnk and Jones** (2001) i **Erper et al.** (2016) opisuju izolate *R. solani* AG-4 HGI, koji su u saglasnosti sa opisima izolata iz Srbije. Izolati iz Srbije nisu formirali anastomoze ni sa jednim od tester izolata sa kojima su bili upareni, osim kada su upareni sami sa sobom. Do sličnih rezultata da se anastomoza ostvarila sa istom intraspecijskom grupom, a ne i nužno sa ostalim izolatima iz intraspecijskih grupa ove AG došli su i autori **Kuramae et al.** (2003).

Odabrani ispitivani izolat *R. solani* AG-4 HGII obrazovao je koloniju bež do smeđe boje, ravnog oboda na PDA, koja je brzo rasla. Hife su se granale pod pravim uglom i u njima su se u njima nalazila više od dva jedra. Ispitivani izolat obrazovao je sklerocije smeđe boje, što je u saglasnosti sa ranijim rezultatima (**Stevens-Johnk and Jones**, 2001; **Basseto et al.**, 2008; **Erper et al.**, 2016). Izolat iz Srbije nije formirao savršene anastomoze (C3 reakcija) ni sa jednim od tester izolata sa kojima su bili upareni, ali je sa tester izolatom AG-4 HGII došlo do C2 reakcije, što potvrđuje da izolat iz Srbije ispoljava blisku srodnost, ali ne pripada istoj vegetativno kompatibilnoj populaciji. Sličan zaključak izveden je i u radu **MacNish et al.** (1997).

Odabrani ispitivani izolat *R. solani* AG-6 obrazovao je koloniju tamno smeđe boje, ravnog oboda na PDA, koja je brzo rasla. Hife su se granale pod pravim uglom i u ćelijama se uglavnom nalazilo više od dva jedra. Ispitivani izolat obrazovao je sklerocije smeđe boje, što je u saglasnosti sa rezultatima **Sneh et al.** (1996). Izolat iz Srbije nije formirao anastomoze tipa C3, ni sa jednim od tester izolata. Sa tester izolatom *R. solani* AG-6 formirao je C2 reakcija, što je u saglasnosti sa rezultatima **Mazzola** (1997). Kada je izolat uparen sam sa sobom ostvario je C3 reakciju, mada je u nekim ranijim radovima navedeno je da izolati *R. solani* AG-6 mogu da formiraju anastomoze sa *Rhizoctonia* spp. AG-F i *R. solani* AG-8 (**Sneh et al.**, 1996).

Svih 12 ispitivanih izolata *W. circinata* var. *zeae* ispoljili su uniformne morfološke osobine, obrazovali su kolonije svetlonarandžaste boje, ravnog oboda na PDA, koje su brzo rasle. Hife su se granale pod pravim uglom i u ćelijama se uglavnom nalazilo više od dva jedra. Ispitivani izolati

obrazovali su sklerocije narandžaste boje, što je u saglasnosti sa rezultatima **Erper et al.** (2005, 2006). Izolati iz Srbije nisu formirali anastomoze ni sa jednim od tester izolata sa kojima su bili upareni, osim kada su upareni sami sa sobom. Do sličnih zaključaka došli su i autori **Toda et al.** (2007) koji su potvrdili da uparivanjem izolata koji pripadaju različitim varijetetima *W. circinata* dolazi do C2 reakcije, a uparivanjem izolata istog varijeteta formira se C3 reakcija. Prilikom uparivanja izolata *W. circinata* i *R. solani* dolazi do C0 reakcije, što je potvrđeno i u ovim istraživanjima.

6.4. Molekularne karakteristike *Rhizoctonia* spp. i njihova primena

6.4.1. Molekularna identifikacija i analize sekvenci ispitivanih izolata

Molekularna identifikacija izolata zasnovana na analizi sekvenci ITS regiona rDNA obuhvatila je ukupno 43 izolata i potvrdila je prisustvo 11 različitih AG i to *Rhizoctonia* spp. AG-A, AG-G, AG-F, AG-U, *R. solani* AG-2-1, AG-2-2, AG-3, AG-4 HGI, AG-4 HGII, AG-6 i *W. circinata* var. *zeae*. Dodatna potvrda identifikacije 12 izolata iz svake detektovane AG obavljena je na osnovu sekvenci LSU, *tef-1a*, *rpb2*, *atp6* i β -*tubulin* regiona. Amplifikacija gena za *atp6* bila je uspešna samo kod jednog izolata *Rhizoctonia* spp. AG-U, bez obzira na veliki broj pokušaja sa različitim izolatima iz svih AG *Rhizoctonia* spp. obuhvaćenih u ovim istraživanjima. Brojne modifikacije protokola u vidu izmena temperature hibridizacije i elongacije, varijacija u količini DNA uzorka i prajmera, kao i dodavanja pomoćnih supstanci, kao što su DMSO i BSA omogućile su uspešnu amplifikaciju samo izolata AG-U. Slične teškoće u amplifikaciji različitih AG *atp6* gena opisuju i **Gonzalez et al.** (2016).

Analizom homologije nukleotidnih sekvenci ITS regiona rDNA ispitivanih izolata *Rhizoctonia* spp. AG-A sa jagode sa sekvencama dostupnim u GenBank, Q-bank i BOLD Systems bazama podataka utvrđen je visok stepen nukleotidne sličnosti od 98,25-99,85% sa velikim brojem sekvenci *Rhizoctonia* spp. AG-A. Slično tome, BLAST analiza sekvenci LSU, *rpb2* i *tef-1a* markera pokazala je visok stepen sličnosti sa velikim brojem sekvenci *Rhizoctonia* spp. AG-A. Sve ovo upućuje da rezultati molekularne identifikacije u potpunosti podržavaju morfološku i biološku identifikaciju. Dobijeni rezultati ukazuju da su odabrani molekularni markeri ispoljili dovoljnu rezoluciju za identifikaciji do nivoa vrsta i AG i da se mogu uspešno koristiti u identifikaciji *Rhizoctonia* spp. Ovi rezultati potvrđuju rezultate **Gonzalez et al.** (2016) koji su utvrdili da su ITS region rDNA, LSU, *tef-1a* i *rpb2* regioni bili pouzdani u identifikaciji AG vrsta roda *Rhizoctonia*. Međusobnim poređenjem pet sekvenci ITS regiona rDNA ispitivanih izolata *Rhizoctonia* spp. AG-A izolata iz Srbije utvrđeno je postojanje varijabilnosti od tri do pet nukleotida (nukleotidna sličnost 98,6-99,5%). Slična varijabilnost izolata *Rhizoctonia* spp. AG-A sa jagode zabeležena je i u populaciji iz Italije (95-100%) i Australije (94,4-100%) (**Manici and Bonora**, 2007; **Fang et al.**, 2013).

Analizom homologije nukleotidnih sekvenci ITS regiona rDNA izolata *Rhizoctonia* spp. AG-G sa sekvencama dostupnim u GenBank i BOLD Systems bazama podataka utvrđen je visok stepen nukleotidne sličnosti od 86,6-100% sa velikim brojem sekvenci *Rhizoctonia* spp. AG-G. BLAST analiza sekvenci LSU i *tef-1a* regiona izolata iz Srbije sa dostupnim u GenBank bazi podataka pokazala je veoma visok stepen nukleotidne sličnosti sa velikim brojem izolata *Rhizoctonia* spp. AG-G. Region *tef-1a* gena pokazao se manje informativnim i kao najbližnje sekvence prikazao je izolate *Rhizoctonia* spp. bez podataka o AG. Dobijeni rezultati ukazuju da su odabrani molekularni markeri ispoljili dovoljnu rezoluciju za identifikaciju do nivoa vrste i AG i u saglasnosti su sa rezultatima **Gonzalez et al.** (2016) koji su utvrdili da su ITS i LSU regioni pouzdani u identifikaciji ove AG, dok se *tef-1a* nije pokazao informativnim. Međusobnim poređenjem sekvenci ITS regiona rDNA tri izolata *Rhizoctonia* spp. AG-G iz Srbije utvrđeno je postojanje male varijabilnosti od jednog nukleotida (nukleotidna sličnost 99,85%), što je u saglasnosti sa rezultatima **Sharon et al.** (2007).

Analizom homologije nukleotidne sekvence ITS regiona rDNA ispitivanog izolata *Rhizoctonia* spp. AG-F sa sekvencama dostupnim u GenBank i BOLD Systems bazama podataka utvrđen je visok stepen sličnosti od 98,6-99,9% sa velikim brojem sekvenci *Rhizoctonia* spp. AG-F. BLAST analiza homologije nukleotidne sekvence *rpb2* gena odabranog izolata *Rhizoctonia* spp. AG-F i sekvenci dostupnih u GenBank bazi podataka utvrđen je veoma visok stepen sličnosti sa sekvencama izolata *Rhizoctonia* spp. AG-F. LSU i *tef-1α* geni su se pokazali manje informativnim i kao najbližnje sekvence prikazali izolate *Rhizoctonia* spp. AG-V, odnosno *R. solani* AG-4. Istraživanja **Gonzalez et al.** (2016) na kojima se zasniva identifikacija brojnih AG *Rhizoctonia* spp. nisu obuhvatila *tef-1α* i LSU region za *Rhizoctonia* spp. AG-F. Rezultati molekularne identifikacije u potpunosti podržavaju konvencionalnu identifikaciju *Rhizoctonia* spp. AG-F iz Srbije, a odabrani molekularni markeri ispoljili su dovoljnu rezoluciju za identifikaciju do nivoa vrste i AG. Ovi rezultati potvrđuju rezultate **Gonzalez et al.** (2016) koji su utvrdili da su ITS, *rpb2* regioni bili pouzdani u identifikaciji *Rhizoctonia* spp. AG-F, dok su LSU i *tef-1α* geni bili manje informativni.

Analizom homologije sekvenci ITS regiona rDNA ispitivanih izolata *Rhizoctonia* spp. AG-U sa sekvencama dostupnim u GenBank i BOLD Systems bazama podataka utvrđen je visok stepen nukleotidne sličnosti od 96,6-99,6% sa velikim brojem sekvenci *Rhizoctonia* spp. AG-U. Mali broj sekvenci bio je na raspolaganju za poređenje homologije nukleotidnih sekvenci LSU, *tef-1α* i *atp6* molekularnih markera (10 izolata ili manje u zavisnosti od genskog regiona). Region *rpb2* nije primenjen za identifikaciju zato što uprkos pokušajima nije umnožen. Region *atp6* je od svih izolata iz ove disertacije uspešno amplifikovan samo kod ove AG i pokazao je odličnu rezoluciju. Međutim, zbog teškoća pri umnožavanju, usled specifične sekvence (**Gonzalez et al.**, 2016) ne može biti preporučen za rutinsku primenu. LSU gen pokazao se manje informativnim i kao najbližnju sekvencu prikazao izolat *Rhizoctonia* spp. AG-V. Većina odabranih molekularnih markera ispoljili su dovoljnu rezoluciju za identifikaciju do nivoa vrste i AG i može se uspešno koristiti u identifikaciji *Rhizoctonia* spp. Ovi rezultati potvrdili su i navode **Gonzalez et al.** (2016) koji su utvrdili da su ITS region rDNA, *tef-1α* i *atp6* regioni bili pouzdani u identifikaciji *Rhizoctonia* spp. AG-U.

Analizom homologije nukleotidne sekvence ITS regiona rDNA ispitivanog izolata *R. solani* AG-2-1 sa sekvencama dostupnim u GenBank i BOLD Systems bazama podataka utvrđen je visok stepen nukleotidne sličnosti od 98,6-99,6% sa velikim brojem sekvenci *R. solani* AG-2-1. Analiza sekvenci dodatnih molekularnih markera (LSU, *tef-1α* i *rpb2*), takođe je pokazala visok stepen nukleotidne sličnosti sa velikim brojem sekvenci za regione *rpb2* i *tef-1α* *R. solani* AG-2-1. LSU region pokazao se manje primenjiv za identifikaciju i kao najbližnju sekvencu prikazao je *R. solani* AG-10, zato što u bazama podataka još uvek nema sekvenci *R. solani* AG-2-1 LSU regiona za poređenje. **Gonzalez et al.** (2016) navode, ali nemaju prijavljenu sekvencu LSU regiona ove AG. Sekvenca iz ove disertacije predstavlja prvu sekvencu LSU regiona *R. solani* AG-2-1 u svetu. Rezultati molekularne identifikacije u potpunosti podržavaju konvencionalnu identifikaciju izolata *R. solani* AG-2-1 iz Srbije, a molekularni markeri odabrani za ova istraživanja ispoljili su dovoljnu rezoluciju za identifikaciju do nivoa vrste i AG, i mogu se uspešno koristiti. Ovi rezultati potvrđuju rezultate **Gonzalez et al.** (2016) da je LSU region manje pouzdan u identifikaciji *R. solani* AG-2-1, za razliku od ITS rDNA, *tef-1α* i *rpb2* za koje ima više sekvenci za poređenje i koji doprinose pouzdanosti analiza kroz multilokusni pristup.

Analizom homologije nukleotidnih sekvenci ITS regiona rDNA ispitivanog izolata *R. solani* AG-2-2 sa sekvencama dostupnim u GenBank i BOLD Systems bazama podataka utvrđen je visok stepen nukleotidne sličnosti od 99% sa velikim brojem sekvenci *R. solani* AG-2-2. Slični rezultati dobijeni su analizom homologije nukleotidne sekvence *rpb2* kada je ustanovljena visoka sličnost sa većim brojem sekvenci *R. solani* AG-2-2. Region *tef-1α* pokazao se manje informativnim i kao najbližnju sekvencu prikazao izolat *R. solani* AG-2-1, pre svega zbog manjeg broja raspoloživih sekvenci za poređenje. Ovakvi rezultatima mogu biti posledica i velike sličnosti AG-2-1 i AG-2-2. Rezultati molekularne identifikacije u potpunosti podržavaju konvencionalnu identifikaciju, a odabrani molekularni markeri su ispoljili zadovoljavajuću rezoluciju da pojedinačno ili zajedno budu

primenjeni za identifikaciju do nivoa vrste i AG. Bez obzira na veliki broj pokušaja i prilagođavanje uslova reakcije, amplifikacija sekvence LSU regiona izolata *R. solani* AG-2-2 iz Srbije nije bila moguća, slično rezultatima **Gonzalez et al.** (2016). Međusobnim poređenjem sekvenci ITS regiona rDNA izolata *R. solani* AG-2-2 iz Srbije, utvrđena je varijabilnost u tri nukleotida, odnosno 99,6% sličnosti. Postojanje male varijabilnosti u populaciji *R. solani* AG-2-2 zabeleženo je i kod **Carling et al.** (2002a).

Analizom homologije nukleotidnih sekvenci ITS regiona rDNA ispitivanih izolata *R. solani* AG-3 sa sekvencama dostupnim u GenBank i BOLD Systems bazama podataka utvrđen je visok stepen nukleotidne sličnosti od 97,7-99,85% sa velikim brojem sekvenci *R. solani* AG-3. Analizom sekvenci LSU i *tef-1a* i *rpb2* gen, pokazala je da su izolati iz Srbije ispoljili visoku sličnost sa preko 30 izolata *R. solani* AG-3 iz raznih delova sveta. Rezultati molekularne identifikacije u potpunosti su potvrdili konvencionalnu identifikaciju, a odabrani molekularni markeri pokazali su dovoljnu rezoluciju za identifikaciju do nivoa vrste i AG, što potvrđuje rezultate **Gonzalez et al.** (2016). Međusobnim poređenjem šest sekvenci ITS regiona rDNA ispitivanih izolata *R. solani* AG-3 iz Srbije, utvrđeno je postojanje razlika do šest nukleotida (98,8-100% sličnosti). Postojanje varijabilnosti u populaciji *R. solani* AG-3 poreklom sa krtola krompira zabeleženo je i u populaciji AG-3 iz Finske (**Lehtonen**, 2009).

Analizom homologije nukleotidnih sekvenci ITS regiona rDNA ispitivanih izolata *R. solani* AG-4 HGI sa sekvencama dostupnim u GenBank, Q-bank i BOLD Systems bazama podataka utvrđen je visok stepen nukleotidne sličnosti od 97,7-98,8% sa velikim brojem sekvenci *R. solani* AG-4 HGI. Analiza sekvenci LSU, *tef-1a* i *rpb2* regiona ispitivanog izolata *R. solani* AG-4 HGI pokazala je visok stepen nukleotidne sličnosti sa velikim brojem sekvenci izolata *R. solani* AG-4 HGI. U slučaju ove AG analize dobijenih sekvenci potvrdile su rezultate morfološke i biološke identifikacije i bile u saglasnosti sa rezultatima **Gonzalez et al.** (2016) o pouzdanosti odabranih genskih regiona. Međusobnim poređenjem devet sekvenci ITS regiona rDNA ispitivanih izolata *R. solani* AG-4 HGI iz Srbije utvrđeno je postojanje male varijabilnosti, odnosno razlikovali su se u do dva nukleotida (99,5-100% sličnosti). Postojanje ovakve varijabilnosti među sekvencama izolata *R. solani* AG-HGI zabeleženo je i u populaciji AG-4 HGI iz Japana (97,2-100%) (**Kuninaga et al.**, 1997).

Analizom homologije nukleotidne sekvence ITS regiona rDNA ispitivanog izolata *R. solani* AG-4 HGII sa dostupnim u GenBank i BOLD Systems bazama podataka utvrđen je visok stepen nukleotidne sličnosti od 99,2-100% sa velikim brojem sekvenci *R. solani* AG-4 HGII. Analizom sekvenci LSU, *tef-1a* i *rpb2* regiona jednog ispitivanog izolata iz ove AG utvrđen je veoma visok stepen nukleotidne sličnosti sa velikim brojem sekvenci izolata *R. solani* AG-4 HGII iz drugih delova sveta. Rezultati molekularne identifikacije u potpunosti su potvrdili konvencionalnu identifikaciju. Odabrani molekularni markeri ispoljili su zadovoljavajuću rezoluciju za identifikaciju *Rhizoctonia* spp. AG-4 HGII, što je u saglasnosti sa rezultatima **Gonzalez et al.** (2016).

Analizom homologije nukleotidne sekvence ITS regiona rDNA ispitivanog izolata *R. solani* AG-6 sa dostupnim u GenBank i BOLD Systems bazama podataka utvrđen je visok stepen nukleotidne sličnosti od 96,2-100% sa velikim brojem sekvenci *R. solani* AG-6. Visoka homologija sekvenci LSU i *rpb2* regiona sa velikim brojem sekvenci izolata *R. solani* AG-6. Region *tef-1a* pokazao se manje informativnim i najveća sličnost ustanovljena je sa izolatom *R. solani* AG-1 IB, što je verovatno posledica malog broja sekvenci raspoloživih za upoređivanje. Ovi rezultati potvrdili su konvencionalnu identifikaciju, a ITS, LSU i *rpb2* markeri ispoljili su zadovoljavajuću rezoluciju za identifikaciju *Rhizoctonia* spp. AG-6. Dobijeni rezultati u saglasnosti su sa rezultatima **Gonzalez et al.** (2016).

Analizom homologije nukleotidnih sekvenci ITS regiona rDNA ispitivanih izolata *W. circinata* var. *zeae* sa dostupnim u GenBank i BOLD Systems bazama podataka utvrđen je visok stepen nukleotidne sličnosti od 96,2-100% sa velikim brojem sekvenci *W. circinata* var. *zeae*. Analizom

sekvenci LSU, *rpb2* i *β -tubulin* dva ispitivana izolata utvrđen je veoma visok stepen nukleotidne sličnosti sa ograničenim brojem sekvenci odgovarajućih gena. Za sada je u bazama podataka na raspolaganju mali broj sekvenci ovog varijeteta za poređenje. Međusobnim poređenjem 12 sekvenci ITS regiona rDNA ispitivanih izolata *W. circinata* var. *zeae* iz Srbije utvrđena je razlika od 0-2 nukleotida (99,6-100% sličnosti). Postojanje male varijabilnosti među sekvencama izolata *W. circinata* var. *zeae* u saglasnosti je sa rezultatima **Aydin et al.** (2013), tako da svi ispitivani izolati iz Srbije svrstani u istu podgrupu u okviru varijeteta *zeae*. Rezultati molekularne identifikacije u potpunosti su potvrdili konvencionalnu identifikaciju, kao i da su molekularni markeri obuhvaćeni ovim istraživanjima ispoljili zadovoljavajuću rezoluciju za identifikaciju do nivoa varijeteta *Waitea circinata*. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa istraživanjima **Aydin et al.** (2013) i **Gurkanli et al.** (2016) koji su utvrdili da su ITS, LSU, *β -tubulin* regioni bili pouzdani u identifikaciji *W. circinata* var. *zeae*.

6.4.2. Filogenetske analize i taksonomska pozicija ispitivanih izolata

U okviru ovih istraživanja 43 izolata *Rhizoctonia* spp. iz Srbije uključeno je u molekularnu karakterizaciju i filogenetske analize na osnovu sekvence ITS regiona rDNA zajedno sa 89 izolata reprezentativnih AG i varijeteta iz različitih biljaka i delova sveta, a koje su preuzete iz odgovarajućih baza podataka.

Filogenetska analiza dvojedarnih *Rhizoctonia* spp., čiji se teleomorf svrstava u rod *Ceratobasidium*, uključila je četiri različite AG čije je prisustvo dokazano u Srbiji, a poreklom sa jagode, paradajza, pasulja, trešnje, paprike i jabuke. Analize su kao osnovu koristile su modifikovane filogenetske analize **Manici and Bonora** (2007) kao prihvaćene da odražavaju odgovarajuće međuodnose različitih AG dvojedarnih *Rhizoctonia* spp. Filogenetsko stablo koje je rekonstruisano u ovim istraživanjima u potpunosti odgovara definisanoj i odgovarajućoj topologiji za razdvajanje AG u okviru dvojedarnih *Rhizoctonia* spp. U okviru klastera gde su se grupisale sekvence AG-A, uočeno je formiranje četiri podklastera, što je u saglasnosti sa nivoom varijabilnosti koja je uočena u populaciji AG-A u Italiji (**Manici and Bonora**, 2007). Izolati *Rhizoctonia* spp. AG-A iz Srbije grupisali su se u tri od četiri formirana podklastera, što ukazuje na prisustvo značajne varijabilnosti kao i mogućeg različitog porekla. Ovaj rezultat predstavlja prvi nalaz genetičke varijabilnosti u okviru *Rhizoctonia* spp. AG-A izolata u Srbiji. Ostali izolati iz odgovarajućih AG - AG-G, AG-F i AG-U grupisali su se u zasebne klastere, zajedno sa predstavnicima njihovih AG. Ustanovljena topologija, a time i ustanovljeni međuodnosi odgovaraju ranije ustanovljenim za izolate AG-G, AG-F i AG-U (**Yang et al.**, 2015a, 2015b). Sekvence izolata AG-U i AG-F formirale su zajednički zasebni klaster, što ukazuje na veliku srodnost, što takođe potvrđuje ranije ustanovljene i publikovane rezultate (**Yang et al.**, 2015a, 2015b).

Filogenetska analiza višejedarnih *R. solani* čiji se teleomorf svrstava u rod *Thanatephorus* uključila je šest različitih AG čije je prisustvo ustanovljeno u Srbiji, a poreklom su sa paprike, šećerne repe, krompira, mrkve, kupusa, uljane repice, jabuke i maline. Analize su kao okosnicu koristile modifikovan koncept **Sharon et al.** (2008) i njihove filogenetske analize kao usaglašene i prihvaćene u literaturi. Filogenetsko stablo rekonstruisano u ovim istraživanjima, bilo je sa definisanom i prihvaćenom rezolucijom za razdvajanje AG u okviru višejedarnih *R. solani*. Pored odvajanja odabranih AG u zasebne grane, u okviru nekih, formirale su se i intraspecijske podgrupe. Izolati iz Srbije grupisali su se uz odgovarajuće reprezentativne AG, a svaka AG predstavljala je zasebnu grupu u stablu, što je usaglašeno sa filogenetskim međuodnosima između različitih grupa koje su ustanovili **Sharon et al.** (2008). U okviru klastera *R. solani* AG-3 izvojila su se tri podklastera, gde se deo izolata iz Srbije grupisao sa izolatima poreklom iz Japana, a deo sa izolatima poreklom iz Norveške. Ovo ukazuje na postojanje varijabilnosti u populaciji izolata AG-3 u Srbiji. Do sličnih rezultata u pogledu varijabilnosti u okviru AG-3 sa krompira došao je **Lehtonen** (2009). Varijabilnost populacije uočena je i u okviru klastera gde su se grupisali svi izolati *R. solani* AG-4 HGI i gde su se odvojila dva podklastera. U prvi su se svrstali svi referentni AG-4 HGI izolati

kao i izolati iz Srbije sa paprike, kupusa i uljane repice i jedan izolat sa mrkve. U drugi podklaster, zajedno sa ostatkom referentnih izolata AG-4 HGI, grupisali su se svi ostali izolati sa mrkve iz Srbije. Zanimljivo je da su svi srpski izolati AG-4 HGI u prvom podklasteru (sem jednog izolata iz mrkve) poreklom su sa različitih domaćina, ali su sa istog lokaliteta. Nasuprot tome, svi izolati AG-4 HGI iz drugog podklastera su sa drugog lokaliteta - Futog i svi su sa istog domaćina, mrkve. Ovakvo grupisanje ukazuje na dve moguće introdukcije. Do sličnih rezultata i postojanja varijabilnosti u okviru populacije *R. solani* AG-4 HGI došli su i **Sharon et al.** (2006). Filogenetske analize pružile su mogućnost razdvajanje AG u odgovarajuće ranije opisane grupe i time potvrdile međuodnos izolata iz Srbije i iz drugih delova sveta. Filogenetske analize pružile su i dodatne informacije o postojanju varijabilnosti i intraspecijskih grupa u populaciji višejedarnih *R. solani*, ukazujući na moguće puteve introdukcije.

Filogenetska analiza sekvenci višejedarnih *Rhizoctonia* čiji teleomorf pripada vrstama roda *Waitea* obuhvatila je 12 izolata poreklom sa kupusa i uljane repice iz Srbije, kao i referentne izolate svih pet do sada opisanih varijeteta *W. circinata*. Kao okosnica analiza poslužilo je filogenetsko stablo **Aydin et al.** (2013) prihvaćeno da ilustruje postojeće međuodnose. Filogenetsko stablo dobijeno u ovim analizama u potpunosti je podržalo topologiju i ranije opisano grupisanje (**Aydin et al.**, 2013). Sekvence iz Srbije grupisale su se uz reprezentativne sekvence *W. circinata* var. *zeae*. Mada je *W. circinata* var. *zeae* pre svega opisana kao patogen monokotiledonih biljaka (**de la Cerda et al.**, 2007; **Aydin et al.**, 2013) filogenetska analiza sprovedena u okviru ove disertacije po prvi put u svetu analizira međuodnose manjeg broja izolata koji su ispoljili patogenost za dikotiledone biljke. U okviru varijeteta *zeae* sekvence su se grupisale u dva podklastera, koji su podržali ranije opisanu podelu izolata ovog varijeteta na dve grupe, I i II. Grupa II dalje je podeljena na podgrupe IIa i IIb (**Aydin et al.**, 2013). Svi izolati iz Srbije svrstali su se u grupu I, koja je ispoljila veliku uniformnost i gde su zabeležene razlike od 0-2 nukleotida. Pored izolata iz Srbije u okviru I grupe nalaze se sekvence izolata sa dikotiledonih biljaka, što ukazuje na bližu srodnost, ali i sekvenca poreklom sa *Festuca* spp. iz Mađarske. U drugu grupu su se svrstale sekvence izolata poreklom iz monokotiledonih biljaka, ali i samo jedna sekvenca izolata sa mrkve. U Evropi je do sada *W. circinata* var. *zeae* bila opisana u Mađarskoj, ali na monokotiledonim domaćinima (**Vajna and Oros**, 2005). Takođe, u Španiji je na monokotiledonim domaćinima opisana *W. circinata* var. *circinata* (**Gomez de Barreda et al.**, 2019). Izolati *W. circinata* var. *zeae* iz ove disertacije su prvi opisani na dikotiledonim biljkama u Evropi. U drugim krajevima sveta već je opisano da se *W. circinata* var. *zeae* može javiti i na soji, grašku, mrkvi i šećernoj repi (**Ohkura et al.**, 2009; **Sharma-Poudyal et al.**, 2015; **Zhao et al.**, 2019a). Ovakvi rezultati mogu da ukazuju da *W. circinata* var. *zeae* ima tendenciju širenja kruga domaćina i na dikotiledone biljke. Dobijeni rezultati u okviru ove disertacije ukazali su na postojanje bližeg međuodnosa izolata koji su izolovani iz obolelih dikotiledonih biljaka ili zemljišta gde su gajeni (**Blanco et al.**, 2018; **Zhao et al.**, 2019a). Ovakvi međuodnosi po prvi put u svetu ukazuju na širenje kruga domaćina *W. circinata* var. *zeae*, a to je veoma značajan aspekt ranije opisan za *R. solani* AG-1 IA i proširenje kruga domaćina sa pirinča na soju, i za *R. oryzae* i širenje kruga domaćina sa pirinča na *Urochloa* sp. (**Chavarro-Mesa et al.**, 2015; **Pereira et al.**, 2017). U drugoj grupi, sa podgrupama IIa i IIb, izolati su ispoljili viši stepen sličnosti sa razlikama od 0 do 5 nukleotida.

6.4.3. Pogodnost primene specifičnih prajmera u detekciji AG

Protokol za direktnu specifičnu detekciju i identifikaciju pojedinih AG *Rhizoctonia* spp. pokazao je različitu pogodnost za primenu u zavisnosti od AG. Od ukupno 11 AG detektovanih u Srbiji, direktna specifična detekcija primenom ovog protokola bila je moguća ili delimično primenjiva za osam AG. Ovi rezultati predstavljaju dodatni doprinos razvoju i implementaciji brze, specifične i osetljive dijagnostike različitih AG *Rhizoctonia* spp. u našoj zemlji.

Ispitivani prajmeri bili su specifični za sledeće AG *Rhizoctonia* spp.: AG-A, AG-G, AG-2-2, AG-4 HGI. Specifične PCR reakcije sa prajmerima dizajniranim za *Rhizoctonia* spp. AG-A, uspešno su

amplifikovani samo izolati ciljane AG-A, što je u saglasnosti sa rezultatima **Arakawa and Inagaki** (2014). Specifičnost prajmera za višejedarne *R. solani* AG-2-2 pokazala se izraženom, umnožili su samo izolate ciljane AG, što je u saglasnosti sa rezultatima **Budge et al.** (2009a). Specifični prajmeri dizajnirani za detekciju *R. solani* AG-4 HGI, pokazali su se takođe kao vrlo specifični, umnožavajući samo ciljanu AG-4 HGI od 11 različitih AG. Dobijeni rezultat je u saglasnosti sa rezultatima **Budge et al.** (2009a).

Prajmeri su bili delimično specifični za detekciju sledećih *Rhizoctonia* spp. AG: AG-F, AG-2-1, AG-3, AG-4 HGII. Prajmeri za *Rhizoctonia* spp. AG-G, umnožili su izolat AG-G, ali i izolat *R. solani* AG-2-1, a nije ostale testirane AG, što je u izvesnoj saglasnosti sa rezultatima **Arakawa and Inagaki** (2014). Slično tome, prajmeri dizajnirani za *Rhizoctonia* spp. AG-F, umnožili su izolat AG-F, ali i izolat AG-2-1, što se delimično poklapa sa rezultatima **Arakawa and Inagaki** (2014). Ova nespecifičnost verovatno se javila zbog visokog stepena nukleotidne sličnosti od preko 90% između AG-F i AG-2-1 (**Sharon et al.**, 2008). Prajmeri za *R. solani* AG-2-1 umnožili su pored ciljanog izolata i izolate AG-2-2 i AG-3, što je u delimičnoj saglasnosti sa rezultatima **Budge et al.** (2009a). Nedovoljna specifičnost prajmera za AG-2-1 uočena je i od strane **Okubara et al.** (2008), pri čemu su njihovi prajmeri pored AG-2-1 umnožavali i AG-8. Postojanje unakrsnih reakcija je verovatno posledica značajne srodnosti *R. solani* AG-2-1, AG-2-2 i AG-3 (**Sharon et al.**, 2006, 2008). Prajmeri za *R. solani* AG-3, pokazali su se delimično specifičnim, a pored ciljane AG-3 umnožili i izolate AG-2-2 i AG-4 HGI. *R. solani* AG-2-2 i AG-3 predstavljaju veoma srodne AG (**Sharon et al.**, 2008). Prajmeri za AG-4 HGII, umnožili su izolat AG-4HGII, ali i izolat AG-3, a nije došlo do umnožavanja ostalih AG, što je delimično u saglasnosti sa rezultatima **Budge et al.** (2009a). Ograničena specifičnost je verovatno posledica namene, da se prajmeri koriste zajedno sa fluorescentnim probama u qPCR (**Budge et al.**, 2009a).

Prajmeri primenjeni za detekciju *R. solani* AG-6 (**Arakawa and Inagaki**, 2014) uopšte nisu bili specifični da umnože ciljani izolat iz Srbije. Umnožili su samo izolat AG-3 i pokazali su specifičnost veću od prajmera inicialno dizajniranih za ovu AG.

6.4.4. Pogodnost qPCR protokola za specifičnu detekciju *Rhizoctonia solani* AG-2-2

U ovom radu prvi put je prilagođen i primenjen qPCR protokol za detekciju vrsta roda *Rhizoctonia* u Srbiji i demonstrirana je njegova brzina, specifičnost, praktičnost i osetljivost u uporednim analizama u koje je bilo uključeno 10 različitih dvojedarnih i višejedarnih AG *Rhizoctonia* spp. Ove osobine čine protokol značajnim i primenjivim u svakodnevnoj dijagnostici AG vrsta roda *Rhizoctonia*, u donošenju odluka oko mera kontrole. U ovom radu modifikovan je i testiran qPCR protokol sa ranije opisanim specifičnim prajmerima za *R. solani* AG-2-2 (**Budge et al.**, 2009a), namenjenim za primenu sa TaqMan reagensima. Dokazana je specifičnost prajmera uspostavljena za primenu sa SYBR Green reagensima, što značajno smanje troškove. Sve qPCR reakcije izvođene su u 5 µl reakcione smeše, što što je dodatno smanjilo utrošak reagenasa i cenu koštanja. U sličnim istraživanjima **Abbas et al.** (2014) dizajnirali su druge specifične prajmere za detekciju *R. solani* AG-2-2, koji mogu da se koriste i u konvencionalnom i u qPCR, ali su zabeležene nespecifične reakcije sa nekim vrstama iz roda *Fusarium*. **Budge et al.** (2009a) su utvrdili da su ovde primenjeni prajmeri bili ograničene specifičnosti i da su pored AG-2-2 amplifikovali i izolate *R. solani* AG-2-1. Međutim, u analizama u ovom radu nije došlo do umnožavanja ni jedne od testiranih neciljanih AG. U poređenju qPCR sa konvencionalnim PCR protokolom, ne samo da je potvrđena specifičnost prajmera već je ustanovljena i 100x viša osetljivost, verovatno kao posledica ograničenja vizuelizacije produkata konvencionalnog PCR (**Lees et al.**, 2002). Razvijeni qPCR predstavlja veoma značajan protokol za brzu i specifičnu detekciju kao i identifikaciju AG *Rhizoctonia* sa perspektivom da bude široko primenjen (**Lees et al.**, 2002; **Lievens et al.**, 2006).

6.5. Virulentnost i krug domaćina ispitivanih izolata *Rhizoctonia* spp.

Ispitivanjem virulentnosti izolata iz 11 AG *Rhizoctonia* spp. u tri različita eksperimentalna sistema, na sejancima različitih biljaka, lisnim peteljka jagode i isečcima stabla krompira, utvrđene su značajne razlike. Karakterizacija patogenih osobina i uočena varijabilnost u virulentnosti nekih AG, kao razlika između pojedinih izolata *Rhizoctonia* spp. u okviru iste AG prvi put je dokazana u okviru ove disertacije, dok su neke razlike u dostupnoj literaturi već bile objašnjene. Za pojedine AG otkriven su novi eksperimentalni domaćini, koji ranije nisu bili opisani.

Krug domaćina. Virulentnost 25 odabranih izolata *Rhizoctonia* spp. (1-6 izolata od svake od detektovanih AG) na sejancima 14 vrsta biljaka iz osam familija pokazala se kao vrlo različita. U dostupnoj literaturi nema dovoljno podataka o eksperimentima za testiranje kruga domaćina izolata *Rhizoctonia* spp. Uglavnom su opisane metode koje uključuju testove na sejancima biljaka koje su gajene u uslovima staklenika. Metoda inokulacije sejanaca primenjena u ovom radu, u potpunosti ispunjava uslove slične prirodnim, a obezbeđuje u isto vreme sterilne uslove. Važna prednost je i to što se koristi ista količina i oblik inokuluma, kao i to što se inokulum postavlja na isto mesto u odnosu na sejance, što omogućava bolju kontrolu uslova i obezbeđuje tačnije rezultate. Krug domaćina i virulentnost ispitivani su za 13 različitih AG *Rhizoctonia* na sejancima pasulja i kukuruza u Brazilu i utvrđeno je postojanje razlika u virulentnosti različitih AG (**Blanco et al.**, 2018). Slična metoda pokazala se uspešnom za testiranje virulentnosti šest različitih AG *Rhizoctonia* na pšenici i uljanoj repici (**Jaffar et al.**, 2016), kao i izolata sa jagode na sejancima kupusa, pasulja i pšenice (**Manici and Bonora**, 2007). Različite AG *Rhizoctonia* spp. ispitivane u ovom radu izazvale su različite promene, na sejancima različitih biljaka, od toga da nisu ispoljavale patogenost, odnosno nisu uspele da ostvare infekciju, do izražene virulentnosti, odnosno izazvali su intenzitet nekroze korena ili celih sejanaca.

Četiri ispitivana izolata *Rhizoctonia* spp. AG-A ispoljila su različit stepen virulentnosti prilikom testiranja eksperimentalnog kruga domaćina. Između izolata *Rhizoctonia* spp. AG-A nije bilo razlika u virulentnosti prema istoj biljci, ali su svi prouzrokovali simptome samo na sejancima mrkve, pasulja i suncokreta. Italijanski izolati pokazali su sličnu virulentnost na bobu, a slabu virulentnost na pšenici i kupusu (**Manici and Bonora**, 2007). U literaturi je još opisano da je *Rhizoctonia* spp. AG-A izolovana iz pasulja, graška, duvana, kupusa, krompira i da je ispoljila slabu do jaku virulentnost na ovim biljkama (**Tuncer and Eken**, 2013; **Eken and Demirci**, 2004; **Gurkanli and Ozkoc**, 2011; **Hua et al.**, 2014; **Unal et al.**, 2014; **Muzhinji et al.**, 2015; **Sharma-Poudyal et al.**, 2015).

Tri ispitivana izolata *Rhizoctonia* spp. AG-G ispoljila su različit stepen virulentnosti nakon inokulacija 14 vrsta biljaka, kao i različitu virulentnost prema istoj biljci. Izolati su prouzrokovali simptome na sejancima svih ispitivanih biljaka, virulentniji su bili prema mrkvi, suncokretu, salati, grašku, šećernoj repi, paradajzu, pasulju i uljanoj repici, a slabije virulentni prema kupusu, krastavcu, pšenici, šećercu, paprici i duvanu. Dobijeni rezultati su očekivani obzirom na to da *Rhizoctonia* spp. AG-G u literaturi opisuje kao polifagni patogen. Slična slabije izražena virulentnost *Rhizoctonia* spp. AG-G na pasulju, paprici i pšenici opisana je i u drugim delovima sveta (**Eken and Demirci**, 2004; **Tuncer and Eken**, 2013; **Unal et al.**, 2014). Izolati iz Srbije pokazali su jaku virulentnost prema biljkama koje pripadaju familiji Asteraceae - suncokretu i zelenoj salati, što je u saglasnosti sa rezultatima iz Brazila (**Kuramae et al.**, 2003; **Fenille et al.**, 2005). Sličnu virulentnost izolata *Rhizoctonia* spp. AG-G na krastavcu ustanovili su i **Demirci and Döken** (1995).

Ispitivani izolat *Rhizoctonia* spp. AG-F prouzrokovao je simptome na sejancima svih ispitivanih biljaka, ali se virulentnost razlikovala. Jača virulentnost ispoljena je prema suncokretu, salati, grašku, pasulju, šećernoj repi, paprici, paradajzu, kupusu i uljanoj repici, a slabija prema mrkvi, krastavcu, pšenici, kukuruzu šećercu i duvanu. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima patogenosti i virulentnosti izolata iz Turske i Kube na pasulju (**Eken and Demirci**, 2004; **Nerey et**

al., 2010), izolata iz Turske na duvanu (**Gurkanli et al.**, 2011), izolata iz Vijetnama na *Brassica* sp. (**Hua et al.**, 2014), kao i izolata iz Irana na šećernoj repi, paradajzu, suncokretu i pšenici (**Alaei et al.**, 2017).

Ispitivani izolat *Rhizoctonia* spp. AG-U prouzrokovao je simptome na sejancima svih ispitivanih biljaka. Jaču virulentnost ispoljio je prema šećernoj repi i uljanoj repici, a slabiju prema suncokretu, salati, grašku, pasulju, mrkvi, kupusu, paradajzu, paprici, krastavcu, pšenici, kukuruzu šećercu i duvanu. Dobijeni rezultati virulentnosti na mrkvi slični su rezultatima u Japanu (**Misawa and Toda**, 2013), gde su izolati AG-U prouzrokovali crnu trulež korena mrkve. *Rhizoctonia* spp. AG-U je do sada opisana na malom broju domaćina, a istraživanja u okviru ove disertacije pružaju prvi detaljniji uvid u patogene osobine *Rhizoctonia* spp. AG-U u svetu.

Ispitivani izolat *R. solani* AG-2-1 prouzrokovao je simptome na sejancima većine ispitivanih biljaka. Jaču virulentnost ispoljio je prema mrkvi, kupusu, paprici i paradajzu, a slabiju prema grašku, pasulju, suncokretu, salati, krastavcu, šećernoj repi, duvanu i uljanoj repici, dok ispitivani izolat AG-2-1 nije bio patogen za pšenicu i kukuruz šećerac. Dobijeni rezultati virulentnosti na kupusu i uljanoj repici u saglasnosti su sa podacima iz literature koji navode da je *R. solani* AG-2-1 tipični patogen *Brassica* spp. (**Carling and Leiner**, 1986), kao i da je patogen mrkve, pasulja, paradajza i graška (**Ferrucho et al.**, 2012), kao i suncokreta (**Postma et al.**, 2010) i duvana (**Kuninaga et al.**, 2000b; **Mercado Cardenas et al.**, 2012). Izolati *R. solani* AG-2-1 iz Srbije, kao i izolati autora **Ferrucho et al.** (2012) iz Kolumbije bili su patogeni za kukuruz, pasulj i grašak. Međutim, njihovi izolati bili su nepatogeni za paradajz, za razliku od izolata iz Srbije.

Dva ispitivana izolata *R. solani* AG-2-2 prouzrokovala su simptome na sejancima svih ispitivanih biljaka, jaču virulentnost ispoljili su prema mrkvi, suncokretu, pasulju, krastavcu, šećernoj repi i paradajzu, a slabiju prema grašku, salati, kupusu, pšenici, kukuruzu šećercu, paprici, duvanu i uljanoj repici. U ovim istraživanjima virulentnost izolata *R. solani* AG-2-2 ispitivana je na većem broju domaćina nego što je do sada opisano u literaturi. Dobijeni rezultati virulentnosti ove AG na pasulju u saglasnosti su sa rezultatima brojnih autora (**Lopez-Olmos et al.**, 2005; **Godoy-Lutz et al.**, 2008; **Nerey et al.**, 2010; **Mora-Umana et al.**, 2013). Ova AG opisana je i kao patogen pšenice i kukuruza (**Pfähler and Petersen**, 2004; **Toda et al.**, 2004), što je takođe u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u ovom radu.

Tri ispitivana izolata *R. solani* AG-3 prouzrokovali su simptome na sejancima većine ispitivanih biljaka. Jaču virulentnost ispoljili su prema paradajzu, duvanu i šećernoj repi, a slabiju prema mrkvi, grašku, pasulju, suncokretu, salati, paprici i uljanoj repici. Na kupusu, krastavcu, pšenici i kukuruzu šećercu nisu prouzrokovali simptome. Dobijeni rezultati virulentnosti ove AG na grašku, pasulju, mrkvi i paradajzu u saglasnosti su sa rezultatima **Ferrucho et al.** (2012) koji su takođe utvrdili da *Poa* sp. i vrste roda *Brassica* nisu domaćini *R. solani* AG-3. Razlika u virulentnosti između izolata *R. solani* AG-3 ispoljila se u pogledu patogenosti za kukuruz šećerac. Izolati iz Srbije nisu uspeli da zaraze kukuruz šećerac, dok **Ferrucho et al.** (2012) navode da je kukuruz domaćin, što se može pripisati različitoj patogenosti izolata različitog geografskog porekla. Dobijeni rezultati virulentnosti *R. solani* AG-3 na paradajzu, duvanu i paprici u saglasnosti su sa rezultatima **Kuninaga et al.** (2010), **Bartz et al.** (2010) i **Tuncer and Eken** (2013).

Šest ispitivanih izolata *R. solani* AG-4 HGI prouzrokovali su simptome na sejancima svih ispitivanih biljaka. Jaču virulentnost ispoljili su prema mrkvi, grašku, pasulju, suncokretu, salati, krastavcu, kupusu, paprici, šećernoj repi i uljanoj repici, a slabiju prema pšenici, kukuruzu šećercu, paradajzu i duvanu. Dobijeni rezultati virulentnosti ove AG na pasulju, paradajzu i duvanu su u saglasnosti sa ranijim rezultatima (**Nerey et al.**, 2010; **Taheri and Pourmahdi**, 2013).

Ispitivani izolat *R. solani* AG-4 HGII prouzrokovao je simptome na sejancima većine ispitivanih biljaka. Jaču virulentnost ispoljio je prema šećernoj repi, paradajzu, paprici, a slabiju prema mrkvi, grašku, pasulju, suncokretu, salati, kupusu, krastavcu, uljanoj repici i duvanu. Izolat nije bio patogen za sejance kukuruza šećerca. Dobijeni rezultati o patogenosti na pasulju, paradajzu i uljanoj repici u saglasnosti sa ranije objavljenim rezultatima (**Budge et al.**, 2009b; **Cebi Kilicoglu and**

Ozkoc, 2013; Taheri and Pourmahdi, 2013), dok za ostale biljke iz eksperimentalnog kruga domaćina nema podataka za poređenje.

Ispitivani izolat *R. solani* AG-6 prouzrokovao je simptome na sejancima svih ispitivanih biljaka. Jaču virulentnost ispoljio je prema grašku, pasulju, krastavcu, a slabiju prema mrkvi, suncokretu, salati, kupusu, pšenici, kukuruzu šećercu, paradajzu, paprici, šećernoj repi, duvanu i uljanoj repici. Dobijeni rezultati virulentnosti ove AG na salati (**Carling et al., 1999**) i paprici (**Tuncer and Eken, 2013**) u saglasnosti su sa ranije objavljenim rezultatima, dok za ostale biljke iz eksperimentalnog kruga domaćina nema podataka za poređenje. Patogenost *R. solani* AG-6 za sve testirane biljne vrste, izuzev paprike i salate, prvi put je dokazana u ovim istraživanjima.

Izolati *W. circinata* var. *zeae* prouzrokovali su simptome na sejancima svih ispitivanih biljaka. Najjaču virulentnost ispoljili su prema mrkvi, grašku, suncokretu, salati, kupusu, uljanoj repici, paradajzu, šećernoj repi, a slabiju prema pasulju, krastavcu, pšenici, kukuruzu šećercu, paprici i duvanu. Dobijeni rezultati o virulentnosti *W. circinata* var. *zeae* na grašku, pasulju, mrkvi, duvanu i šećernoj repi u saglasnosti su sa rezultatima (**Ohkura et al., 2009; Mercado Cardenas et al., 2015; Sharma-Poudyal et al., 2015; Zhao et al., 2019a**), dok ostale biljke nisu ranije testirane.

Virulentnost na lisnim peteljka jagode. U dostupnoj literaturi nema podataka o sličnim eksperimentima za testiranje virulentnosti na peteljka lista jagode ovako velikog broja AG i izolata *Rhizoctonia* spp. Slična metoda inokulacije peteljki listova jagode razvijena je i uspešno korišćena za proveru patogenosti *Rhizoctonia* spp. izolata sa jagode (**Vico, 1994a, b; Vico, 1997**). Ovaj test bio je pogodan za testiranje i upoređivanje virulentnosti različitih izolata *Rhizoctonia* spp., zbog jednostavnog izvođenja i brzog dobijanja rezultata, mogućnosti testiranja velikog broja izolata, ali i zbog mogućnosti da se dobijeni rezultati statistički obrade. Različite *Rhizoctonia* spp. AG ispitivane u ovom radu izazvale su različit intenzitet nekroze i ispitivani izolati su se grupisali u pet grupa, koje su se statistički razlikovale.

Na peteljka lista jagode izolati *Rhizoctonia* spp. AG-A pokazali su izraženu virulentnost. Mada su razlike u virulentnosti između izolata iz Srbije uočene, nisu bile statistički značajne. Odabrani izolat *Rhizoctonia* spp. AG-G ispoljio je srednje jaku virulentnost. U brojnim publikacijama, *Rhizoctonia* spp. AG-G zabeležena je kao patogen jagode (**Martin, 2000; Sharon et al., 2007; Manici and Bonora, 2007; Fang et al., 2013**), ali se opisuje kao slabije virulentna (**Botha et al., 2003**). Na peteljka lista jagode *Rhizoctonia* spp. AG-F ispoljila je slabiju virulentnost u odnosu na ostale AG. **Sharon et al. (2007)** opisali su *Rhizoctonia* spp. AG-F kao patogena jagode, a njihovi izolati AG-F međusobno su se razlikovali po virulentnosti i bili od slabo do jako virulentnih na jagodi. Izolat *Rhizoctonia* spp. AG-U ispoljio je jaku virulentnost. Ova AG nije opisana kao patogen jagode, ili srodnih biljaka, tako da nema rezultata za poređenje virulentnosti sa izolatima iz Srbije. Među višejedarnim AG izraženu virulentnost pokazali su odabrani izolati *R. solani* AG-2-1, AG-2-2 i AG-4 HGI, srednju virulentnost ispoljili izolati *R. solani* AG-4 HGII i AG-6, a slabu izolati *R. solani* AG-3 i *W. circinata* var. *zeae*. Od višejedarnih AG su do sada su kao patogeni jagode opisane *R. solani* AG-4 HGI, AG-4 HGIII i AG-6 (**Botha et al., 2003; Sharon et al., 2007; Manici and Bonora, 2007; Fang et al., 2013**), koje su ispoljile jaku virulentnost.

Virulentnost na isečcima stabla sedam sorti krompira. U dostupnoj literaturi nema podataka o sličnim eksperimentima za testiranje virulentnosti izolata *Rhizoctonia* spp. na različitim sortama krompira, sa izuzetkom slične metode inokulacije isečaka klijanaca koja je uspešno korišćena za proveru patogenosti *Rhizoctonia* spp. izolata sa krompira (**Vico, 1997**). Izolati ispitivanih *Rhizoctonia* spp. AG izazvale su različit intenzitet nekroze i ispitivani izolati su se grupisali u četiri statistički odvojene grupe.

Odabrani izolati *Rhizoctonia* spp. AG-A, AG-G, *R. solani* AG-4 HGI, AG-4 HGII i *W. circinata* var. *zeae* bili su slabo virulentni. U Kini i Južnoafrikoj Republici su *Rhizoctonia* spp. AG-A i AG-G, *R. solani* AG-4 HGI i AG-4 HGII opisane su kao patogeni krompira koji izazivaju pojavu rak-rana na stablu (**Yang and Wu, 2013; Muzhinji et al., 2015; Yang et al., 2015b**). *Rhizoctonia* spp. AG-U i *R. solani* AG-2-2 pokazale su se kao srednje virulentne, a u literaturi su opisane kao manje

virulentne za krompir, gde prouzrokuju lezije na prizemnom delu stabla krompira (**Yang et al.**, 2014; **Muzhinji et al.**, 2015). Kao što je bilo očekivano *R. solani* AG-3 je pokazala najjaču virulentnost na svim sortama krompira, što je u saglasnosti sa navodima da je AG-3 najznačajnija AG na krompiru (**Woodhal et al.**, 2008; **Dass**, 2013; **Muzhinji et al.**, 2015). Zbog različite reakcije sorti krompira koje su uključene u ova istraživanja, ovaj test može da posluži za ocenu njihove relativne osetljivosti. U uslovima postavljenog eksperimenta sorta Crisp4all pokazala je najveći indeks oboljenja, razvijajući najintenzivniju nekrozu, a sorta sa najmanjim indeksom oboljenja bila je Orwell. U literaturi ima ograničen broj podataka o osetljivosti sorti krompira na različite *Rhizoctonia* spp. AG, dok o osetljivosti različitih sorti na *R. solani* AG-3 ima podataka, što je očekivano. Iako postoje podaci da se na krompiru pored *R. solani* AG-3 mogu naći i *Rhizoctonia* spp. AG-A i AG-R, kao i *R. solani* AG-2-1, AG-2-2, AG-4, AG-5 (**Woodhal et al.**, 2008; **Inokuti et al.**, 2018; **Gush et al.**, 2019), poželjno je testirati osetljivost različitih sorti krompira na ove patogene. U radu **Yanar et al.**, 2005 utvrđena je različita virulentnost različitih AG *Rhizoctonia* spp. prilikom testiranja na jednoj sorti krompira. Kao najvirulentnija pokazala se *R. solani* AG-3, a među srednje virulentnim bila je *R. solani* AG-2-2, koja je isti stepen virulentnosti ispoljila i u eksperimentu u ovoj disertaciji. U drugom eksperimentu u radu **Yanar et al.**, 2005 je utvrđeno je da su se kao otporne sorte pokazale Golkoy, Victoria, Resadie, dok su Batum, Carlita i Liseta bile osetljive. U uslovima ovog eksperimenta sorta Liseta ispoljila je srednji indeks oboljenja. U radu **Daami-Remadi et al.** (2008) utvrđeno je da su se sorte Elodia i Spunta pokazale kao relativno otporne, a sorte Alaska i Daisy kao relativno osetljive prilikom napada *R. solani* AG-3.

6.6. Mogućnost biološke kontrole *Rhizoctonia* spp. primenom *Trichoderma harzianum*

Uzimajući u obzir epidemiološke karakteristike vrsta roda *Rhizoctonia*, pre svega izraženu perzistentnost u zemljištu, širenje sadnim materijalom, različitu virulentnost pojedinih AG i širok krug domaćina, na raspolaganju je ograničen broj mera suzbijanja. Dezinfekcija supstrata hemijskim fumigantima i primena fungicida su uobičajene mere koje mogu privremeno da pomognu u sprečavanju razvoja oboljenja i nastajanju šteta u proizvodnji. Međutim, njihova česta i neselektivna primena može da dovede do razvoja rezistentnosti patogena, a povećana zabrinutost zbog mogućeg negativnog uticaja na zdravlje ljudi i životnu sredinu značajno ograničava njihovu primenu. Dodatni problem predstavljaju i razlike u osetljivosti između različitih AG (**Amaradasa et al.**, 2014). Upotreba preparata prirodnog porekla u suzbijanju prouzrokovaca biljnih bolesti poslednjih godina dobija sve više na značaju. U svetu sve širu upotrebu imaju biopreparati na bazi antagonističkih mikroorganizama i supstanci prirodnog porekla. Publikacije koji ukazuju na opravdanost njihove primene umesto konvencionalnih fungicida su brojne (**Abbas et al.**, 2017). U ovom istraživanju, proučavani su efekti antagonističkog izolata *T. harzianum* na izolate iz različitih AG *Rhizoctonia* spp. u *in vitro* i *in vivo* eksperimentima.

Dobijeni izolat 167-17 identifikovan je na osnovu morfoloških i molekularnih osobina. Izolat je obrazovao koloniju zelenkaste boje, sa razgranatim konidioforama i sferičnim konidijama, karakteristično za rod *Trichoderma*, što je u saglasnosti sa rezultatima **Chaverri et al.** (2015). Molekularna identifikacija zasnovana na analizama sekvenci tri gena, ITS regiona rDNA, *rpb2* i *tef-1a*, potvrdila je da se radi o vrsti *T. harzianum*, a navedeni geni su se pokazali pouzdani u karakterizaciji ove vrste, što je u saglasnosti sa rezultatima **Jaklitsch and Voglmayr** (2015).

U *in vitro* ogledu u dualnim kulturama *T. harzianum* i različitih AG *Rhizoctonia* spp. najčešće su bile primetne sledeće makroskopske odlike vreme kontakta, formiranje barijere, promena boje u zoni kontakta i potpuno prerastanje micelije *T. harzianum* preko micelije *Rhizoctonia* spp. U zavisnosti o kojoj AG *Rhizoctonia* spp. se radilo, do kontakta je uglavnom dolazilo između 24 i 48 h, a do prerastanja između 48 i 96 h. Što se tiče mikroskopskih promena, najčešća je bila pojava obmotavanja hifa *T. harzianum* oko hifa *Rhizoctonia* spp. U sličnom eksperimentu u Americi bilo je uočljivo da su jedne od najčešće uočenih karakteristika bile obmotavanje hifa *T. harzianum* oko hifa *Rhizoctonia* spp. i zaustavljanje rasta hifa *Rhizoctonia* spp. (**de la Fuente Prieto**, 1990). *T.*

harzianum je bila agresivnija prema određenim AG u poređenju sa drugima, sa procentom inhibicije u intervalu 3,6-24,1%. U *in vitro* ogledu prema procentu inhibicije, sve ispitivane AG iz Srbije svrstale su se u četiri izdvojene grupe, gde je *Rhizoctonia* spp. AG-U bila sa najmanjim procentom inhibicije i *W. circinata* var. *zeae* sa najvećim procentom inhibicije porasta. Sličnu metodu za ispitivanje osetljivosti izolata *Rhizoctonia* spp. na *Trichoderma* spp. primenili su i **Kumari et al.** (2016). Oni su u svojim istraživanjima imali izolate *Trichoderma* spp. sa sposobnošću inhibicije porasta izolata *Rhizoctonia* spp. od preko 50%.

Uticaj *T. harzianum* u *in vivo* ogledu na biljkama pasulja obuhvatio je ocenjivanje uticaja *T. harzianum* na dve različite AG i njihovu sposobnost da izazovu pojavu nekroze korena i ostalih simptoma na biljkama. Ispitivani izolat *T. harzianum* ispoljio je najjače antagonističko delovanje prema izolatima *Rhizoctonia* spp. AG-G i *R. solani* AG-2-2. Efikasnost se razlikovala u zavisnosti od vremena primene, kod *Rhizoctonia* spp. AG-G efikasnija je bila istovremeno sa inokulacijama, dok je kod *R. solani* AG-2-2 bilo efikasnije primeniti *T. harzianum* sedam dana nakon inokulacija. Delovanje *T. harzianum* bilo je slično kao delovanje fungicida, koji je uključen kao standard, gde su biljke tretirane fungicidom nakon inokulacija *Rhizoctonia* spp. razvile simptome nekroze korena. Sličan eksperiment u uslovima staklenika na biljkama pasulja izveden je i u radu **Mayo et al.** (2015), a rezultati dobijeni u ovom radu su u delimičnoj saglasnosti sa tim da je na biljkama pasulja tretiranim samo izolatima *Rhizoctonia* spp. uvek dolazilo do smanjenja porasta i broja biljaka, dok do smanjenja nije dolazilo u slučaju tretmana biljaka izolatom *Trichoderma* TO19 i izolatom *Rhizoctonia* spp. slično rezultatima dobijenim u novim istraživanjima.

Uticaj *T. harzianum* u *in vivo* ogledu na biljkama mrkve proučavana je kod većeg broja AG. Mrkva je odabrana kao model organizam, jer je u ranijim testovima bila osetljiva na sve AG. Na osnovu broja izniklih biljaka u odnosu na odgovarajuće kontrole *T. harzianum* ispoljila je različitu antagonističku aktivnost prema ispitivanim AG *Rhizoctonia* spp., ali je značajno da je kod većine *Rhizoctonia* sp. AG tretman *T. harzianum* uspeo da smanji uticaj *Rhizoctonia* spp. na klijanje i nicanje semena. Tretman izolatom *T. harzianum* doveo je do smanjenja broja uginulih biljaka i nicanje se kretalo od 8,0% (*Rhizoctonia* spp. AG-G) do 73,6% (*W. circinata* var. *zeae*). Efikasnost *T. harzianum* kretala se od 0% (*Rhizoctonia* spp. AG-A) do 16,10% (*W. circinata* var. *zeae*) i bila je niža u poređenju sa fungicidom, tako da je u uslovima postavljenog eksperimenta, *T. harzianum* ispoljila slab potencijal za korišćenje u sprečavanju pojave bolesti. Sličan eksperiment u stakleniku samo na biljkama paradajza postavljan je i u radu **Montealegre et al.** (2010). Dobijeni rezultati u ovoj disertaciji su u delimično saglasni sa rezultatima **Montealegre et al.** (2010), koji su utvrdili da je na biljkama paradajza prilikom primene izolata *Rhizoctonia* spp. uvek dolazilo do uginuća biljaka i pojave simptoma propadanja korena, za razliku od biljaka koje su tretirane izolatom *Trichoderma*, gde nije zabeleženo uginuće biljaka i pojava simptoma. Pored direktne zaštite od *Rhizoctonia* spp., *Trichoderma* spp. je ispoljila i stimulatívno delovanje, kada je uticala na formiranje većeg broja korenovih žila (**Woo et al.**, 2006; **Montealegre et al.**, 2010; **Hermosa et al.**, 2012).

U toku ovih istraživanja i poređenjem rezultata eksperimenata u laboratoriji i u stakleniku, pokazano je da ne postoji uvek korelacija između dobijenih rezultata, što je u saglasnosti sa rezultatima **Mayo et al.** (2015). Ova istraživanja su pokazala da postoji mogućnost korišćenja *T. harzianum* za suzbijanje vrsta roda *Rhizoctonia*, s tim što su za uspešnost primene neophodna dalja istraživanja. Efikasnost primene *T. harzianum* u suzbijanju različitih AG bila je različita, što predstavlja još jedan razlog za obaveznu identifikaciju patogena do nivoa AG pre preduzimanja bilo kakvih mera suzbijanja.

7. ZAKLJUČAK

U istraživanjima sprovedenim tokom sedmogodišnjeg perioda identifikovano je 11 različitih taksona roda *Rhizoctonia*, prouzrokovaca truleži korena većeg broja biljaka domaćina u Srbiji. Utvrđeno je prisustvo četiri dvojedarne *Rhizoctonia* spp.: AG-A, AG-F, AG-G, AG-U i sedam višejedarnih *R. solani*: AG-2-1, AG-2-2, AG-3, AG-4 HGI, AG-4 HGII, AG-6 i *W. circinata* var. *zeae*. Od navedenih AG u Srbiji su do sada opisane *Rhizoctonia* spp. AG-A, kao i *R. solani* AG-2-2, AG-3, i AG-4 HGII. Ukupno osam AG su novi patogeni u Srbiji, a osam kombinacija AG/biljka domaćin ustanovljeno je prvi put u svetu. Kao prouzrokovaci truleži korena biljaka u Srbiji prvi put su opisane *Rhizoctonia* spp. AG-G, AG-F, AG-U, kao i *R. solani* AG-2-1, AG-4 HGI, AG-4 HGII (na jabuci), AG-6 i *W. circinata* var. *zeae*. Pojava *Rhizoctonia* spp. AG-G na trešnji, AG-U na *Poa* sp., *R. solani* AG-4 HGI na mrkvi i paprici, AG-4 HGII na jabuci, AG-6 na malini, *W. circinata* var. *zeae* na kupusu i uljanjoj repici predstavljaju prve nalaze zabeležene u svetu. Najrasprostranjenije i najznačajnije vrste roda *Rhizoctonia* u Srbiji su *Rhizoctonia* spp. AG-G, *R. solani* AG-3 i *R. solani* AG-4 HGI.

Tokom istraživanja, na teritoriji Srbije pregledano je ukupno 22 useva 13 različitih gajenih biljaka uključujući: jagodu, paradajz, papriku, trešnju, pasulj, jabuku, livadarku jednogodišnju, šećernu repu, krompir, mrkvu, uljanu repicu, kupus i malinu, kao i šest partija krtola krompira. U zavisnosti od useva zabeležena je različita učestalost bolesti od 5 do 35%. Uočeni su simptomi truleži i nekroze korena, sušenja listova, stabla i celih biljaka, koji se nisu mogli dovesti u vezu sa AG koja je prouzrokovac. Sakupljeno je ukupno 330 uzoraka, dobijeno 177 izolata, koji su na osnovu morfoloških karakteristika svrstani u 10 *Rhizoctonia* spp. AG i jedan varijetet *W. circinata* var. *zeae*. Nakon uspešne provere patogenosti urađena je detaljna morfološka karakterizacija na osnovu tipa grananja hifa, broja jedara u hifama, izgleda kolonije, prisustva sklerocija i moniliformnih ćelija, a određena je i brzina porasta svih izolata. Na osnovu uparivanja sa tester izolatima, izolati su svrstani u odgovarajuće AG, što je dalje potvrđeno molekularnom identifikacijom 43 odabrana izolata na osnovu sekvenci šest genskih regiona i odgovarajućih filogenetskih analiza. Generisano je i deponovano ukupno 77 sekvenci različitih *Rhizoctonia* spp. AG.

Dvojedarna *Rhizoctonia* spp. AG-A izolovana je iz biljaka jagode sa pet lokaliteta i predstavlja najznačajniju i najučestaliju AG na jagodi. Ispitivani izolati ispoljili su uniformne morfološke osobine. Izolati su na PDA obrazovali koncentrično zonirane kolonije, ravnog oboda i bele boje i nisu obrazovali sklerocije. Kolonije su brzo rasle, a u ćelijama hifa uočena su po dva jedra. Molekularne analize ITS rDNA, LSU i *tef-1a*, *rpb2* regiona pokazale su pouzdanost. Filogenetskom analizom je utvrđeno postojanje varijabilnosti u okviru ove AG, gde su se izdvojile četiri podgrupe, a izolati iz Srbije grupisali su se u dve podgrupe. U okviru testova virulentnosti utvrđena je jača virulentnost na peteljkama lista jagode, uniformna kod ispitivanih izolata, kao i slabo izražena virulentnost na isećcima stabla krompira. Izolati iz ove AG imaju najuži krug domaćina u odnosu na ostale ispitivane *Rhizoctonia* spp. Krug domaćina ispitivanih izolata *Rhizoctonia* spp. AG-A obuhvata samo mrkvu, pasulj i suncokret.

Dvojedarna *Rhizoctonia* spp. AG-G je izolovana iz trešnje i iz dve povrtarske biljke, paradajza i pasulja, a ovaj rad predstavlja prvi nalaz ove AG, na sva tri domaćina u našoj zemlji, kao i prvi nalaz na trešnji u svetu. Ispitivani izolati ispoljili su uniformne morfološke osobine. Izolati su na PDA obrazovali koncentrično zonirane prvo bež, a kasnije smeđe kolonije, ravnog oboda i na kojima se posle sedam dana obrazuju smeđe sklerocije raspoređene po celoj površini. Kolonije su brzo rasle i u ćelijama mladih hifa bila su prisutna po dva jedra. Molekularne analize ITS rDNA i LSU regiona pokazale su pouzdanost u identifikaciji ove AG, za razliku od *tef-1a* regiona. U okviru testova virulentnosti utvrđena je srednja virulentnost na peteljkama lista jagode i slabo izražena virulentnost na isećcima stabla krompira. Prilikom ispitivanja kruga domaćina, potvrđena je visoka polifagnoz ove AG, jer je izazvala simptome nekroze na mrkvi, suncokretu, salati, grašku, šećernoj

repi, paradajzu, pasulju i uljanoj repici. Slabiju virulentnost izolati ove AG ispoljili su na kupusu, krastavcu, pšenici, šećercu, paprici i duvanu.

Dvojedarna *Rhizoctonia* spp. AG-F je izolovana iz paprike i ovaj rezultat predstavlja prvi nalaz ove AG na paprici u Srbiji. Izolat je na PDA obrazovao koncentrično zoniranu prvo bež, a kasnije svetlosmeđu koloniju, ravnog oboda, u kojoj su posle sedam dana bile uočljive bež sklerocije raspoređene po celoj površini. Kolonija je brzo rasla i u ćelijama hifa uočena su po dva jedra. Molekularne analize ITS rDNA i *rpb2* regiona pokazale su se pouzdanim, dok LSU i *tef-1a* nisu bili pouzdani u identifikaciji. Utvrđena je slaba virulentnost ove AG na peteljkama lista jagode, kao i na isečcima stabla krompira. Pri testiranju kruga domaćina, utvrđena je razlika u intezitetu napada na različite biljke. Jača virulentnost ispoljena je prema suncokretu, salati, grašku, pasulju, šećernoj repi, paprici, paradajzu, kupusu i uljanoj repici, a slabija prema mrkvi, krastavcu, pšenici, kukuruzu šećercu i duvanu.

Dvojedarna *Rhizoctonia* spp. AG-U izolovana je iz biljka jabuke i *Poa* sp. Ovaj rad predstavlja prvi nalaz *Rhizoctonia* spp. AG-U na *Poa* sp. u svetu. Ispitivani izolati ispoljili su uniformne morfološke osobine. Izolati su na PDA obrazovali koncentrično zonirane prvo bež, a kasnije svetlosmeđe kolonije, ravnog oboda, na kojima se posle deset dana obrazuju bež sklerocije raspoređene po celoj površini. Kolonije su brzo rasle i u ćelijama hifa bila su prisutna po dva jedra. Molekularne analize ITS rDNA, *tef-1a* i *atp6* regiona bile su pouzdane, za razliku od LSU koji nije bio pouzdan. Utvrđena je jača virulentnost na peteljkama lista jagode i srednje izražena virulentnost na isečcima stabla krompira. Pri testiranju kruga domaćina, takođe je utvrđena razlika u intezitetu napada na različite biljke. Izolati su ispoljili jaču virulentnost prema šećernoj repi i uljanoj repici, a slabiju prema suncokretu, salati, grašku, pasulju, paradajzu, paprici, mrkvi, kupusu, krastavcu, pšenici, kukuruzu šećercu i duvanu.

Višejedarna *R. solani* AG-2-1 izolovana je sa paprike što je ujedno i prvi nalaz *R. solani* AG-2-1 u Srbiji. Na PDA izolat je obrazovao koncentrično zoniranu prvo bež, a zatim svetlosmeđu koloniju, na kojoj se posle sedam dana obrazuju smeđe sklerocije raspoređene po celoj površini. U ćelijama hifa uočeno je više jedara, najčešće od četiri do sedam. Molekularne analize ITS rDNA, *tef-1a* i *rpb2* regiona pokazale su se pouzdanim, za razliku od LSU koji nije bio pouzdan. Utvrđena je izražena virulentnost na peteljkama lista jagode i srednja virulentnost na isečcima stabla krompira. Prilikom ispitivanja kruga domaćina, utvrđena je virulentnost prema mrkvi, kupusu, paprici i paradajzu, a slabija prema grašku, pasulju, suncokretu, salati, krastavcu, pšenici, šećernoj repi, duvanu i uljanoj repici, a kukuruz šećerac nije bio domaćin ove AG.

Višejedarna *R. solani* AG-2-2 izolovana je iz korena šećerne repe. Izolati su ispoljili uniformne morfološke odlike i na PDA su obrazovali prvo žute, zatim smeđe kolonije, na kojima se posle sedam dana obrazuje smeđe sklerocije raspoređene po obodu kolonije. Kolonije su brzo rasle i u ćelijama hifa uočavano je više jedara, najčešće od tri do pet. Molekularne analize ITS rDNA i *rpb2* regiona bile su pouzdane, dok *tef-1a* nije uspeo da razdvoji različite AG. Utvrđena je jača virulentnost na peteljkama lista jagode i srednje izražena virulentnost na isečcima stabla krompira. Pri testiranju kruga domaćina, takođe je utvrđena razlika u intenzitetu napada na različite biljke. Izolati su ispoljili uniformnu virulentnost i to jaču prema mrkvi, suncokretu, pasulju, krastavcu, šećernoj repi i paradajzu, a slabiju prema grašku, salati, kupusu, pšenici, kukuruzu šećercu, paprici, duvanu i uljanoj repici.

Višejedarna *R. solani* AG-3 izolovana je sa krtola krompira. Do sada je u Srbiji ova AG na krompiru pominjana samo u preglednim radovima, a u okviru ove disertacije je identifikovana, a izolati su okarakterisani. Ispitivani izolati ispoljili su uniformne morfološke osobine. Na PDA su obrazovali svetlosmeđe kolonije koje vremenom tamne, ravnog oboda, na kojima se posle sedam dana obrazuju smeđe sklerocije raspoređene po celoj koloniji. Kolonije su brzo rasle i u ćelijama hifa bilo je prisutno više jedara, najčešće od četiri do šest. Molekularne analize ITS rDNA, LSU, *rpb2* i *tef-1a* regiona bile su pouzdane. Filogenetske analize su ukazale na postojanje varijabilnosti u okviru ove AG. Utvrđena je slaba virulentnost na peteljkama lista jagode i jaka virulentnost na

isečcima stabla krompira. Prilikom ispitivanja kruga domaćina, utvrđena je jača virulentnost izolata prema paradajzu, duvanu i šećernoj repi, a slabija prema mrkvi, grašku, pasulju, suncokretu, salati, krastavcu, paprici, pšenici i uljanoj repici, dok kukuruz šećerac i kupus nisu bili domaćini ove AG.

Višejedarna *R. solani* AG-4 HGI detektovana je na paprici, kupusu, uljanoj repici i mrkvi i ovaj rezultat predstavlja prvi nalaz *R. solani* AG-4 HGI na mrkvi i paprici u svetu. Ispitivani izolati ispoljili su uniformne morfološke osobine. Na PDA obrazovali su bež kolonije koje postepeno tamne, ravnog oboda, sa zrakastim delovima svetlosmeđe boje, na kojima se posle 10 dana obrazuju bež sklerocije raspoređene po obodu kolonije. Kolonije su brzo rasle i u ćelijama hifa uočavano je više jedara, najčešće od četiri do osam. Molekularne analize ITS rDNA, LSU, *tef-1a* i *rpb2* regiona su pouzdane u identifikaciji ove AG. Filogenetskom analizom utvrđeno je postojanje varijabilnosti, izolati su se grupisali u dve odvojene podgrupe. Utvrđena je jača virulentnost na peteljka lista jagode i slaba virulentnost na isečcima stabla krompira. Pri testiranju kruga domaćina, potvrđena je polifagna priroda ove AG, na osnovu pojave simptoma na svih 14 ispitivanih biljaka. Utvrđena je razlika u intezitetu napada na različite biljke, među kojima je ova AG ispoljila najjaču virulentnost na uljanoj repici, kupusu, zelenoj salati, suncokretu, šećernoj repi i pasulju, a slabiju na kupusu, paprici, paradajzu, mrkva, grašak, duvan, pšenici i kukuruzu šećercu.

Višejedarna *R. solani* AG-4 HGII izolovana je sa jabuke, što je prvi nalaz na novom domaćinu u svetu. Ispitivani izolat je na PDA obrazovao prvo bež, a kasnije svetlosmeđu koloniju, na kojoj se posle 10 dana obrazuju bež sklerocije raspoređene po obodu. Kolonija je brzo rasla i u ćelijama hifa uočavano je više jedara, najčešće od četiri do sedam. Genski regioni ITS rDNA, LSU, *tef-1a* i *rpb2* bili su pouzdani u identifikaciji ove AG. Utvrđena je srednja virulentnost na peteljka lista jagode i slabo izražena virulentnost na isečcima stabla krompira. Prilikom ispitivanja kruga domaćina, utvrđena je jača virulentnost prema šećernoj repi, paradajzu, paprici, a slabija prema mrkvi, grašku, pasulju, suncokretu, salati, pšenici, kupusu, krastavcu, uljanoj repici i duvanu, dok kukuruz šećerac nije bio domaćin ove AG.

Višejedarna *R. solani* AG-6 identifikovana je na malini u Srbiji i to je prvi nalaz *R. solani* AG-6 na malini u svetu. Ispitivani izolat je na PDA obrazovao prvo svetlosmeđu, a kasnije tamnu koloniju, ravnog oboda, na kojoj se posle 10 dana obrazuju smeđe sklerocije po obodu kolonije. Kolonija je brzo rasla i u ćelijama hifa uočeno je više jedara, najčešće od tri do pet. Genski regioni ITS rDNA, LSU i *rpb2* bili su pouzdani u identifikaciji ove AG, za razliku od *tef-1a* koji nije bio pouzdan. U okviru testova virulentnosti utvrđena je srednja virulentnost na peteljka lista jagode i slabo izražena virulentnost na isečcima stabla krompira. Pri testiranju kruga domaćina, utvrđena je razlika u intezitetu napada na različite biljke. Izolati su jaču virulentnost ispoljili prema grašku, pasulju, krastavcu, a slabiju prema mrkvi, suncokretu, salati, kupusu, pšenici, kukuruzu šećercu, paradajzu, paprici, šećernoj repi, duvanu i uljanoj repici.

Višejedarna *W. circinata* var. *zeae* izolovana je sa kupusa i uljane repice, što predstavlja prvi nalaz *W. circinata* var. *zeae* na kupusu i uljanoj repici u svetu, a takođe i prvi nalaz *W. circinata* var. *zeae* na dikotiledonim biljkama u Evropi. Ispitivani izolati ispoljili su uniformne morfološke osobine. Na PDA su obrazovali bež kolonije, koje vremenom postaju svetlonarandžaste boje, ravnog oboda, na kojima se posle 15 dana obrazuju narandžaste sklerocije raspoređene po celoj koloniji. Kolonije su brzo rasle i u ćelijama hifa uočavano je više jedara, najčešće od četiri do sedam. Molekularne analize ITS rDNA, LSU, *rpb2* i β -*tubulin* regiona su pouzdane u identifikaciji ove AG. Filogenetska analiza potvrdila je postojanje dve grupe u okviru varijeteta *zeae* u svetu, gde su se izolati iz Srbije grupisali u prvu grupu sa srodnim izolatima poreklom sa dikotiledonih biljka. Utvrđena je slaba virulentnost na peteljka lista jagode i slabo izražena virulentnost na isečcima stabla krompira. Utvrđena je uniformna, jača virulentnost izolata prema mrkvi, grašku, suncokretu, salati, kupusu, uljanoj repici, paradajzu, šećernoj repi, a slabija prema pasulju, krastavcu, pšenici, kukuruzu šećercu, paprici i duvanu.

U okviru ove disertacije razvijena su i dva protokola za direktnu detekciju određenih AG *Rhizoctonia* spp., primenom specifičnih prajmera u PCR metodi i qPCR za detekciju *R. solani* AG-

2-2. Protokol primenom specifičnih prajmera je u zavisnosti od AG, pokazao različitu pogodnost za rutinsku primenu u detekciji. Nakon provere specifičnosti za 11 AG iz Srbije, utvrđeno je da se protokol može primenjivati za osam. Razvijen je i qPCR protokol za specifičnu detekciju *R. solani* AG-2-2, koji je brz, jednostavan i oko 100x osetljiviji od odgovarajućeg konvencionalnog PCR protokola. Ovi rezultati predstavljaju doprinos razvoju brže, specifične i osetljivije dijagnostike različitih *Rhizoctonia* spp. AG u našoj zemlji i pogodni su za primenu, kao rutinski dijagnostički testovi, što predstavlja osnov za preduzimanje odgovarajućih mera suzbijanja.

U okviru istraživanja mogućih mera suzbijanja *Rhizoctonia* spp. izdvojen je, identifikovan i molekularno okarakterisan izolat 167-17 *T. harzianum* sa ispoljenom biološkom aktivnošću prema različitim *Rhizoctonia* spp. AG iz Srbije. Generisane su i deponovane sekvence tri genska regiona *T. harzianum*. U oglelima *in vitro* dokazane su različite međusobne makroskopske reakcije, od formiranja vidljive micelijarne barijere do prerastanja, dok su od mikroskopskih promena najčešće bile prisustne obmotavanje i paralelni rast hifa. Biološka aktivnost izolata 167-17 *T. harzianum* dokazana je i u dva *in vivo* oglela, gde je uočena različita efikasnost u zavisnosti od AG *Rhizoctonia* spp.: najveća efikasnost zabeležena je prema *R. solani* AG-2-1, AG-2-2 i *W. circinata* var. *zeae*.

8. LITERATURA

- Abawi, G. S., and Martin, S. B. (1985): *Rhizoctonia* foliar blight of cabbage in New York State. *Plant Disease*, 69: 158-161.
- Abbas, J. S., Bashir, A., Karlovsky, P. (2014): Real-time PCR (QPCR) assay for *Rhizoctonia solani* anastomoses group AG-2-2IIIB. *Pakistan Journal of Bototany*, 46: 353-356.
- Abbas, A., Jiang, D., Fu, Y. (2017): *Trichoderma* spp. as Antagonist of *Rhizoctonia solani*. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*, 8: 402.
- Abd-Elsalam, K. A., Moslem, M. A., Bahkali, A. H. (2009): First morpho-molecular identification of *Rhizoctonia solani* AG-7 from potato tuber-borne sclerotium in Saudi Arabia *African Journal of Microbiology Research*, 3: 952-956.
- Agrios, G. N. (2005): *Plant pathology* Fifth edition ed. New York: Elsevier Academic Press.
- Aktaruzzaman, M., Kim, J. Y., Afroz, T., Kim, B. S. (2015): First Report of Web Blight of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) Caused by *Rhizoctonia solani* AG-1-IB in Korea. *Mycobiology*, 43: 170-173.
- Alaei, H., Molaei, S., Mahmoodi, S. G., Saberi-Riseh, R. (2017): New Anastomosis Group F (AG-F) of binucleate *Rhizoctonia* causing root and stem rot of *Pistacia vera*. *Journal of Crop Protection*, 6: 1-13.
- Aleksić, Ž. i Aleksić, D. (1976): Najvažniji problem zaštite paprika, paradajza i plavog patlidžana od biljnih bolesti. *Zaštita bilja, poseban broj*: 87-93. Jugoslovenski simpozijum o zaštiti bilja, Kragujevac, 03-05. novembar 1976.
- Amaradasa, B. S., Horvath, B. J., Lakshman, D. K., Warnke, S. E. (2013): DNA fingerprinting and anastomosis grouping reveal similar genetic diversity in *Rhizoctonia* species infecting turfgrasses in the transition zone of USA. *Mycologia*, 105: 1190–1201.
- Amaradasa, B. S., Lakshman, D. K., McCall, D. S., Horvath, B. J. (2014): *In vitro* fungicide sensitivity of *Rhizoctonia* and *Waitea* isolates collected from turfgrasses. *Journal of Environmental Horticulture*, 32(3): 126-132.
- Anderson, N. A. (1982): The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani*. *Annual Review of Phytopathology*, 20: 329-347.
- Anderson, T. F. and Stalpers, J. A. (1994): A check-list of *Rhizoctonia* epithets. *Mycotaxon*, 51: 437-457.
- Anderson, J. R., Bentley, S., Irwin, J. A. G., Mackie, J. M., Neate, S., Pattemore, J. A. (2004): Characterisation of *Rhizoctonia solani* isolates causing root canker of lucerne in Australia. *Australasian Plant Pathology*, 33: 241–247.
- Anees, M., Tronsmo, A., Edel-Hermann, V., Hjeljord, L. G., Héraud, C., Steinberg, C. (2011): Characterization of field isolates of *Trichoderma* antagonistic against *Rhizoctonia solani*. *Fungal Biology*, 114: 91-701.
- Anguiz, R. and Martin, C. (1988): Anastomosis groups, pathogenicity, and other characteristics of *Rhizoctonia solani* isolated from potatoes in Peru. *Plant Disease*, 73: 199-201.
- Arakawa, M. and Inagaki, K. (2014): Molecular markers for genotyping anastomosis groups and understanding the population biology of *Rhizoctonia* species. *Journal of General Plant Pathology*, 80: 401–407.

- Aydin, E. B., Gurkanlı, C. T., Ozkoc, I., Demirci, E., Erper, I., Karaca, G., Hsieh, T., Vajna, L., Poltronieri, L. S. (2013): rDNA-ITS Diversity of *Waitea circinata* var. *zeae* (Anamorph: *Rhizoctonia zeae*). *Journal of Plant Pathology*, 95: 587-595.
- Baird, R. E. and Carling, D. E. (1995): First report of *Rhizoctonia solani* AG-7 in Indiana. *Plant Disease*, 79: 321.
- Baird, R. E. (1996): First report of *Rhizoctonia solani* AG-4 on canola in Georgia. *Plant Disease*, 80: 104.
- Banville, G. J. (1989): Yield losses and damage to potato plants caused by *Rhizoctonia solani* Kühn. *American Journal of Potato Research*, 66: 821–834.
- Banville, G. J., Carling, D. E., and Otrysko, B. E. (1996): *Rhizoctonia* disease on Potato. In *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology in Disease Control, 321-323, B. Sneh et al., Kluwer Academic Publishers.
- Barrera, V. A., Gutiérrez, S., Cúndom, M. A., Gasonia, A. L. (2014): Nuclear acridine orange fluorescence in *Rhizoctonia* isolates from rice. *Revista Argentina de Microbiología*, 47: 167-169.
- Bartz, F. E., Cubeta, M. A., Toda, T., Naito, S., Ivors, K. L. (2010): An in planta method for assessing the role of basidiospores in *Rhizoctonia* foliar disease of tomato. *Plant Disease*, 94: 515-520.
- Basseto, M. A., Chagas, H. A., Rosa, D. D., Zanotto, M. D., Furtado, E. L. (2008). First report of *Rhizoctonia solani* AG4 HG-II attacking castor bean plants (*Ricinus communis*) in Brazil and evaluation of two castor bean cultivars for resistance to damping-off. *Australasian Plant Disease Notes*, 3: 121–123.
- Belka, M. and Manka, M. (2014): Characteristics and diversity of *Rhizoctonia* spp. population in soil of selected forest bare-root nurseries in Poland. *Acta Mycologica*, 49: 279–290.
- Berkeley, G. H. (1936): Root rots of the raspberry. *Canadian Journal of Research*, 14: 306-317.
- Bernardes de Assis, J., Peyer, P., Rush, M. C., Zala, M., McDonald, B. A., Ceresini, P. C. (2008): Divergence between sympatric rice- and soybean-infecting populations of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-1 IA. *Phytopathology*, 98: 1326-1333.
- Blanco, A. J. V., Costa, M. O., Silva, R. D. N., Suzart de Albuquerque, F., Melo, A. T. D. O., Lopes, F. A. C., Junior, M. L. (2018): Diversity and pathogenicity of *Rhizoctonia* species from the Brazilian Cerrado. *Plant Disease*, 102: 773-781.
- Bolkan, H. A. and Ribeiro, W. R. C. (1985): Anastomosis groups and pathogenicity of *Rhizoctonia* isolates from Brazil. *Plant Disease*, 69: 599-601.
- Bolton, M. D., Panella, L., Campbell, L., Khan, M. F. R. (2010): Temperature, moisture, and fungicide effects in managing *Rhizoctonia* root and crown rot of sugar beet. *Phytopathology*, 100: 689-697.
- Botha, A., Denman, S., Lamprecht, S. C., Mazzola, M., and Crous, P. W. (2003): Characterisation and pathogenicity of *Rhizoctonia* isolates associated with black root rot of strawberries in the Western Cape Province, South Africa. *Australasian Plant Pathology*, 32: 195-201.
- Brewer, M. T. and Larkin, R. P. (2005): Efficacy of several potential biocontrol organisms against *Rhizoctonia solani* on potato. *Crop Protection*, 24: 939-950.

- Broders, K. D., Parker, M. L., Melzer, M. S., Boland, G. J. (2014): Phylogenetic diversity of *Rhizoctonia solani* associated with canola and wheat in Alberta, Manitoba, and Saskatchewan. *Plant Disease*, 98: 1695-1701.
- Budge, G. E., Shawb, M. V., Colyera, A., Pietravallea, S., Boonhama, N. (2009a): Molecular tools to investigate *Rhizoctonia solani* distribution in soil. *Plant Pathology*, 58: 1071–1080.
- Budge, G., Shaw, M. W., Lambourne, C., Jennings, P., Clayburn, R., Boonham, N., McPherson, M. (2009b): Characterization and origin of infection of *Rhizoctonia solani* associated with *Brassica oleracea* crops in the UK. *Plant Pathology*, 58, 1059–1070.
- Burpee, L. L., Siers, P. L., Cole, H. Jr., Sherwood, R. T. (1980a): Anastomosis groups among isolates of *Ceratobasidium kukuruzigerum* (Bourd.) Rogers and related fungi. *Mycologia*, 72: 689–701.
- Burpee, L. L., Siers, P. L., Cole, H. Jr., Sherwood, R. T. (1980b): Pathogenicity of *Ceratobasidium kukuruzigerum* and related fungi representing four anastomosis groups. *Phytopathology*, 70: 843–846.
- Campion, C., Chatot, C., Perraton, B. and Andrivon, D. (2003): Anastomosis groups, pathogenicity and sensitivity to fungicides of *Rhizoctonia solani* isolates collected on potato crops in France. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 983–992.
- Carbone, I., and Kohn, L. M. (1999): A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91: 553-556.
- Carling, D. E., and Leiner, R. H. (1986): Isolation and characterzation of *Rhizoctonia solani* and binuclear *R. solani*-like fungi from aerial stems and subterranean organs of potato plants. *Phytopathology*, 76: 725-729.
- Carling, D. E., Kuninaga, S., Leiner, R. H. (1988): Relatedness within and among intraspecific groups of *Rhizoctonia solani*: A comparison of grouping by anastomosis and by DNA hybridization. *Phytoparasitica*, 16: 209-210.
- Carling, D. E. and Sumner, D. R. (1992): *Rhizoctonia*. In: *Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi* (eds. Singleton, L. L., Mihail, J. D. and Rush, C. M.), 157–165. American Phytopathological Society: St. Paul, MN, USA.
- Carling, D. E., Rothrock, C. S., MacNish, G. C., Sweetingham, M. W., Brainard, K. A., Winters, S. W. (1994): Characterisation of anastomosis group 11 (AG-11) of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, 84: 1387–1393.
- Carling, D. E. (1996): Grouping in *Rhizoctonia solani* by hyphal anastomosis interactions in *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology. In: *Disease Constrol*, 37-47, B. Sneh et al., Kluwer Academic Publishers.
- Carling, D. E., Pope, E. J., Brainard, K. A., Carter, D. A. (1999): Characterization of mycorrhizal isolates of *Rhizoctonia solani* from an orchid, including AG-12, a new anastomosis group. *Phytopatolgy*, 89: 942-946.
- Carling, D. E., Kuninaga, S., Brainard, K. A. (2002a): Hyphal anastomosis reactions, rDNA-internal transcribed spacer sequences, and virulence levels among subsets of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-2 (AG-2) and AG-BI. *Phytopathology*, 92: 43-50.
- Carling, D. E., Baird, R. E., Gitaitis, R. D., Brainard, K. A., Kuninaga, S. (2002b): Characterization of AG-13, a newly reported anastomosis group of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, 92: 893-899.

- Cebi Kilicoglu, M. and Ozkoc, I. (2013): Phylogenetic analysis of *Rhizoctonia solani* AG-4 isolates from common beans in Black Sea coastal region, Turkey, based on ITS-5.8S rDNA. Turkish Journal of Biology, 37: 18-24.
- Chavarro-Mesa, E., Ceresini, P., Molina, L., Pereira, D., Schurt, D., Vieira, J., Poloni, N., McDonald, B. (2015): The Urochloa foliar blight and collar rot pathogen *Rhizoctonia solani* AG-1 IA emerged in South America via a host shift from rice. Phytopathology, 105: 1475-1486.
- Chaverri, P., Branco-Rocha, F., Jaklitsch, W., Gazis, R., Degenkolb, T., Samuels, G. J. (2015): Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. Mycologia, 107: 558–590.
- Ciampi, M. B., Meyer, M. C., Costa, M. J. N., Zala, M., McDonald, B. A., Ceresini, P. C. (2008): Genetic Structure of Populations of *Rhizoctonia solani* Anastomosis Group-1 IA from Soybean in Brazil. Phytopathology, 98: 932-941.
- Ciampi, M. B., Rosewich Gale, L., de Macedo Lemos, E. G., Ceresini, P. C. (2009): Distinctively variable sequence-based nuclear DNA markers for multilocus phylogeography of the soybean- and rice-infecting fungal pathogen *Rhizoctonia solani* AG-1 IA. Genetics and Molecular Biology, 32: 840-846.
- Cubeta, M. A., Echii, E., Abernethy, T., Vilgalys, R. (1991): Characterization of anastomosis groups of binucleate *Rhizoctonia* species using restriction analysis of an amplified ribosomal RNA gene. Phytopathology, 81: 1395–1400.
- Daami-Remadi, M., Zammouri, S., Mahjoub, M. (2008): Relative susceptibility of nine potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars to artificial and natural infection by *Rhizoctonia solani* as measured by stem canker severity, black scurf and plant growth. African Journal of Plant Science and Biotechnology, 2: 57-66.
- Dass, S. (2013): *Rhizoctonia solani* on potato in New Zealand: Pathogen characterisation and identification of double-stranded RNA viruses that may affect their virulence. Doctoral dissertation. Lincoln University.
- Dass, S., Shah, F. A., Butlera, R. C., Falloonab, R. E., Stewartb, A., Raikarb, S., Pitman, A. R. (2013): Genetic variability and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* associated with black scurf of potato in New Zealand. Plant Pathology, 63: 651-666.
- de la Cerda, K., Douhan, G. W., Wong, F. P. (2007): Discovery and characterization of *Waitea circinata* var. *circinata* affecting annual bluegrass from the Western United States. Plant Disease, 91: 791-797.
- de la Fuente Prieto, M. (1990): Interactions of *Rhizoctonia solani* Kühn and *Trichoderma* spp. populations in soil. Doctoral Dissertation. Iowa State University.
- Demirci E. and Döken M. T. (1995): Anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* Kühn and binucleate *Rhizoctonia* isolates from various crops in Türkiye. The Journal of Turkish Phytopathology, 24: 57-62.
- Demirci, E. (1998): *Rhizoctonia* species and anastomosis groups isolated from barley and wheat in Erzurum, Turkey. Plant Pathology, 47: 10-15.
- Dhingra, O. and Sinclair, J. (1986): Basic Plant Pathology Methods. 2nd Edition, CRC Press, Boca Raton.
- Dolovac, N. (2011): Rđasta mrežavost plodova breskve u Srbiji – etiologija i suzbijanje. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu - Poljoprivredni fakultet.

- Dong, W., Li, Y., Duan, C., Li, X., Naito, S., Conner, R. L., Yang, G., Li, C. (2017): Identification of AG-V, a new anastomosis group of binucleate *Rhizoctonia* spp. from taro and ginger in Yunnan province. *European Journal of Plant Pathology*, 148.
- Druzhinina, I. and Kubicek, C. P. (2005): Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? *Journal of Zhejiang University Science*, 6: 100-112.
- Druzhinina, I. S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B. A., Kenerley, C. M. (2011): *Trichoderma*: The genomics of opportunistic success. *Nature Review Microbiology*, 9: 749-759.
- Eken, C. and Demirci, E. (2004): Anastomosis groups and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia* isolates from bean in Erzurum. *Turkey Journal of Plant Pathology*, 86: 49-52.
- Eken, C. and Tuncer, S. (2019): *Rhizoctonia* Species and Anastomosis Groups Isolated from Tomato and Cucumber in Erzincan, Turkey. *International Journal of Research in Agriculture and Forestry*, 6: 26-31.
- El Fiky, Z., Fouly, H., Martin, B. (2011): Genetic Diversity of *Waitea circinata* var. *zeae* in South Carolina Revealed by Amplified Fragment Length Polymorphism (Aflp). *Egyptian Journal of Genetics And Cytology*, 40: 145-159.
- Erper, I. I., Karaca, G. H., Ozkoc, I. I. (2005): First report of root rot of bean and soybean caused by *Rhizoctonia zeae* in Turkey. *Plant Disease*, 89: 203.
- Erper, I. I., Karaca, G. H., Turkkan, M. M., Ozkoc, I. I. (2006): Characterization and Pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. from Onion in Amasya, Turkey. *Journal of Phytopathology*, 154: 75–77.
- Erper, I., Ozkoc, I., Karaca, G. (2011): Identification and pathogenicity of *Rhizoctonia* species isolated from bean and soybean plants in Samsun, Turkey. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 44: 78-84.
- Erper, I., Cebi Kilicoglu, M., Turkkan, M., Onder, H. (2016): Characterization and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. isolated from winter squash in the Black Sea region of Turkey. *European Journal of Plant Pathology*, 146: 683–697.
- Fang, X., Finnegan, P. M., Barbetti, M. J. (2013): Wide Variation in Virulence and Genetic Diversity of Binucleate *Rhizoctonia* Isolates Associated with Root Rot of Strawberry in Western Australia. *PLoS ONE*, 8: e55877.
- Fenille, R. C., Ciampi, M. B., Kuramae, E. E., Souza, N. L. (2002): Identification of *Rhizoctonia solani* associated with soybean in Brazil by rDNA-ITS sequences. *Fitopatologia Brasileira*, 28:413-419.
- Fenille, R. C., Ciampi, M. B., Souza, N. L., Nakataniand, A. K., Kuramae, E. E. (2005): Binucleate *Rhizoctonia* sp. AG-G causing rot rot in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) in Brazil. *Plant Pathology*, 54: 325-330.
- Ferrucho, R. L., Cifuentes, J. M., Ceresini, J. M., García-Domínguez, C. (2012): *Rhizoctonia solani* AG-3PT is the major pathogen associated with potato stem canker and black scurf in Colombia. *Agronomía Colombiana*, 30: 204-213.
- Flentje, N. T., Stretton, H. M., Hawn, E. J. (1963): Nuclear distribution and behaviour throughout the life cycles of *Thanatephorus*, *Waitea* and *Ceratobasidium* species. *Australian Journal of Biological Sciences*, 16: 450-467.

- Garcia, V. G., Onco, M. A. P., Susan, V. R. (2006): Review. Biology and systematics of the form genus *Rhizoctonia*. Spanish Journal of Agricultural Research, 4: 55-79.
- Gardes, M. and Bruns, T. D. (1993): ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. Molecular Ecology, 2:113-118.
- Gaskill, J. O. (1968): Breeding for *Rhizoctonia* resistance in sugar beet. Journal of the American Society of Sugar Beet Technologists, 15: 107-119.
- Godoy-Lutz, G., Kuninaga, S., Steadman, J. R., Powers, K. (2008): Phylogenetic analysis of *Rhizoctonia solani* subgroups associated with web blight symptoms on common bean based on ITS-5.8S rDNA. Journal of General Plant Pathology, 74: 32-40.
- Gomez de Barreda, D., De Luca, V., Ramón-Albalat, A., León, M., and Armengol, J. (2019): First Report of Dollar Spot caused by *Claviceps jacksonii* and Brown Ring Patch caused by *Waitea circinata* var. *circinata*, on *Agrostis stolonifera* in Spain. Plant Disease, 103:1771.
- Gondal, A. S., Rauf, A., Naz, F. (2019): Anastomosis Groups of *Rhizoctonia solani* associated with tomato foot rot in Pothohar Region of Pakistan. Scientific Reports, 9: 3910.
- Gonzalez, D. (1992): Classification of plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani* (Basidiomycotina: Tulasnellales) using ribosomal DNA sequence data. Master Thesis, Duke University, Durham.
- Gonzalez, D., Carling, D. E., Kuninaga, S., Vilgalys, R., Cubeta, M. A. (2001): Ribosomal DNA systematics of *Ceratobasidium* and *Thanatephorus* with *Rhizoctonia* anamorphs. Mycologia, 93: 1138-1150.
- Gonzalez, D., Cubeta, M. A., Vilgalys, R. (2006): Phylogenetic utility of indels within ribosomal DNA and beta-*tubulin* sequences from fungi in the *Rhizoctonia solani* species complex. Molecular Phylogenetics and Evolution, 40: 459-470.
- Gonzalez, D., Rodriguez-Carres, M., Boekhout, T., Stalpers, J., Kuramae, E. E., Nakatani, A. K., Vilgalys, R., Cubeta, M. A. (2016): Phylogenetic relationships of *Rhizoctonia* fungi within the Cantharellales. Fungal Biology, 120: 603-619.
- Guleria, S., Aggarwal, R., Thind, T. S., Sharma, T. R. (2007): Morphological and Pathological Variability in Rice Isolates of *Rhizoctonia solani* and Molecular Analysis of their Genetic Variability. Journal of Phytopathology, 155: 654-661.
- Gunnell, P. S. (1986): Characterization of the teleomorphs of *Rhizoctonia oryzae-sativae*, *Rhizoctonia oryzae*, and *Rhizoctonia zae*, and the effect of cultural practices on aggregate sheath spot of rice, caused by *Rhizoctonia oryzae-sativae*. Doctoral dissertation. University of California, Davis.
- Gurkanli, C. Aydin, E. B., Demirci, E., Erper, İ. Karaca, G, Hsieh, T., Poltronieri, L. S., Özkoç, I. (2016): 18S rDNA and β -*tubulin* diversity in *Rhizoctonia zae* Voorhees. Pakistan Journal of Botany, 48: 645-651.
- Gurkanli, C. T. and Ozkoc, I. (2011): First Report of B.N. *Rhizoctonia* from Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) in Samsun. Turkish Journal of Botany, 43: 51-57.
- Gush, S, Muzhinji, N, Truter, M, van der Waals, J. E. (2019): First Report of *Rhizoctonia solani* AG 2-2IIIB Causing Elephant Hide on Potato Tubers in South Africa. Plant Disease, 103: 50.
- Haddadrafshi, N., Halász, K., Pósa, T., Péter, G., Hrotkó, K., Gáspár, L.1, Lukács, N. (2011): Diversity of endophytic fungi isolated from cherry (*Prunus avium*). Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology, 15: 1-6.

- Hall, M., Lawrence, K., Shannon, D., Gonzalez, T., Newman, M. (2019): First Report of Binucleate *Rhizoctonia* AG-G on Common Turmeric (*Curcuma longa*) in the United States. *Plant Disease*, 103: 771.
- Hannukkala, A. O., Rastas, M., Laitinen, P., Latvala, S. (2016): *Rhizoctonia solani* injuries in oilseed crops in Finland and impacts of different crop management practices on disease incidence and severity. *Annals of Applied Biology*, ISSN 0003-4746.
- Harveson, R. M., Hanson, L. E., Hein, G. L. (2009): Compendium of beet diseases and pests. St. Paul, MN: American Phytopathological Society Press.
- Hayakawa, S., Uetake, Y., Ogoshi, A. (1999): Identification of symbiotic *Rhizoctonia* from naturally occurring protocorms and roots of *Dactylorhiza aristata* (*Orchidaceae*). *Journal of the Faculty of Agriculture Hokkaido University*, 69: 129-141.
- Hayakawa, T., Toda, T., Ping, Q., Mghalu, J. M., Yaguchi, S., and Hyakumachi, M. (2006): A new subgroup of *Rhizoctonia* AG-D, AG-D III, obtained from Japanese zoysia grass exhibiting symptom of a new disease. *Plant Disease*, 90: 1389-1394.
- Haygood, R. A. and Martin, S. B. (1990): Characterization and pathogenicity of species of *Rhizoctonia* associated with centipedegrass and St. Augustinegrass in South Carolina. *Plant Disease*, 74: 510-514.
- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I. and Monte, E. (2012). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*, 158: 17–25.
- Herr, L. J. (1979): Practical nuclear staining procedures for *Rhizoctonia* like fungi. *Phytopathology*, 69: 958-961.
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P. M., Lucking, R., Lumbsch, H. T., Lutzoni, F., Matheny, P. B., McLaughlin, D. J., Powell, M. J., Redhead, S., Schoch, C. L., Spatafora, J. W., Stalpers, J. A., Vilgalys, R., Aime, M. C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G.L., Castlebury, L. A., Crous, P. W., Dai, Y-C., Gams, W., Geiser, D. M., Griffith, G. W., Gueidan, C., Hawksworth, D. L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R. A., Hyde, K. D., Ironside, J. E., Koljalg, U., Kurtzman, C. P., Larsson, K-H., Lichtwardt, R., Longcore, J., Miadlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J-M., Mozley-Standridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J. D., Roux, C., Ryvariden, L., Sampaio, J. P., Schöußler, A., Sugiyama, J., Thorn, R. G., Tibell, L., Untereiner, W. A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M., White, M. M., Winka, K., Yao, Y-J., Zhang, N. (2007): A higher-level phylogenetic classification of the fungi. *Mycological Research*, 111: 509-547.
- Hibbett, D. D., Bauer, R., Binder, M., Giachini, A. J., Hosaka, K., Justo, A., Larsson, E., Larsson, K. H., Lawrey, J. D., Miettinen, O., Nagy, L., Nilsson, R. H., Weiss, M., Thorn, R. G. (2014): Agaricomycetes. In: McLaughlin J.D., Spatafora J.W., *The Mycota*, vol. VII, Second Ed, Part A. Systematics and Evolution. Springer Verlag, 7: 373-429.
- Hietala, A. M., Sen, R., Lilja, A. (1994): Anamorphic and teleomorphic characteristics of a uninucleate *Rhizoctonia* sp. isolated from the roots of nursery grown conifer seedlings. *Mycological Research*, 98:1044–1050.
- Hietala, A. M., Vahala, J., Hantula, J. (2001): Molecular evidence suggests that *Ceratobasidium bicorne* has an anamorph known as a conifer pathogen. *Mycological Research*, 105: 555-562.
- Hoashi-Erhardt, W., Moore, P., Windom, G., Bristow, P. (2008): Field and Greenhouse Response of Red Raspberry Genotypes to Root Rot. *HortScience*, 43: 1367-1370.

- Hsiang, T. and Dean, J. D. (2001): DNA Sequencing for Anastomosis Grouping of *Rhizoctonia solani* isolates from *Poa annua*. International Turfgrass Society Research Journal, 9: 674-678.
- Hua, G. K. H., Bertier, L., Soltaninejad, S., Hofte, M. (2014): Cropping Systems and Cultural Practices Determine the *Rhizoctonia* Anastomosis Groups Associated with *Brassica* spp. in Vietnam. PLoS ONE, 9: e111750.
- Hyakumachi, M. and Ui, T. (1987): Non-self-anastomosing isolates of *Rhizoctonia solani* obtained from Fields of sugar beet monoculture. Transactions of the British Mycological Society, 89: 155-159.
- Hyakumachi, M, Mushika, T., Ogisoa, Y., Toda, T., Kageyama, K. Tsuge, T. (1998): Characterization of a new cultural type (LP) of *Rhizoctonia solani* AG-2-2 isolated from warm-season turfgrasses, and its genetic differentiation from other cultural types. Plant Pathology, 47: 1-9.
- Hyakumachi, M., Priyatmojo, A., Kubota, M., Fukui, H. (2005): New Anastomosis Groups, AG-T and AG-U, of Binucleate *Rhizoctonia* spp. Causing Root and Stem Rot of Cut-Flower and Miniature Roses. Phytopathology, 95: 784-792.
- Inokuti, E. M., Reis, A., Ceresini, P. C., Câmara, P. S. Michereff, S. J. (2018): Diversity and pathogenicity of anastomosis groups of *Rhizoctonia* associated with potato stem canker and black scurf diseases in Brazil. European Journal of Plant Pathology, 153: 1333-1339.
- Ireland, K. B., Weir, B. S., Phantavong, S., Phitsanoukane, P., Vongvichid, K., Vilavong, S., Tesoriero, A. L., Burgess, L. W. (2015): First report of *Rhizoctonia solani* anastomosis group AG-4 HG-I in the Lao PDR. Australasian Plant Disease Notes, 10:1.
- Jacobsen, B. J. (2006): Root rot diseases of Sugar beet. Zbornik Matice srpske za prirodne nauke / Proc. Nat. Sci, Matica Srpska Novi Sad, 110: 9-19.
- Jaffar, A. K. M., Paulitz, T. C., Schroeder, K. L., Thomashow, L. S., Weller, D. M. (2016): Molecular characterization, morphological characteristics, virulence and geographical distribution of *Rhizoctonia* spp. in Washington State. Phytopathology, 106: 459-473.
- Jaklitsch, W. M., and Voglmayr, H. (2015): Biodiversity of *Trichoderma* (Hypocreaceae) in Southern Europe and Macaronesia. Studies in Mycology, 80: 1-87.
- Jasnić, S. i Marić, A. (1978): Mogućnost hemijskog suzbijanja truleži korena (*Fusarium* sp. i *Rhizoctonia solani*) i uticaj treflana na osetljivost sorata boranije prema ovom oboljenju. Agrovoj, 8: 497-504.
- Jemai, N., Gargouri, S., Ksouri, M. F., Mahmoud, K. B., Jemmali, A. (2019): First report of *Rhizoctonia solani* affecting Prunus rootstock 'Garnem'. Journal of Plant Pathology, 101: 809.
- Jeon, Y. A., Kim, W. G., Kim, D. H., Kwon, S. W., Hong, S. B. (2010): Taxonomic Position of Korean Isolates of *Rhizoctonia solani* Based on RAPD and ITS Sequencing of Ribosomal DNA. Plant Pathology, 26: 83-89.
- Jian, J. H., Lakshman, D. K., Tavantzis, S. M. (1998): A virulence-associated, 6.4-kb, double-stranded RNA from *Rhizoctonia solani* is phylogenetically related to plant bromoviruses and electron transport enzymes. Molecular Plant-Microbe Interactions, 11: 601-609.
- Jiang, J. H., Lee, Y. I., Cubeta, M. A., Chen, L. C. (2015): Characterization and colonization of endomycorrhizal *Rhizoctonia* fungi in the medicinal herb *Anoectochilus formosanus* (Orchidaceae). Mycorrhiza, 25: 431-445.

- Johanson, A., Turner, H. C., McKay, G. J., Brown, A. E. (1998): A PCR-based method to distinguish fungi of the rice sheath-blight complex, *Rhizoctonia solani*, *R. oryzae* and *R. oryzae-sativae*. FEMS Microbiology Letters, 162: 289-294.
- Jovičević, B. (1976): Aktuelni problem u zaštiti industrijskog bilja. Zaštita bilja, poseban broj: 87-93. Jugoslovenski simpozijum o zaštiti bilja, Kragujevac, 03-05. novembar 1976.
- Justesen, A. F., Yohalem, D., Bay, A., Nicolaisen, M. (2003): Genetic diversity in potato field populations of *Thanatephorus cucumeris* AG-3, revealed by ITS polymorphism and RAPD markers. Mycological Research, 107: 1323–1331.
- Kammerer, S. J., Burpee, L. L., Harmon, P. F. (2011): Identification of a new *Waitea circinata* variety causing basal leaf blight of seashore paspalum. Plant Disease, 95: 515-522.
- Kankam, F., Qiu, H., Pu, L., Long, H., Zhang, C., He, J., Zhang, H. (2016): Isolation, Purification and Characterization of Phytotoxins Produced by *Rhizoctonia solani* AG-3, the Cause Agent of Potato Stem Canker. American Journal of Potato Research, 93:1.
- Kareem, T. A. and Hassan, M. S. (2013): Molecular characterization of *Rhizoctonia solani* isolated from pepper plants in Iraq by using PCR. Diyala Agricultural Sciences Journal, 5: 45-54.
- Katan, J. (2000): Physical and cultural methods for the management of soil-borne pathogens. Crop Protection, 19: 725-731.
- Kataria H. R. and Verma, P. R. (1992): *Rhizoctonia solani* damping-off and root rot in oilseed rape and canola. Crop Protection, 11: 8-13.
- Keinath, A. P. and Farnham, M. W. (1997): Differential cultivars and criteria for evaluating resistance to *Rhizoctonia solani* in seedling *Brassica oleracea*. Plant Disease, 81: 946–952.
- Kelderer, M., Manici, L. M., Caputo, F., Thalheimer, M. (2012): Planting in the “inter-row” to overcome replant disease ,in apple orchards: a study on the effectiveness of the practice based on microbial indicators. Plant and Soil, 357: 381–393.
- Khangura, R. K., Barbetti, M. J., and Sweetingham, M. W. (1999): Characterization and pathogenicity of *Rhizoctonia* species on canola. Plant Disease, 83:714-721.
- Kiewnick, S., Jacobsen, B. J., Braun-Kiewnick, A., Eckhoff, J. L., Bergman, J. W. (2001): Integrated control of *Rhizoctonia* crown and root rot of sugar beet with fungicides and antagonistic bacteria. Plant Disease, 85: 718-722.
- 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
- Kretzer, A. and Bruns, T. D. (1999): Use of *atp6* in fungal phylogenetics: an example from the Boletales. Molecular Phylogenetics and Evolution, 13: 483–492.
- Kronland, W. C. and Stanghellini, M. E. (1988): Clean slide technique for the observation of anastomosis and nuclear condition of *Rhizoctonia solani*. Phytopathology, 78: 820-822.
- Kubota, M. and Abiko, K. (1997): *Rhizoctonia solani* Kuhn isolated from damping-off broccoli (in Japanese). Proceedings of the Kansai Plant Protection Society, 39: 33–34.
- Kubota, M., Tomioka, K., Sato, T. (2009): Damping-off of broccoli caused by *Rhizoctonia solani* AG-1 IC (in Japanese). Annual Report of The Kansai Plant Protection Society, 51: 27–28.

- Kumar, S., Sivasithamparam, K., Sweetingham, M. W. (2002): Prolific production of sclerotia in soil by *Rhizoctonia solani* anastomosis group (AG) 11 pathogenic on lupin. *Annals of Applied Biology*, 141: 11-18.
- Kumari, A., Kumar, R., Maurya, S., Pandey, P. K. (2016): Antagonistic Potential of Different Isolates of *Trichoderma* against *Rhizoctonia solani*. *European Journal of Experimental Biology*, 6: 2.
- Kuninaga, S., Yokosawa, R., Ogoshi, A. (1979): Some properties of anastomosis groups 6 and BI in *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Annual Phytopathology Society Japan*, 45: 207–217.
- Kuninaga, S., Natsuaki, T., Takeuchi, T., Yokosawa, R. (1997): Sequence variation of the rDNA ITS regions and between anastomosis groups in *Rhizoctonia solani*. *Current Genetics*, 32: 237–224.
- Kuninaga, S., Carling D. E., Takeuchi, T., Yokosawa, R. (2000a): Comparison of rDNA-ITS sequences between potato and tobacco strains in *Rhizoctonia solani* AG 3. *Journal of Genetical Plant Pathology*, 66: 2–11.
- Kuninaga, S., Nicoletti, R., Lahoz, E. and Naito, S. (2000b): Ascription of nt-isolates of *Rhizoctonia solani* to anastomosis group 2-1 (AG-2-1) on account of rDNA-ITS sequence similarity. *Journal of Plant Pathology*, 82: 61-64.
- Kuninaga, S. (2002): Current situation of the taxonomy of the genus *Rhizoctonia* and the *R. solani* species complex (na japanskom sa abstraktom na engleskom jeziku). *Japanese Journal of Phytopathology*, 68: 3–20.
- Kuramae, E. E., Buzeto, A. L., Ciampi, M. B., Souza, N. L. (2003): Identification of *Rhizoctonia solani* AG 1-IB in lettuce, AG 4 HG-I in tomato and melon, and AG 4 HG-III in broccoli and spinach, in Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 391–395.
- Kurt, S., Soylu, E. Soylu, S. Tok, F. M. (2005): First report of crater rot caused by *Rhizoctonia carotae* on carrots (*Daucus carota*) in Turkey. *Plant Pathology*, 54: 251.
- Kuznia, R. A., and Windels, C. E. (1994): *Rhizoctonia zea* pathogenic to spring wheat and sugarbeet seedlings. *Phytopathology*, 84: 1159.
- Lakshman, D. K., Jian, J., Tavantzis, S. M. (1998): A double-stranded RNA element from a hypovirulent strain of *Rhizoctonia solani* occurs in DNA form and is genetically related to the pentafunctional AROM protein of the shikimate pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 195: 6425–29.
- Larsson, K. H. (2007): Re-thinking the classification of corticioid fungi. *Mycological Research*, 111: 1040–1063.
- Leclerc, P. C., Balmas, V., Charest, P. M., Jabaji, H. S. (1999): Development of reliable molecular markers to detect non-pathogenic binucleate *Rhizoctonia* isolates (AG-G) using PCR. *Mycology Research*, 103: 1165-1172.
- Lee, L. G., Cullen, D. W., Sullivan, L., Nicolson, M. J. (2002): Development of conventional and quantitative real-time PCR assays for the detection and identification of *Rhizoctonia solani* AG 3 in potato and soil. *Plant Pathology*, 51: 293–302.
- Lees, A. K., Cullen, D. V., Sullivan, L., Nicolson, M. J. (2002): Development of conventional and quantitative real-time PCR assays for the detection and identification of *Rhizoctonia solani* AG-3 in potato and soil. *Plant Pathology*, 51: 293–302.

- Lehtonen, M. J., Ahvenniemi, P., Wilson, P. S., German-Kinnari, M., Valkonen, J.P.T. (2008): Biological diversity of *Rhizoctonia solani* (AG-3) in a northern potato-cultivation environment in Finland. *Plant Pathology*, 57: 141–151.
- Lehtonen, M. J. (2009): *Rhizoctonia solani* as a potato pathogen-Variation of isolates in Finland and host response. Doctoral dissertation. Viikki Graduate School in Molecular Biosciences, University of Helsinki, Finland.
- Li, Y. Q., Lei, L. P., Dong, W. H., Wang, S. M., Naito, S., Yang, G. H. (2011): Molecular diversity of binucleate *Rhizoctonia* AG-A in China. *Phytoparasitica*, 39: 461–470.
- Lievens, B., Brouwer, M., Vanachter, A.C.R.C., Cammue, B.P.A., and Thomma, B.P.H.J. (2006): Real-time PCR for detection and quantification of fungal and oomycete tomato pathogens in plant and soil samples. *Plant Science*, 171: 155-165.
- Lipps, P. E. and Herr, L. J. (1982): Etiology of *R. cerealis* in sharp eyespot of wheat. *Phytopathology*, 72: 1574–1577.
- Liu, Y. L., Whelen, S., Hall, B. D. (1999): Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 1799-1808.
- Lopez-Olmos, K., Hernández-Delgado, S., Mayek-Pérez, N. (2005): AFPL fingerprinting for identification of anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* Kühn from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23: 147-151.
- MacNish, G. C., Carling, D. E., Brainard, K. A. (1993): Characterization of *Rhizoctonia solani* AG 8 from bare patches by pectic isozyme (zymogram) and anastomosis techniques. *Phytopathology*, 83: 922-927.
- MacNish, G. C. and Carling, D. E. (1995): Use of vegetatively compatible populations (VCP) to determine field distribution of *R. solani* AG 8. *Phytopathology*, 85: 1040.
- Manici, L. M. and Bonora, P. (2007): Molecular genetic variability of Italian binucleate *Rhizoctonia* spp. isolates from strawberry. *European Journal of Plant Pathology*, 118: 31–42.
- Martin, S. B., and Lucas, L. T. (1984): Characterization and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. and binucleate *Rhizoctonia*-like fungi from turfgrass in North Carolina. *Phytopathology*, 74: 170-175.
- Martin, S. B. (1988): Identification, isolation frequency and pathogenicity of anastomosis groups of binucleate *Rhizoctonia* spp. from strawberry roots. *Phytopathology*, 78: 379–384.
- Martin, F. N. (2000): *Rhizoctonia* spp. recovered from strawberry roots in central coastal California. *Phytopathology*, 90: 345-353.
- Matheny, P. B. (2005): Improving phylogenetic inference of mushrooms with *RPB1* and *RPB2* nucleotide sequences (Inocybe; Agaricales). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 35: 1–20.
- Matsumoto, M. (2002): Trials of direct detection and identification of *Rhizoctonia solani* AG 1 and AG 2 subgroups using specifically primed PCR analysis. *The Mycological Society of Japan and Springer-Verlag Tokyo. Mycoscience*, 43: 185–189.
- Matthew, J., Herdina, S., Whisson, D. (1995): DNA probe specific to *Rhizoctonia solani* anastomosis group 8. *Mycological Research*, 99: 745-750.
- Mayo, S., Gutiérrez, S., Malmierca, M. G., Lorenzana, A., Campelo, M. P., Hermosa, R., Casquero, P. A. (2015): Influence of *Rhizoctonia solani* and *Trichoderma* spp. ingrowth of bean

- (*Phaseolus vulgaris* L.) and in the induction of plant defense-related genes. *Front. Plant Science*, 6: 685.
- Mazzola, M., Wong, O. T., Cook, R. J. (1996): Virulence of *Rhizoctonia oryzae* and *R. solani* AG 8 on wheat and detection of *R. oryzae* in plant tissue by PCR. *Phytopathology*, 86: 354–360.
- Mazzola, M. (1997): Identification and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. isolated from apple roots and orchard soils. *Phytopathology*, 87: 582-587.
- McNeill, J., F. R. Barrie, H. M. Burdet, V. Demoulin, D. L. Hawksworth, K. Marhold, D. H. Nicolson, J. Prado, P. C. Silva, J. E. Skog, Wiersema, J. H., Turland, N. J. (2006): International Code of Botanical Nomenclature (Vienna Code) adopted by the Seventeenth International Botanical Congress. In International Botanical Congress. Vienna, Austria: International Association for Plant Taxonomy.
- Mercado Cardenas, G., Galván, M., Barrera, V., Carmona, M. (2012): First Report of Target Spot of Tobacco Caused by *Rhizoctonia solani* AG-2-1. *Plant Disease*, 96: 456.
- Mercado Cardenas, G., Galván, M., Barrera, V., Rodriguero, M., Carmona, M., March, G., Ramallo, A., Shew, H. (2015): Molecular identification and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. from tobacco growing areas in northwestern Argentina. *Tropical Plant Pathology*, 40: 160-168.
- Mesiaen, C. M., Lafon, R., Molot, P. (1959): Necroses de racines, purritures de tiges et verse parasitaire du maïs. *Annals Epiphyties*, 4: 441–471.
- Meza-Moller, A., Esqueda, M., Sanchez-Teyer, F., Vargas-Rosales, G., Gardea, A. A., Tiznado-Hernandez, M. (2011): Genetic Variability in *Rhizoctonia solani* Isolated from *Vitis vinifera* based on Amplified Fragment Length Polymorphism. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 6: 317-323.
- Miles, T. D., Woodhall, J. W., Miles, L. A., Wharton, P. S. (2013): First report of a binucleate *Rhizoctonia* (AG-A) from potato stems infecting potatoes and sugarbeet in the Pacific Northwest. *Plant Disease*, 97-1657.
- Milošević, D. (2009): Zaštita krompira – bolesti, štetočine i korovi. *Semenarstvo*, Čačak.
- Misawa, T. and Kuninaga, S. (2010): The first report of tomato foot rot caused by *Rhizoctonia solani* AG-3 PT and AG-2-Nt and its host range and molecular characterization. *Journal of General Plant Pathology*, 76: 310–319.
- Misawa, T. and Toda, T. (2013): First report of black scurf on carrot caused by binucleate *Rhizoctonia* AG-U. *Journal of General Plant Pathology*, 79: 86–88.
- Misawa, T., Kubota, M., Sasaki, J., Kuninaga, S. (2015): First report of broccoli foot rot caused by *Rhizoctonia solani* AG-2-2 IV and pathogenicity comparison of the pathogen with related pathogens. *Journal of General Plant Pathology*, 81:15-23.
- Misawa, T. and Aoki, M. (2017): First report of *Rhizoctonia solani* AG-1 IC causing head rot of cabbage in Japan. *New Disease Reports*, 36, 12.
- Misawa, T., Kurose, D., Kuninaga, S. (2017): First report of leaf sheath rot of Welsh onion caused by nine taxa of *Rhizoctonia* spp. and characteristics of the pathogens. *Journal of General Plant Pathology*, 83:121–130.
- Molaei, S., Alaei, H., Mahmoudi, S.B., Sedaghati, E. (2014): New anastomosis Group AG-G of binucleate *Rhizoctonia* sp., the causal agent of root rot disease on miniature roses in Iran. *Mycologia Iranica*, 1: 99-106.

- Moncalvo, J. M., Nilsson, R. H., Koster, B., Dunham, S. M., Bernauer, T., Matheny, P. B., Porter, T. M., Margaritescu, S., Weiß, M., Garnica, S., Danell, E., Lamger, G., Langer, E., Larsson, E., Larsson, K. H. (2006): The cantharelloid clade: dealing with incongruent gene trees and phylogenetic reconstruction methods. *Mycologia*, 98: 937-948.
- Montealegre, J., Valderrama, L., Sánchez, S., Herrera, R., Besoain, X., Pérez, L. M. (2010): Biological control of *Rhizoctonia solani* in tomatoes with *Trichoderma harzianum* mutants. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13: 2.
- Mora-Umana, F., Barboza, N., Alvarado, R., Vásquez, M., Godoy-Lutz, G., Steadman, J.R. and Ramírez, P. (2013): Virulence and molecular characterization of Costa Rican isolates of *Rhizoctonia solani* from common bean. *Tropical Plant Pathology*, 38:461-471.
- Muntanola-Cvetković, M. (1987): Opšta mikologija, Niro Književne novine, Beograd, 13–320
- Muzhinji, N., Woodhall, J. W., Truter, M., van der Waals, J. E. (2015): Anastomosis groups and Pathogenycity of *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia* from potato in South Africa. *Plant Disease*, 99: 1790-1802.
- Muzhinji, N., Woodhall, J. W., Truter, M., van der Waals, J. E. (2018): Variation in Fungicide Sensitivity Among *Rhizoctonia* Isolates Recovered from Potatoes in South Africa. *Plant Disease*, 102: 1520-1526.
- Naito, S. and Kanematsu, S. (1994): Characterization and pathogenicity of a new anastomosis subgroup AG-2-3 of *Rhizoctonia solani* Kühn isolated from leaves of soybean. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 60: 681-690.
- Naito, S. (2004): *Rhizoctonia* diseases: Taxonomy and population biology. Proceeding of the International Seminar on Biological Control of Soilborne Plant Diseases, Japan - Argentina Joint Study, Buenos Aires, Argentina, 18-31.
- Neate, S. M. and Warcup, J. H. (1985): Anastomosis grouping of some isolates of *Thanatephorus cucumeris* from agricultural soils in South Australia. *Transactions of the British Mycological Society*, 85: 615–620.
- Neate, S. M., Cruickshank, R. H., Rovira, A. D. (1988): Pectic enzyme patterns of *Rhizoctonia solani* isolates from agricultural soils in South Australia. *Transactions of the British Mycological Society*, 90: 37–42.
- Nerey, Y., Pannecouque, J., Hernandez, H. P., Diaz, M., Espinosa, R., De Vos, S., Van Beneden, S., Herrera, L. and Hofte, M. (2010): *Rhizoctonia* spp. Causing Root and Hypocotyl Rot in *Phaseolus vulgaris* in Cuba. *Journal of Phytopathology*, 158: 236–243
- Nirenberg, H. I. (1976): Untersuchungen iiber die morphologische und biologische Differenzierung in der Fusarium- SektionLiseola. *Mitt Biologie Bundesanstalt. Land Forstwirtschaft. Berlin-Dahlem*, 169: 1-117.
- Oberwinkler, F., Riess, K., Bauer, R., Kirschner, R., Garnica, S. (2013): Taxonomic re-evaluation of the *Ceratobasidium-Rhizoctonia* complex and *Rhizoctonia butinii*, a new species attacking spruce. *Mycological Progress*, 12: 763-776.
- Ogoshi, A. (1975): Grouping of *Rhizoctonia solani* Kühn and their perfect stages. *Review of Plant Protection Research*, 8: 93-103.
- Ogoshi, A., Cook, R. J., Oniki, M., Sakai, R., Ui, T. (1979): Anastomosis grouping among isolates of binucleate *Rhizoctonia*. *Transactions of Mycological Society of Japan*, 20: 33–39.

- Ogoshi, A., Oniki, M., Araki, T., Ui, T. (1983a): Anastomosis groups of binucleate *Rhizoctonia* in Japan and North America and their perfect states. *Transactions of the Mycological Society of Japan*, 24: 79-87.
- Ogoshi, A., Oniki, M., Araki, T., Ui, T. (1983b): Studies on the anastomosis groups of binucleate *Rhizoctonia* and their perfect states. *Journal of the Faculty of Agriculture, Hokkaido University*, 61: 244-260.
- Ogoshi, A. (1987): Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. *Annual Review of Phytopathology*, 25: 125–143.
- Ogoshi, A., Cook, R. J., Bassett, S. (1990): *Rhizoctonia* species and anastomosis groups causing root rot of wheat and barley in the Pacific Northwest. *Phytopathology*, 80: 784-788.
- Okubara, P. A., Schroeder, K. L., Paulitz, T. C. (2008): Identification and quantification of *Rhizoctonia solani* and *R. oryzae* using real-time polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 98: 837-847.
- Ohkura, M., Abawi, G. S., Smart, C. D., and Hodge, K. T. (2009): Diversity and aggressiveness of *Rhizoctonia solani* and *Rhizoctonia*-like fungi on vegetables in New York. *Plant Disease*, 93: 615- 624.
- Oniki, M., Ogoshi, A., Takao, A., Sakai, R. and Sumito, T. (1985): The perfect state of *Rhizoctonia oryzae* and *R. zaeae*, and the anastomosis groups of *Waitea circinata*. *Transactions of Mycology Society of Japan*, 26: 189-198.
- Oros, G., Naár, Z., Magyar, D. (2013): Susceptibility of Wheat Varieties to Soil-Borne *Rhizoctonia* Infection. *American Journal of Plant Sciences*, 4: 2240-2258.
- Otero, J. T, Ackerman, J. D., Bayman, P. (2002): Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia*-like fungi from tropical orchids. *American Journal of Botany*, 89: 1852-1858.
- Pannecouque, J. and Höfte, M. (2009): Detection of rDNA ITS polymorphism in *Rhizoctonia solani* AG 2-1 isolates. *Mycologia*, 101: 26–33.
- Parmeter, J. R., Whitney, H. S., Platt, W. D. (1967): Affinities of some *Rhizoctonia* species that resemble mycelium of *Thanatephorus cucumeris*. *Phytopathology*, 57: 218-223.
- Parmeter, J. R. and Whitney, H. S. (1970): Taxonomy and nomenclature of the imperfect state, p. 7-19. In J. R. Parmeter, Jr. (ed.). *Biology and Pathology of Rhizoctonia solani*. University of California Press, Berkeley, CA.
- Paulitz, T. C., Okubara, P. A., Schillinger, W. F. (2006): First report of damping-off of canola caused by *Rhizoctonia solani* AG 2-1 in Washington State. *Plant Disease*, 90: 829.
- Pereira, D., Ceresini, P., Castroagudin, V., Molina, L., Mesa, E., Mereb Negrisoni, M., Vicentini, S., Pegolo, M., Takada, H. (2017): Population Genetic Structure of *Rhizoctonia oryzae-sativae* from Rice in Latin America and Its Adaptive Potential to Emerge as a Pathogen on Urochloa Pastures. *Phytopathology*, 107: 121-131.
- Pfähler, B. and Petersen, P. (2004): Rapid greenhouse screening of maize for resistance to *Rhizoctonia solani* AG2-2IIIB. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 111: 292-301.
- Pizolotto, C.A., Brown, L., Harrington, S., Murdock, M., Harrington, M., Woodhall, J., Moll, M., Marshall, M. (2020): First Report of *Rhizoctonia solani* AG4 HG-II infecting barley stems in Idaho. *Plant Disease*, 104, <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-20-0997-PDN>.

- Pope, E. J. and Carter, D. A. (2001): Phylogenetic placement and host specificity of mycorrhizal isolates belonging to AG 6 and AG 12 in the *Rhizoctonia solani* species complex. *Mycologia*, 93: 712–719.
- Postma, J., Scheper, R. W. A., Schildera, M. T. (2010): Effect of successive cauliflower plantings and *Rhizoctonia solani* AG 2-1 inoculations on disease suppressiveness of a suppressive and a conducive soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 42: 804-812.
- Priyatmojo, A., Yotani, Y., Hattma, K., Hyakumachi, M. (2001a): Characterisation of *Rhizoctonia* spp. causing root and stem rot of miniature rose. *Plant Disease*, 85: 1200–1205.
- Priyatmojo, A., Escopalao, V. E., Tangonan, N. G., Pascual, C. B., Suga, H., Kageyama, K., Hyakumachi, M. (2001b): Characterization of a new subgroup of *Rhizoctonia solani* anastomosis group 1 (AG-1 ID), causal agent of a necrotic leaf spot on coffee. *Phytopathology*, 91: 1054-1061.
- Ravanlou, A. and Banihashemi, Z. (2002): Isolation of some anastomosis groups of *Rhizoctonia* associated with wheat root and crown in Fars province. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 38: 67-69.
- Rehner, S. A. and Buckley, E. (2005): A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia*, 97: 84-98.
- Rekanović, E., Potočnik, I., Milijašević-Marčić, S., Stepanović, M., Todorović, B. (2015): Mikoze i pseudomikoze krompira. *Biljni lekar*, 43: 560-573.
- Rinehart, T. A., Copes, W. E., Toda, T., Cubeta, M. A. (2007): Genetic characterization of binucleate *Rhizoctonia* species causing web blight on azalea in Mississippi and Alabama. *Plant Disease*, 91: 616-623.
- Roberts, F. A. and Sivasithamparam, K. (1986): Identity and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. associated with bare patch disease of cereals at a field site in Western Australia. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 92: 185–195.
- Roberts, P. (1999): *Rhizoctonia*-forming fungi: a taxonomic guide. Royal Botanical Gardens, Kew. 239.
- Rollins, P. A., Keinath, A. P., Farnham, M. W. (1999): Effect of inoculum type and anastomosis group of *Rhizoctonia solani* causing wirestem of cabbage seedlings in a controlled environment. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 21: 119-124.
- Rovira, A. D., Ogoshi, A., McDonald, H. J. (1986): Characterization of isolates of *Rhizoctonia solani* from cereal roots in South Australia and New South Wales. *Phytopathology*, 76: 1245–1248.
- Ryker, T. C. and Gooch, F. C. (1938): *Rhizoctonia* sheath spot of rice. *Phytopathology*, 28: 233-246.
- Salazar, O., Schneider, J. H. M., Julian, M. C., Keijer, Rubio, V. (1999): Phylogenetic subgrouping of *Rhizoctonia solani* AG-2 isolates based on ribosomal ITS sequences. *Mycologia*, 92: 505–509.
- Salazar, O., Julian, M. C., Rubio, V. (2000): Primers based on specific rDNA-ITS sequences for PCR detection of *Rhizoctonia solani*, *R. solani* AG-2 subgroups and ecological types, and binucleate *Rhizoctonia*. *Mycological Research*, 104: 281–285.
- Satoh, Y., Kanehira, T., Shinohara, M. (1997): Occurrence of seedling damping-off of Jew's mallow, *Corchorus olitorius* caused by *Rhizoctonia solani* AG-2-1. *Nippon Kingakukai Kaiho*, 38: 87-91 (na japanskom sa abstraktom na engleskom).

- Sayama, A. (2000). Occurrence of damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani* AG 2-2-IIIB on cabbage plug seedlings. Annual Reports of Plant Protection North Japan, 51: 54–57.
- Sayler, R. J. and Yang, Y. (2007): Detection and quantification of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, the rice sheath blight pathogen, in rice using real-time PCR. Plant Disease, 91: 1663-1668.
- Schroeder, K. L. and Paulitz, T. C. (2012); First Report of Root Rot Caused by *Rhizoctonia solani* AG-10 on Canola in Washington State. Plant Disease, 96: 584.
- Sharma-Poudyal, D., Paulitz, T. C., Porter, L. D., du Toit, L. J. (2015): Characterisation and pathogenicity *Rhizoctonia* and *Rhizoctonia*-like spp. from pea crops in Columbia Basin of Oregon and Washington. Plant Disease, 99: 604-613.
- Sharon, M., Kuninaga, S., Hyakumachi, M., Sneh, B. (2006): The advancing identification and classification of *Rhizoctonia* spp. using molecular and biotechnological methods compared with the classical anastomosis grouping. Mycoscience, 47: 299–316
- Sharon, M., Freeman, S., Kuninaga, S., Sneh, B. (2007): Genetic diversity, anastomosis groups and virulence of *Rhizoctonia* spp. from strawberry. European Journal of Plant Pathology, 117: 247–265.
- Sharon, M., Kuninaga, S., Hyakumachi, M., Naito, S., Sneh, B. (2008): Classification of *Rhizoctonia* spp. using rDNA-ITS sequence analysis supports the genetic basis of the classical anastomosis grouping. Mycoscience, 49: 93–114.
- Sneh, B., Burpee, L., Ogoshi, A. (1991): Identification of *Rhizoctonia* Species, American Phytopathological Society Press: St. Paul. MN, USA.
- Sneh, B., Jabaji- Hare, S., Neate, S., Dijst, G. (1996): *Rhizoctonia* Species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Sneh, B., Burpee, L., Ogoshi, A. (1998): Identification of *Rhizoctonia* species. The APS, St. Paul, Minnesota.
- Sokal, R. R. and Rohlf, F. J. (1995): Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research, 3rd ed. W. H. Freeman and Company, New York
- Stalpers, J. A. and Andersen, T. F. (1996): A synopsis of the taxonomy of teleomorphs connected with *Rhizoctonia* s.l. In: Sneh B, Jabaji- Hare S, Neate S, Dijst G (eds), *Rhizoctonia* Species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 49-63.
- Stalpers, J. A., Andersen, T. F., Gams, W. (1998): Two proposals to conserve the names *Rhizoctonia* and *R. solani* (Hyphomycetes). Taxon, 47: 725-726.
- Stevens-Johnk, J. and Jones, R. K. (1993): Differentiation of populations of AG-2-2 of *Rhizoctonia solani* by analysis of cellular fatty acids. Phytopathology, 83: 278-283.
- Stevens-Johnk, J. and Jones, R. K. (2001): Differentiation of three homogeneous groups of *Rhizoctonia solani* anastomosis group 4 by analysis of fatty acids. Phytopathology, 91: 821-830.
- Stodart, J., Harvey, P. R., Neate, S. M., Melanson, D. M., Scott, E. S. (2007): Genetic variation and pathogenicity of anastomosis group 2 isolates of *Rhizoctonia solani* in Australia. Mycological research, 111: 891–900.
- Stojšin, V. B., Bagi, F. B., Jasnić, S. M., Balaž, F. B., Budakov, D. B. (2005): *Rhizoctonia* root rot (*Rhizoctonia solani* Kuhn.) of Sugar beet in Province, Vojvodina. IV International Symposium on Sugar beet Protection held from 26-28 september 2005 in Novi Sad.

- Stojšin, V. B., Bagi, F. B., Jasnić, S.M., Balaž, F.B., Budakov, D. B. (2006): *Rhizoctonia* Root Rot (*Rhizoctonia solani* Kühn.) of Sugar beet in Province Vojvodina. Zbornik Matice srpske za prirodne nauke / Matica Srpska Novi Sad, 110: 103-108.
- Stojšin, V., Budakov, D., Jacobsen, B., Grimme, E., Bagi, F., Jasnić, S. (2007): Identification of *Rhizoctonia solani* isolates from sugar beet roots by analysing the ITS region of ribosomal DNA. Zbornik Matice srpske za prirodne nauke / Matica Srpska Novi Sad, 113: 161-171.
- Stojšin, V., Budakov, D., Jacobsen, B., Bagi, F., Grimme, E., Neher, O. (2011): Analysis of *Rhizoctonia solani* isolates associated with sugar beet crown and root rot from Serbia. African Journal of Biotechnology, 10: 19049-19055.
- Strausbaugh, C. A., Eujay, I. A., Panella, L. W. and Hanson, L. E. (2011): Virulence, distribution and diversity of *Rhizoctonia solani* from sugar beet in Idaho and Oregon. Canadian Journal of Plant Pathology, 33: 210–226.
- Strauss, E. E., Lakshman, D. K., Tavantzis, S. M. (2000): Molecular characterization of the genome of a partitivirus from the basidiomycete *Rhizoctonia solani*. Journal of General Virology, 81: 549–55.
- Sumner, D. R., and Bell, D. K. (1982): Root diseases induced in corn by *Rhizoctonia solani* and *Rhizoctonia zea*. Phytopathology, 72: 86-91.
- Sumner, D. R. (1985): First report of *Rhizoctonia solani* AG-2-4 on carrot in Georgia. Plant Disease, 69: 25-27.
- Sumner, D. R., Phatak, S. C., Carling, D. E. (2003a): Characterization and pathogenicity of a new anastomosis subgroup AG-2-3 of *Rhizoctonia solani* Kühn isolated from leaves of soybean. Plant Disease, 87: 1264.
- Sumner, D. R., Phatak, S. C., Carling, D. E. (2003b): First Report of *Rhizoctonia solani* AG-2-4 on Carrot in Georgia. Plant Disease, 87: 1264.
- Sun, S., Xia, C., Zhang, J., Duan, C., Wang, X., Wu, X., Lee, S., Zhu, X. (2015): Stem Rot on Adzuki Bean (*Vigna angularis*) Caused by *Rhizoctonia solani* AG 4 HGI in China. Plant Pathology Journal, 31: 67-71.
- Taheri, P. and Pourmahdi, A. (2013): Molecular identification of destructive phytopathogenic fungus in tomato fields of Iran. 1st Annual International Interdisciplinary Conference, AIIC 2013, April, Azores, Portugal.
- Talbot, P. H. B. (1970): Taxonomy and nomenclature of the perfect state. In: Parmeter JRJ (ed.), *Rhizoctonia solani*: biology and pathology. University of California Press, Berkeley, 20-31.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., and Kumar, S. (2013): MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Molecular Biology and Evolution, 30: 2725-2729.
- Tewoldemedhin, Y. T., Lamprecht, S. C., McLeod, A., Mazzola, M. (2006): Characterization of *Rhizoctonia* spp. recovered from crop plants used in rotational cropping systems in the Western Cape Province of South Africa. Plant Disease, 90: 1399-1406.
- Tewoldemedhin, Y. T., Lamprecht, S. C., and Mazzola, M. (2015): *Rhizoctonia* anastomosis groups associated with diseased rooibos seedlings and the potential of compost as soil amendment for disease suppression. Plant Disease, 99: 1020-1025,
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994): CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research, 22: 4673-4680.

- Thon, M. R. and Royse, D. J. (1999): Partial β -*tubulin* gene sequences for evolutionary studies in the Basidiomycotina. *Mycologia*, 91: 468-474.
- Thronton, C. R., Groenhof, A. C., Forrest, R., Lamotte, R. (2004): A one-step, immunochromatographic lateral flow device specific to *Rhizoctonia solani* and certain related species, and its use to detect and quantify *R. solani* in soil. *Phytopathology*, 94: 280-288.
- Tim priređivača (2020): Pesticidi u poljoprivredi i šumarstvu u Srbiji. Dvadeseto, izmenjeno i dopunjeno izdanje. Društvo za zaštitu bilja Srbije, Beograd.
- Toda, T., Mushika T., Hyakumachi M. (2004): Development of specific PCR primers for the detection of *Rhizoctonia solani* AG 2-2 LP from the leaf sheaths exhibiting large-patch symptom on zoysia grass. *FEMS Microbiology Letters*, 234: 67-74.
- Toda, T., Mushika, T., Hayakawa, T., Tanaka, A., Tani, T., and Hyakumachi, M. (2005): Brown ring patch: A new disease on bentgrass caused by *Waitea circinata* var. *circinata*. *Plant Disease*, 89: 536-542.
- Toda, T., Toda, T., Hyakawa, T., Mwafaida Mghalu, J., Yaguchi, S., Hyakumachi, M. (2007): A new *Rhizoctonia* sp. closely related to *Waitea circinata* causes a new disease of creeping bentgrass. *Journal of General Plant Pathology*, 73: 379-387.
- Tsrer, L. (2010): Biology, Epidemiology and Management of *Rhizoctonia solani* on Potato. *Journal of Phytopathology*, 158: 649-658.
- Tuncer, S. and Eken, C. (2013): Anastomosis grouping of *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia* spp. isolated from pepper in Erzincan, Turkey. *Plant Protect Science*, 49: 127-131.
- Unal, F., Dolar, F. S., Yildirim, A. F., Demirci, E. (2014): Isolation and Identification of Binucleate *Rhizoctonia* spp. from Wheat Field Soils in the Central Anatolia Region, Turkey, *Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences*, Special Issue: 2.
- Utiamada, C.M., Sato, L.N., Oliveira, L.C., Lopes, J. da C. (2000): Eficiencia de fungicidas em aplicacao foliar no controle da mela (*Thanatephorus cucumeris/Rhizoctonia solani*), na cultura da soja. In: XXII Reuniao de Pesquisa de soja da regiaõ central do Brasil. Embrapa Soja, Londrina, p. 80 (abstract) (na portugalskom).
- Vajna, L. and Oros, G. (2005): First report of *Rhizoctonia zae* in Hungary. *Plant Pathology*, 54: 250.
- Veldre, V. (2011): Insights into the ecology of the *Ceratobasidium-Thantephorus* complex based on phylogeny reconstruction using all publicly available ITS sequences. Master's thesis. Faculty of Science and Technology, Tartu University.
- Veldre, V., Abarenkova, K., Bahrama, M., Martosc, F., Selosseb, M., Tamma, H., Koljalga, U., Tedersooa, L. (2013): Evolution of nutritional modes of Ceratobasidiaceae (Cantharellales, Basidiomycota) as revealed from publicly available ITS sequences. *Fungal Biology*, 6: 256-268.
- Vico, I. (1992): Etiološka proučavanja truleži izdanka i korena jagode. Magistarska teza. Poljoprivredni fakultet, Beograd - Zemun.
- Vico, I. (1994a): Black crown and root rot of strawberries in Yugoslavia. *Zaštita bilja*, 45: 53-60.
- Vico, I. (1994b): Investigation of anastomosis groups of binucleate *Rhizoctonia* spp. isolated from strawberries. *Phytopathologia Mediterranea*, 33: 165-167.

- Vico, I. (1997): Prilog taksonomiji fitopatogenih gljiva roda *Rhizoctonia* DC. Ex Fr. Doktorska disertacija. Poljoprivredni fakultet, Beograd - Zemun.
- Vico, I., Krstić, B., Dukić, N. (2002): Differentiation of *Rhizoctonia* spp. based on their antigenic properties. *Journal of Agricultural Sciences*, 47: 137-147.
- Vico, I. M., Janković, D. B., Krstić, B. B., Bulajić, A. R., Dukić, N. D. (2006): Multinucleate *Rhizoctonia* spp. – Pathogen of Sugar Beet and Susceptibility of Cultivars under Field Conditions. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke / Matica Srpska Novi Sad*, 110: 109-121.
- Vilgalys, R. and Gonzalez, D. (1990): Ribosomal DNA restriction fragment length polymorphisms in *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, 80: 151-158.
- Vilgalys, R. and Hester, M. (1990): Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology*, 172: 4238–4246.
- Vilgalys, R. and Cubeta, A. (1994): Molecular systematics and population biology of *Rhizoctonia*. *Annual Review of Phytopathology*, 32: 135–155.
- Vojvodić, M., Tanović, B., Mihajlović, M., Mitrović, P., Vico, I., Bulajić, A. (2018a): Molecular identification and characterization of binucleate *Rhizoctonia* spp. associated with black root rot of strawberry in Serbia. *Pesticides and Phytomedicine (Belgrade)*, 33: 97–107.
- Vojvodić, M., Tanović, B., Mihajlović, M., Hrustić, J., Mitrović, P., Vico, I., Bulajić, A. (2018b): Dvojedarne vrste roda *Rhizoctonia* - prouzročivači crne truleži korena jagode u Srbiji. *Zbornik rezimea sa XV savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor, Srbija*, str. 54.
- Vojvodić, M., Lazić, D., Mitrović, P., Tanović, B., Vico, I., Bulajić, A. (2019a): Conventional and real-time PCR assays for detection and identification of *Rhizoctonia solani* AG-2-2, the causal agent of root rot of sugar beet. *Pesticides and Phytomedicine*, 34: 19-29.
- Vojvodić, M., Lazić, D., Mitrović, P., Tanović, B., Vico, I., Jeremić, N., Bulajić, A. (2019b): Conventional and real-time PCR assays for the detection of *Rhizoctonia solani* AG-2-2 causing root rot of sugar beet. *VIII Congress on Plant protection, Zlatibor, Serbia*. pp. 171.
- Vojvodić, M., Tanović, B., Mitrović, P., Lazić, D., Vico, I., Bulajić, A. (2019c): Vrste roda *Rhizoctonia* u Srbiji. *Zbornik rezimea XVI simpozijuma o zaštiti bilja, Mostar*. str.39.
- Vojvodić, M., Tanović, B., Mitrović, P., Vico, I., Bulajić, A. (2020): *Waitea circinata* var. *zeae* causing root rot of cabbage and oilseed rape. *Plant Disease*, doi: 10.1094/PDIS-05-20-0942-RE.
- Voorhees, R. K. (1934): Sclerotial rot of corn caused by *Rhizoctonia zeae*, n. sp. *Phytopathology*, 24: 1290-1303.
- Walker, D. M., Castlebury, L. A., Rossman, A. Y., Sogonov, M. V., White, J. F. (2010): Systematics of genus *Gnomoniopsis* (Gnomoniaceae, Diaporthales) based on a three gene phylogeny, host associations and morphology. *Mycologia*, 102: 1479-1496.
- Watson, R.T., Albritton, D.T., Anderson, S.O., and Lee-Bapty, S. (1992): Methyl bromide: its atmospheric science, technology and economics. *Montreal Protocol Assessment Supplement, United Nations Environment Programme, Nairobi, Kenya*, pp. 234.
- Webb, K. M., Harveson, R. M., West, M. S. (2015): Evaluation of *Rhizoctonia zeae* as a potential biological control option for fungal root diseases of sugar beet. *Annual Applied Biology*, 167:75–89.

- White, T. J., Bruns, S. L.T., Taylor, J. W. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322 In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Academic Press, Inc., New York.
- Woo, S., Scala, F., Ruocco, M., Lorito, M. (2006): Themolecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. *Phytopathology*, 96: 181–185.
- Woodhall, J. W., Lees, A. K., Edwards, S. G., Jenkinson, P. (2007): Characterisation of *Rhizoctonia solani* from potato in Great Britain. *Plant Pathology*, 56: 286-295.
- Woodhall, J., Lees, A. K., Edwards, S. G., Jenkinson, P. (2008): Infection of potato by *Rhizoctonia solani*: effect of anastomosis group. *Plant Pathology*, 57: 897–905.
- Woodhall, J., Harrington, M., Maggard, R., Guggenheim, R., Keith, S., Fallahi, E., Wharton, P. S. (2019): Binucleate *Rhizoctonia* (*Ceratobasidium*) AG-E Affecting Red Raspberry (*Rubus idaeus*) Plants in Idaho. *Plant Disease*, 104: 281.
- Woodhall, J., Brown, L., Harrington, M., Keith, S., Marshall, J. (2020a): First Report of *Rhizoctonia solani* AG 11 Causing Stem Rot of *Phaseolus vulgaris* in Idaho. *Plant Disease*, 104: <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-20-0666-PDN>.
- Woodhall, J., Brown, L., Harrington, M., Herbert, K., Keinah, S., Webb, K., (2020b): First Report of Binucleate *Rhizoctonia* (*Ceratobasidium*) AG F Causing Dry Rot Canker of Sugar Beet in Idaho. *Plant disease*, 104: <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-19-1328-PDN>.
- Yanar, Y., Ylmaz, G., Cesmeli, I., Coskun, S. (2005): Characterization of *Rhizoctonia solani* Isolates from Potatoes in Turkey and Screening Potato Cultivars for Resistance to AG-3 Isolates. *Phytoparasitica*, 33: 370-376.
- Yang, H. A., Savasithamparam, K., Alemomahamad, J, Barton, J. E., O'Brien, P. A. (1994): Association of *Rhizoctonia* strains with bare patch disease of wheat in Western Australia. *Plant Pathology*, 43: 878-884.
- Yang, J., Kharbanda, P. D., and Wang, H. (1996): Characterization, virulence, and genetic variation of *Rhizoctonia solani* AG-9 in Alberta. *Plant Disease*, 80: 513–518.
- Yang, G. H., Naito, S., Ogoshi, A., Dong, W. H. (2006a): Identification, isolation frequency and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. causing the wirestem of *Betula nigra* in China. *Journal of Phytopathology*, 154: 80-83.
- Yang, G. H., Chen, J. Y., Pu W., Q. (2006b): First report of head rot of cabbage and web-blight of snap bean caused by *Rhizoctonia solani* AG 4 HG-I. *New Disease Reports*, 14: 20.
- Yang, G. H., Conner, R. L., Cai, H., Li, F., Cha, Y. Y. (2008): First Report of Rhizome Blight of Ginger Caused by Binucleate *Rhizoctonia* AG-R in China. *Plant Disease*, 92: 312.
- Yang, G. H. and Wu, X. H. (2013): First Report of Potato Stem Canker Caused by *Rhizoctonia solani* AG4 HGII in Gansu Province, China. *Plant Disease*, 97: 840.
- Yang, Y., Zhao, C., Guo, Z. and Wu, X. (2014): Anastomosis groups and pathogenicity of binucleate *Rhizoctonia* isolates associated with stem canker of potato in China. *European Journal of Plant Pathology*, 139: 535–544.
- Yang, Y. G., Zhao, C., Guo, Z. J., Wu, X. H. (2015a): Characterisation of new anastomosis group (AG-W) of binucleate *Rhizoctonia*, causal agent for potato stem cancer. *Plant Disease*, 99: 1757-1763.

- Yang, Y., Zhao, C., Guo, Z., Wu, X. (2015b): Potato stem canker caused by binucleate *Rhizoctonia* AG-G in China. *Journal of General Plant Pathology*, 81: 287–290.
- Yildiz, A. and Doken, M. T. (2002): Anastomosis Group Determination of *Rhizoctonia solani* Kuhn (Teleomorph: *Thanatephorus cucumeris*) Isolates from Tomatoes Grown in Aydin, Turkey and their Disease Reaction on Various Tomato Cultivars. *Journal of Phytopathology*, 150: 526–528.
- Yonemoto, K., Hirota, K., Hyakumachi, M. (2008): Seedling damping-off of carrot [*Daucus carota*] caused by *Rhizoctonia solani* AG-4 HG II. *Japanese Journal of Phytopathology*, 74: 20-23.
- Zhang, X. Y., Yu, X. X., Yu, Z., Zhang, W. Q., Ju, L. L., Xue, Y. F. (2012): Changes on activity of defensive enzyme after inoculating with toxin of *Rhizoctonia solani* in potato. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 27: 153–157.
- Zhang, X. Y., Huo, H. L., Xi, X. M., Liu, L. L., Yu, Z., Hao, J. J. (2016): Histological observation of potato in response to *Rhizoctonia solani* infection. *European Journal of Plant Pathology*, 145: 289–303.
- Zhao, C., Li, Y., Wu, S., Wang, P., Han, C., Wu, X. (2019a): Anastomosis group and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. associated with seedling damping-off of sugar beet in China. *European Journal of Plant Pathology*, 153: 869–878.
- Zhao, C., Li, Y., Liu, H., Li, S., Han, C., Wu, X. (2019b): A Binucleate *Rhizoctonia* anastomosis group (AG-W) is the causal agent of sugar beet seedling damping-off disease in China. *European Journal of Plant Pathology*, 154: 53–69.
- Zheng, L., Liu, H., Zhang, M., Cao, X., Zhou, E. (2013): The complete genomic sequence of a novel mycovirus from *Rhizoctonia solani* AG-1 IA strain B275. *Archives of Virology*, 158: 1609–1612.
- Zhou, Q. X., Hwang, S. F., Fu, H. T., Strelkov, S. E., Gossen, B. D. (2014): Genetic variation of *Rhizoctonia solani* isolates from canola in Alberta, Canada. *Canadian Journal of Plant Science*, 94: 671-681.

BIOGRAFIJA

Mira Vojvodić, mast. inž. rođena je 25.10.1991. godine u Kninu, Republika Hrvatska. Osnovnu školu završila je 2006. godine, a Zemunsku gimnaziju 2010. godine. Školske 2010/11. godine upisala je Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu, odsek Fitomedicina. Diplomirala je 30.09.2014. sa prosečnom ocenom 9,29 (devet i 29/100), odbranom diplomskog rada „Morfološke i molekularne osobine *Penicilium italicum* Wehmer patogene ploda limuna“ sa ocenom 10. Master akademske studije završila je 24.09.2015. sa prosečnom ocenom 9,50 (devet i 50/100), odbranom master rada „Karakterizacija vrsta roda *Monilinia* na plodovima breskve i nektarine u području Smedereva i Topole“ sa ocenom 10. Doktorske studije na Poljoprivrednom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, upisala je školske 2015/16. godine, smer Poljoprivredne nauke: modul Fitomedicina. Ispite na doktorskim studijama, položila je sa prosečnom ocenom 9,75 (devet i 75/100). Od 2015. godine kao stipendista Ministarstva za prosvetu i nauku Republike Srbije angažovana je na Katedri za fitopatologiju, Poljoprivrednog fakulteta na projektu III 43001 „Agrobiodiverzitet i korišćenje zemljišta u Srbiji: integrisana procena biodiverziteta ključnih grupa artropoda i biljnih patogena“. Od 18.04.2018. angažovana je na istom projektu kao istraživač-pripravnik. U okviru projekta FP7-REGPOT-AREA-316004 “Advancing research in agricultural and food sciences at Faculty of Agriculture” obavila je studijski boravak u Campus du vegetal, IRHS u Anžeu, Francuska. Do sada je objavila i saopštila 23 naučna rada, četiri u vrhunskom međunarodnom časopisu, dva u časopisu međunarodnog značaja verifikovanog posebnom odlukom, dva u istaknutom nacionalnom časopisu i 15 na skupovima od međunarodnog i nacionalnog značaja. Član je Društva za zaštitu bilja Srbije.

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora _____ Mira Vojvodić _____

Broj indeksa _____ FM150017 _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

_____ Diverzitet vrsta roda *Rhizoctonia* u Srbiji _____

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

Potpis autora

U Beogradu, _____ 22.3.2021. _____

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije

doktorskog rada

Ime i prezime autora Mira Vojvodić

Broj indeksa FM150017

Studijski program Poljoprivredne nauke

Naslov rada Diverzitet vrsta roda *Rhizoctonia* u Srbiji

Mentor dr Aleksandra Bulajić, redovni profesor

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la radi pohranjenja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva 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 autora

U Beogradu, 22.3.2021.

Izjava o korišćenju

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

Diverzitet vrsta roda *Rhizoctonia* u Srbiji

koja je moje autorsko delo.

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

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

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)
- ③ Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci.
Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

Potpis autora

U Beogradu, 22.3.2021.
