

# Identifikacija, raširenost i fenotipska varijabilnost gljiva uzročnika smeđe truleži (*Monilinia* spp.) na breskvi, nektarini i šljivi u Hrvatskoj

---

Fazinić, Tina

Doctoral thesis / Disertacija

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:435296>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-16**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu  
AGRONOMSKI FAKULTET

Tina Fazinić

**IDENTIFIKACIJA, RAŠIRENOST I  
FENOTIPSKA VARIJABILNOST GLJIVA  
UZROČNIKA SMEĐE TRULEŽI  
(*MONILINIA* SPP.) NA BRESKVI,  
NEKTARINI I ŠLJIVI U HRVATSKOJ**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2021.



University of Zagreb

FACULTY OF AGRICULTURE

Tina Fazinić

**IDENTIFICATION, DISTRIBUTION AND  
PHENOTYPIC VARIABILITY OF BROWN  
ROT FUNGI (*MONILINIA* SPP.) ON  
PEACH, NECTARINE AND PLUM IN  
CROATIA**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2021.



Sveučilište u Zagrebu  
AGRONOMSKI FAKULTET

Tina Fazinić

**IDENTIFIKACIJA, RAŠIRENOST I  
FENOTIPSKA VARIJABILNOST GLJIVA  
UZROČNIKA SMEĐE TRULEŽI  
(*MONILINIA* SPP.) NA BRESKVI,  
NEKTARINI I ŠLJIVI U HRVATSKOJ**

DOKTORSKI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Tihomir Miličević

Zagreb, 2021.



University of Zagreb

FACULTY OF AGRICULTURE

Tina Fazinić

**IDENTIFICATION, DISTRIBUTION AND  
PHENOTYPIC VARIABILITY OF BROWN  
ROT FUNGI (*MONILINIA* SPP.) ON  
PEACH, NECTARINE AND PLUM IN  
CROATIA**

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Tihomir Miličević, Ph. D., Professor

Zagreb, 2021.

Bibliografski podaci:

- Znanstveno područje: biotehničke znanosti
- Znanstveno polje: poljoprivreda (agronomija)
- Znanstvena grana: fitomedicina
- Institucija: Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zavod za fitopatologiju
- Voditelj doktorskog rada: prof. dr. sc. Tihomir Miličević
- Broj stranica: 200
- Broj slika: 30
- Broj tablica: 38
- Broj priloga: 4
- Broj literaturnih referenci: 264
- Datum obrane doktorskog rada:
- Sastav povjerenstva za obranu doktorskog rada: dr. sc. Bogdan Cvjetković, professor emeritus, prof. dr. sc. Boris Duralija i prof. dr. sc. Karolina Vrandečić

Rad je pohranjen u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Ulica bratske zajednice 4 p.p. 550, 10000 Zagreb, Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Agronomskog Fakulteta, Svetošimunska cesta 25, 10000 Zagreb.

Tema rada prihvaćena je na 4. sjednici Fakultetskog vijeća Agronomskog Fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u akademskoj godini 2016./2017., održanoj dana 17.1.2017. te odobrena na 9. sjednici Senata Sveučilišta u Zagrebu u akademskoj godini 2016./2017., održanoj dana 14.3.2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET

**IZJAVA O IZVORNOSTI**

Ja, **Tina Fazinić**, izjavljujem da sam samostalno izradila doktorski rad pod naslovom

**IDENTIFIKACIJA, RAŠIRENOST I FENOTIPSKA VARIJABILNOST GLJIVA  
UZROČNIKA SMEĐE TRULEŽI (*MONILINIA* SPP.) NA BRESKVI, NEKTARINI I ŠLJIVI  
U HRVATSKOJ**

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica ovoga dokorskog rada;
- da je doktorski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u izradi istoga nisam koristila drugim izvorima osim onih koji su u njemu navedeni;
- da sam upoznata s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (čl. 19).

Zagreb, 14.4.2021.

---

*Potpis doktorandice*

## Ocjena doktorskog rada

Datum obrane doktorskog rada:

Povjerenstvo za obranu doktorskog rada:

1. dr. sc. Bogdan Cvjetković, professor emeritus

---

2. prof. dr. sc. Boris Duralija

---

3. prof. dr. sc. Karolina Vrandečić

---



## Informacije o mentoru

Prof. dr. sc. Tihomir Miličević redoviti je profesor Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. U znanstveno-nastavno zvanje docenta izabran je 2006. godine. U znanstveno-nastavno zvanje izvanrednog profesora izabran je 2010. godine, a u znanstveno-nastavno zvanje redovitog profesora 2016. godine.

U sklopu preddiplomskog studija na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu nositelj je modula Osnove biljne patologije i Specijalna fitopatologija. U sklopu diplomskog studija nositelj je modula Urbana fitopatologija, a na poslijediplomskom doktorskom studiju Poljoprivredne znanosti nositelj je modula Biljna patologija - odabrana poglavlja. Na preddiplomskom, diplomskom i poslijediplomskom doktorskom studiju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu suradnik je na većem broju modula.

Na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu utemeljitelj je kolegija Mikologija, a na Agronomskom i prehrambeno-tehnološkom fakultetu Sveučilišta u Mostaru nositelj je modula Fitopatologija i Specijalna fitopatologija.

Bio je mentor više od 40 završnih i diplomskih radova, jednog magistarskog rada i dvije doktorske disertacije. Trenutno je mentor dvije doktorske disertacije. Bavi se istraživanjem bioraznolikosti, epidemiologije i horologije fitopatogenih gljiva na kultiviranim biljnim vrstama, kao i na samoniklim vrstama od posebne važnosti u flori Hrvatske. Glavni predmet njegovog znanstvenog interesa su mikoze masline, jagode, vinove loze te cvijeća.

Znanstveno se usavršava na Poljoprivrednom fakultetu u Bariju te Centru za istraživanje biljnih bolesti u Rimu. Nastavno se usavršava na Poljoprivrednim fakultetima u Beogradu, Ljubljani i Skopju.

Bio je voditelj pet znanstvenih projekata te suradnik na njih 11. Objavio je 66 znanstvenih radova, od kojih je 14 A1 radova.

## Zahvala

Ideje se mogu roditi preko noći. Međutim, njihov životni put, rast, razvoj i sazrijevanje ipak zahtijeva nešto malo više vremena. Kada se ideje njeguju, promišljaju i provedu u djela, one mogu stasati u nešto što nas ispunjava ponosom i zbog čega smo spremni zaboraviti na sve poteškoće s kojima smo se susreli. U svojoj zrelosti, prestaju biti ideje i postaju naši rezultati koji su opipljivi i konkretni. Iako podložni zubu vremena, na svojoj su vremenskoj liniji neizbrisivi i vječni. I ono najvrijednije od svega. Rađaju nove ideje.

Hvala mojim najmilijima. Mojoj obitelji i prijateljima. Hvala vam za SVE. Ljude s kojima me veže život, koji su mi dodijeljeni i koje sam sama birala, ne bih mijenjala za ništa. Izabrani su vrhunski. U moru pozitivnih misli koje me uz njih vežu teško je nešto izdvojiti, a ne biti patetičan. Hvala vam za ljubav, razumijevanje i podršku u svemu što sam naumila. Hvala vam i za spoznaju da sve što sam naumila i mogu.

Hvala mom ZZB-u. Znao tko ste. Vaši savjeti, pomoć, znanje i iskustvo bili su neprocjenjiv dar u životu jedne doktorandice. Ono što nas spaja već je odavno nadišlo sferu kolegijalnosti i postalo je prijateljstvo.

Hvala mom cimeru, i to ona najveća hvala. Hvala ti što si stručnjak, znanstvenik, prijatelj i čovjek od kojeg je privilegija učiti i kojeg je čast poznavati. Hvala ti za sve pedagoške mjere, riječi, dane i kilometre koje si mi poklonio.

I zato ovo posvećujem svima vama, divni moji ljudi.

I nadam se da ću barem dijelom moći vratiti sve ljudske i profesionalne divote koje sam od vas uvijek nesebično dobivala.

## Sažetak

Gljive *Monilinia laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* na koštičavom voću uzrokuju palež cvjetova i sušenje izbojaka te smeđu trulež plodova. Smeđa trulež smatra se gospodarski najvažnijom bolesti breskve, nektarine, šljive, marelice, trešnje i višnje u svijetu. Vrste *M. laxa* i *M. fructigena* udomaćene su u Europi, dok je *M. fructicola* do 2014. godine za EU bila regulirana kao karantenski štetni organizam. Unatoč karantenskim mjerama, *M. fructicola* utvrđena je 2001. na breskvi u Francuskoj, nakon čega je potvrđena u brojnim europskim zemljama. Kako bi se odredila raširenost i bioraznolikost populacija vrsta iz roda *Monilinia* u nasadima koštičavog voća u Hrvatskoj te eventualna prisutnost vrste *M. fructicola*, tijekom 2012. i 2013. sakupljeni su uzorci plodova breskve, nektarine i šljive sa simptomima smeđe truleži u 14 kontinentalnih i mediteranskih županija. Ukupno je sakupljen 361 *Monilinia* spp. izolat. Zabilježena su morfološka obilježja svih izolata te su PCR-om identificirani do razine vrste. Istražena je pouzdanost korištenih PCR protokola, a identifikacija 13 izolata dodatno je potvrđena sekvenciranjem i filogenetskom analizom. Prisutnost *M. laxa* i *M. fructigena* potvrđena je u obje godine istraživanja u svih 14 županija, a njihova je učestalost u ukupnoj bioraznolikosti populacija bila gotovo izjednačena (37,1 % i 34,6 %). Prve je godine istraživanja *M. fructicola* nađena na samo jednoj lokaciji u Splitsko-dalmatinskoj županiji, dok je već sljedeće potvrđena u još pet drugih. Uz dva pozitivna nalaza *M. fructicola* 2016., njena je učestalost u ukupnoj bioraznolikosti populacija iznosila 28,3 %. Učestalost *M. laxa* bila je najveća u Osječko-baranjskoj, *M. fructigena* u Virovitičko-podravskoj, a *M. fructicola* u Splitsko-dalmatinskoj županiji. Na breskvi se najučestalijom pokazala *M. laxa* (41,8 %), na nektarini *M. fructigena* (50,9 %), a na šljivi *M. fructicola* (65,9 %). Nisu identificirane druge *Monilinia* vrste, poput *M. polystroma*, *M. mumeicola* i *M. yunnanensis*. Ukupno je 62,7 % izolata *M. laxa* i 39,2 % izolata *M. fructigena* pokazalo morfološka obilježja atipična za vrstu prema sinoptičkom ključu, dok je 96,1 % izolata *M. fructicola* bilo tipično. Određeni su najzastupljeniji morfološki profili sve tri *Monilinia* vrste u Hrvatskoj (Laxa-HR, Gena-HR i Cola-HR). Za istraživanje fenotipske varijabilnosti odabrano je po 10 izolata sve tri *Monilinia* vrste, porijeklom iz mediteranskog i kontinentalnog dijela Hrvatske. Iako su zabilježene razlike u porastu kolonija *Monilinia* spp. izolata na temperaturama od 7,5, 15, 20, 25 i 30 °C, temperatura od 35 °C inhibitorno je djelovala na porast micelija svih izolata, dok je porast redovito bio najveći pri temperaturi od 25 °C. Patogenost svih *Monilinia* spp. izolata dokazana je na plodovima breskve, nektarine i šljive. Na plodovima breskve i nektarine nisu utvrđene razlike u patogenosti između izolata unutar istih *Monilinia* vrsta. Na plodovima šljive utvrđene su razlike između izolata unutar vrsta *M. laxa* i *M. fructigena*, dok unutar vrste *M. fructicola* razlike nisu utvrđene. Na plodovima breskve se *M. fructigena* pokazala virulentnijom od *M. fructicola*, dok se patogenost *M. laxa* nije razlikovala od *M. fructigena* i *M. fructicola*. Na plodovima nektarine i šljive nije bilo razlika u patogenosti između sve tri *Monilinia* vrste. Na plodovima nektarine nisu utvrđene razlike u sporulaciji između izolata unutar vrsta *M. fructigena* i *M. fructicola*, ali jesu između izolata unutar vrste *M. laxa*. Između *Monilinia* vrsta, najobilnije je sporulirala *M. fructicola*. Konidije svih *Monilinia* spp. izolata zadržale su sposobnost vijabilnosti na inokuliranim plodovima nektarine nakon devet mjeseci izloženosti vanjskim uvjetima, pri čemu su se konidije *M. laxa* pokazale najvijabilnijima (66,8 %). Unatoč širokoj primjeni fungicida na osnovi piraklostrobina, trifloksistrobina, difenkonazola, fenbukonazola, tebukonazola, boskalida, fluopirama, fenheksamida i fludioksonila, nije zabilježena smanjena osjetljivost hrvatskih *Monilinia* spp. izolata na navedene fungicide. Međutim, utvrđena su četiri nisko rezistentna izolata *M. fructicola* na tiofanat-metil, s EC<sub>50</sub> vrijednostima 5,754, 3,631, 2,570 i 2,399 µg/ml. Ovo istraživanje predstavlja prvi detaljan uvid u raširenost, bioraznolikost populacija te praktično važne fenotipske razlike fitopatogenih gljiva roda *Monilinia* na koštičavom voću u Hrvatskoj. Saznanja dobivena istraživanjem mogu doprinijeti razvoju učinkovitijih strategija i pristupa zaštiti od smeđe truleži breskve, nektarine i šljive.

**Ključne riječi:** *Monilinia fructicola*, *Monilinia laxa*, *Monilinia fructigena*, koštičavo voće, učestalost, fenotip, patogenost, prezimljenje, osjetljivost, fungicidi

## Identification, distribution and phenotypic variability of brown rot fungi (*Monilinia* spp.) on peach, nectarine and plum in Croatia

### SUMMARY

**Introduction:** Peach (*Prunus persica*), nectarine (*P. persica* var. *nucipersica*), apricot (*P. armeniaca*), plum (*P. domestica*), sweet cherry (*P. avium*) and sour cherry (*P. cerasus*) are commonly referred to as stone fruits. According to FAO, the world production of stone fruit exceeded 44.32 million tonnes in 2017. In Croatia, the annual production of stone fruit species reached 26528 tonnes in 2017, with sour cherry being the most represented. Blossom blight and fruit brown rot are the two symptoms of the same disease caused by polycyclic fungi of the genus *Monilinia*, affecting all stone fruit species and causing losses in stone fruit production. Because infections with *Monilinia* spp. often remain latent in the field, brown rot is also considered as one of the most important postharvest diseases of stone fruit. *Monilinia laxa* and *M. fructigena* are species known to occur throughout Europe and Croatia, while *M. fructicola* is widely distributed in Asia, North and South America, Australia and Oceania. In Europe, it was first detected in 2001 in France, although it was regulated as a quarantine organism for the European Union. In the following years, its presence was confirmed in most European countries and it lost its quarantine status in 2014. Nevertheless, *M. fructicola* is still listed on the EPPO A2. Besides *M. laxa*, *M. fructigena* and *M. fructicola*, *Prunus* species can also be hosts for some relatively recently described *Monilinia* species, such as *M. polystroma*, *M. mumeicola* and *M. yunnanensis*. Considering the increased number of findings of *M. fructicola* across Europe, it is necessary to investigate the possible presence of this pathogen in Croatia and to determine its potential impact on Croatian stone fruit production. The objectives of this study were to identify *Monilinia* species on peach, nectarine and plum fruits, to investigate their distribution and incidence and to determine the phenotypic differences between *Monilinia* spp. isolates.

**Materials and methods:** During 2012 and 2013, 209 peach, 108 nectarine and 45 plum fruits with visible brown rot symptoms were collected from orchards in 14 Croatian counties. In 2016, two symptomatic plum fruits were additionally collected. Single spore isolates were obtained from infected fruits and incubated on PDA at 22 °C in 12 h light/12 h dark regime. After 10 days, morphological characteristics of each isolate were recorded. PCR-based identification method was performed for 361 *Monilinia* spp. isolates in three separate reactions, using forward and reverse species-specific primer pairs Laxa-R2/MO368-5 specific for *M. laxa*, MO368-8R/MO368-5 for *M. fructigena* and MO368-10R/MO368-5 for *M. fructicola*. Multiplex PCR reaction was also performed using the common reverse primer MO368-5 and previously reported species-specific forward primers. Additionally, PCR reaction was carried out using primer pair ITS1Mfc1/ITS4Mfc1, specific for *M. fructicola*. Common reverse primer Mon-R and forward primers Mume-F, specific for *M. mumeicola*, and Ensis-F, specific for *M. yunnanensis*, were used to test the possible presence of these species in Croatia. For 13 isolates, ITS region was amplified using the universal primer pair ITS1/ITS4. Also, for seven isolates, gene fragments G3PDH and TUB2 were amplified in separate PCR reactions, using primer pairs Mon-G3pdhF/Mon-G3pdhR and Mon-TubF1/Mon-TubR1. Amplified PCR products were sequenced and compared to representative sequences retrieved from GenBank database. Phylogenetic analysis was performed using MEGA 7.0 software by UPGMA method. Morphological characteristics of each isolate were compared to PCR identification results and the number of typical and atypical *Monilinia* spp. isolates was determined. Morphological analysis was further used to determine the most common morphological profile of *M. laxa*, *M. fructigena* and *M. fructicola* in this study. Based on identification results, distribution of each *Monilinia* species and total population biodiversity of *Monilinia* species was determined, as well as the population biodiversity for each county, year and host. Based on their origin, ten representative isolates of each *Monilinia* spp. were chosen to investigate their phenotypic variability. Mycelium growth rate (mm/day) of each isolate was determined at 7.5, 15, 20, 25, 30 and 35 °C.

Pathogenicity assay was conducted by inoculation of peach, nectarine and plum fruits with each *Monilinia* spp. isolate, following an incubation of inoculated fruits at 22 °C in 12 h light/12 h dark regime and 95 % humidity. Lesion diameter was measured two to 14 days after inoculation and lesion growth rate (mm/day) was recorded. After sporulation appeared on nectarine fruits, the number of conidia per fruit surface (mm<sup>2</sup>) for all *Monilinia* spp. isolates was determined microscopically using haemocytometer. Viability of *Monilinia* spp. conidia was also determined on artificially inoculated nectarine fruits. After the appearance of brown rot symptoms, fruits were transferred to open air and exposed to natural conditions for nine months, from August to April next year. Overwintered mummified fruits were rehydrated and conidial suspensions from stromatised tissue were inspected microscopically using a haemocytometer. The number of viable and non-viable conidia for each isolate was determined. Differences in pathogenicity, sporulation and conidial viability were subjected to analysis of variance (ANOVA) at the significance level P=0.05. Multiple comparisons of means were performed using XLSTAT 2014.5.03 software. In fungicide sensitivity assay, mycelial growth inhibition of *Monilinia* spp. isolates was determined on water agar for boscalid, fluopyram, difenoconazole, fenbuconazole, tebuconazole, thiophanate-methyl and fenhexamid, while conidial germination inhibition was measured on potato dextrose agar for boscalid, fluopyram, fludioxonil, trifloxystrobin and pyraclostrobin. Percent inhibition relative to the control was calculated, and EC<sub>50</sub> or EC<sub>90</sub> values (µg/ml) were generated after regression analysis was performed.

**Results and conclusions:** Out of 364 isolates obtained, 361 were identified as *Monilinia* spp. based on their morphological characteristics. PCR method using species-specific primer pairs Laxa-R2/MO368-5 and MO368-8R/MO368-5 was shown to be reliable for identification purposes of *M. laxa* and *M. fructigena*, since the expected 351-bp and 402-bp PCR products were regularly amplified. On the other hand, amplification of the expected 535-bp product did not occur regularly for all *M. fructicola* isolates when specific primer pair MO368-10R/MO368-5 was used. The expected 356-bp PCR products for all *M. fructicola* isolates were amplified when a different specific primer pair ITS1Mfc1/ITS4Mfc1 was used, and it was considered more reliable for diagnostic purposes of this pathogen. Duplex PCR reaction produced 534-bp and 712-bp fragments with the common reverse primer Mon-R and forward primers Ensis-F and Mume-F, specific for *M. yunnanensis* and *M. mumeicola*, respectively. The results indicated the presence of these Asian *Monilinia* species in Croatia. Nevertheless, sequencing and phylogenetic analysis of the ITS region, G3PDH and TUB2 gene fragments confirmed the species to be *M. laxa*, *M. fructigena* and *M. fructicola*, as initially identified. *Monilinia mumeicola* and *M. yunnanensis* were not confirmed to be present in Croatia and species-specific primers developed for their identification were found not to be specific enough. During this survey, *M. fructicola* was found to be present for the first time in Croatia. Its incidence in Croatian stone fruit orchards was found to be similar to the incidence of *M. laxa* and *M. fructigena*. In total, 134 isolates (37.1 %) were identified as *M. laxa*, 125 (34.6 %) as *M. fructigena* and 102 (28.3 %) as *M. fructicola*. Morphological analysis showed that among 361 *Monilinia* spp. isolates collected within the study, 96.1 % of *M. fructicola* isolates showed morphological features regarded as species-typical according to the synoptic key used for *Monilinia* spp. identification. On the other hand, 62.7 % of *M. laxa* and 39.2 % of *M. fructigena* isolates showed morphological features regarded as atypical for these species according to the synoptic key. Consequently, the identification of *Monilinia* spp. using the synoptic key can be considered reliable for *M. fructicola*, but not for *M. laxa* nor *M. fructigena*. The most common morphological profiles for all three *Monilinia* species in Croatia were designated as Laxa-HR, Gena-HR and Cola-HR. *Monilinia laxa* and *M. fructigena* were found to be present in all 14 monitored Croatian counties, while *M. fructicola* showed more limited distribution, as it was found to be present in six counties. The incidence of *M. laxa* was highest in Osijek Baranja County (78.6 %), *M. fructigena* was the dominant species in Virovitica Podravina County (90.9 %), while *M. fructicola* was prevalent in Split Dalmatia County (95 %). In 2012, the incidence of *M. laxa* and *M.*

*fructigena* was shown to be relatively similar, with 47.3 % and 41.4 % incidence, respectively. In the same year, *M. fructicola* was found with 11.3 % incidence in the total *Monilinia* spp. population. In 2013, the incidence of *M. fructicola* was found to be much higher (42.6 %), while the incidence of *M. laxa* (28.4 %) and *M. fructigena* (29 %) was lower than in 2012 and almost identical. *Monilinia laxa* was shown to be the most common *Monilinia* spp. on peach (41.8 %), *M. fructigena* on nectarine (50.9 %) and *M. fructicola* on plum (65.9 %). Phenotypic variability among 30 representative *Monilinia* spp. isolates was further investigated. Different isolates expressed variable mycelium growth rate on temperatures of 7.5, 15, 20, 25 and 30 °C. At 35 °C, no isolate grew. *Monilinia laxa*, *M. fructigena* and *M. fructicola* showed the highest average colony growth rate on 25 °C, while the lowest growth rate was recorded on 7.5 °C. Pathogenicity of 30 representative *Monilinia* spp. isolates was confirmed on peach, nectarine and plum fruits, and Koch's postulates were fulfilled. There were no significant differences in pathogenicity on peach and nectarine fruits between isolates of the same *Monilinia* species. On plum fruits, significant differences in pathogenicity between isolates within *M. laxa* and within *M. fructigena* were recorded, but not between isolates within *M. fructicola*. On peach fruits, the virulence of *M. fructigena* was significantly higher than of *M. fructicola*. Still, there were no differences in pathogenicity comparing *M. laxa* with *M. fructigena* and *M. fructicola*. On nectarine and plum fruits there were no differences in pathogenicity between *M. laxa*, *M. fructigena* and *M. fructicola*. Significant differences in the number of conidia produced per nectarine fruit surface (mm<sup>2</sup>) were recorded comparing *M. laxa* and *M. fructigena* with *M. fructicola*, which sporulated most abundantly. Differences in sporulation on nectarine fruits were also recorded between two isolates of *M. laxa* (ZD 143/12 and ZD 145/12), while no differences were found within *M. fructigena* and *M. fructicola* isolates. There were no differences in percentage of viable conidia between isolates of the same *Monilinia* species on overwintered mummified nectarine fruits, but differences were recorded comparing *M. laxa* (66.82 %) and *M. fructicola* (36.62 %). There were no differences in percentage of viable conidia when comparing *M. fructigena* with *M. laxa* and *M. fructicola*. All 30 tested *Monilinia* spp. isolates were sensitive to boscalid, fluopyram, difenoconazole, fenbuconazole, tebuconazole and fenhexamid in mycelium growth assay and to boscalid, fluopyram, fludioxonil, trifloxystrobin and pyraclostrobin in conidial germination assay. The 50 % effective concentration (EC<sub>50</sub>) values in mycelium growth assay varied from 0.001 µg/mL (triazoles) to 0.631 µg/mL (fenhexamid) for all *Monilinia* spp. isolates. In conidial germination assay, EC<sub>50</sub> values varied from 0.000004 µg/mL (pyraclostrobin) to 0.933 µg/mL (fluopyram). All *M. laxa* and *M. fructigena* isolates were sensitive to thiophanate-methyl in mycelium growth assay, with EC<sub>50</sub> values ranging from 0.016 µg/mL to 0.457 µg/mL (*M. laxa*) and from 0.013 µg/mL to 0.427 µg/mL (*M. fructigena*). For *M. fructicola*, four low resistant isolates to thiophanate-methyl were identified, with EC<sub>50</sub> values being 5.754, 3.631, 2.570 and 2.399 µg/mL. This work represents the first systematic study on the distribution and population biodiversity of the genus *Monilinia* on stone fruit in Croatia. The results also provide insight into phenotypic variability of *Monilinia* spp. bearing practical relevance for stone fruit producers in Croatia and may lead to the development of more efficient strategies and approaches in the control of peach, nectarine and plum brown rot.

**Key words:** *Monilinia fructicola*, *Monilinia laxa*, *Monilinia fructigena*, stone fruit, incidence, phenotype, pathogenicity, overwintering, sensitivity, fungicides

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Hipoteze i ciljevi istraživanja .....	3
<b>2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA</b> .....	4
2.1. Fitopatogene vrste gljiva iz roda <i>Monilinia</i> i njihov gospodarski značaj .....	4
2.2. Biologija <i>Monilinia</i> vrsta na koštičavom voću .....	9
2.3. Identifikacija <i>Monilinia</i> vrsta .....	14
2.4. Mjere suzbijanja <i>Monilinia</i> vrsta .....	16
2.4.1. Agrotehničke mjere suzbijanja <i>Monilinia</i> vrsta.....	17
2.4.2. Kemijske mjere suzbijanja <i>Monilinia</i> vrsta.....	18
2.4.3. Biološke mjere suzbijanja <i>Monilinia</i> vrsta.....	23
2.4.4. Fizikalne mjere suzbijanja <i>Monilinia</i> vrsta nakon berbe.....	24
<b>3. MATERIJAL I METODE RADA</b> .....	26
3.1. Uzorkovanje plodova breskve, nektarine i šljive .....	26
3.2. Izolacija i uzgoj izolata <i>Monilinia</i> vrsta.....	29
3.3. Analiza morfoloških obilježja izolata <i>Monilinia</i> vrsta .....	29
3.4. Identifikacija izolata <i>Monilinia</i> vrsta PCR metodom .....	31
3.4.1. Priprema početnica i izolata za PCR.....	31
3.4.2. Ekstrakcija i spektrofotometrijsko mjerenje DNK.....	32
3.4.3. Lančana reakcija polimerazom (PCR).....	32
3.4.4. Elektroforeza u agaroznom gelu .....	34
3.5. Sekvenciranje i analiza sekvenci .....	35
3.6. Određivanje raširenosti i bioraznolikosti populacija <i>Monilinia</i> vrsta na koštičavom voću u Hrvatskoj.....	37
3.7. Odabir reprezentativnih izolata <i>Monilinia</i> vrsta.....	39
3.8. Određivanje fenotipske varijabilnosti <i>Monilinia</i> vrsta .....	40
3.8.1. Analiza brzine rasta micelija na različitim temperaturama .....	40
3.8.2. Analiza patogenosti na plodovima breskve, nektarine i šljive .....	40
3.8.3. Analiza sporulacije na plodovima nektarine .....	41

3.8.4.	Analiza vijabilnosti konidija na plodovima nektarine .....	42
3.8.5.	Analiza osjetljivosti na fungicide .....	44
3.8.5.1.	Priprema hranjivih podloga s dodatkom fungicida.....	44
3.8.5.2.	<i>In vitro</i> test rasta micelija na fungicidima .....	45
3.8.5.3.	<i>In vitro</i> test rasta kličnih cijevi na fungicidima.....	47
<b>4.</b>	<b>REZULTATI ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>49</b>
4.1.	Morfološka obilježja izolata i identifikacija <i>Monilinia</i> vrsta.....	49
4.2.	Sekvenciranje i analiza sekvenci .....	53
4.3.	Raširenost <i>Monilinia</i> vrsta na koštičavom voću u Hrvatskoj .....	61
4.4.	Bioraznolikost populacija <i>Monilinia</i> vrsta na koštičavom voću u Hrvatskoj .....	66
4.4.1.	Ukupna bioraznolikost populacija <i>Monilinia</i> vrsta u Hrvatskoj .....	66
4.4.2.	Bioraznolikost populacija <i>Monilinia</i> vrsta u pojedinim županijama.....	67
4.4.3.	Bioraznolikost populacija <i>Monilinia</i> vrsta prema godini istraživanja.....	69
4.4.4.	Bioraznolikost populacija <i>Monilinia</i> vrsta prema domaćinu.....	70
4.5.	Fenotipska varijabilnost <i>Monilinia</i> vrsta u Hrvatskoj .....	71
4.5.1.	Brzina rasta micelija na različitim temperaturama .....	71
4.5.2.	Patogenost na plodovima breskve, nektarine i šljive .....	73
4.5.2.1.	Patogenost na plodovima breskve .....	74
4.5.2.2.	Patogenost na plodovima nektarine.....	75
4.5.2.3.	Patogenost na plodovima šljive .....	76
4.5.3.	Sporulacija na plodovima nektarine .....	78
4.5.4.	Vijabilnost konidija na plodovima nektarine.....	81
4.5.5.	Osjetljivost na fungicide .....	85
4.5.5.1.	<i>In vitro</i> test rasta micelija na fungicidima .....	85
4.5.5.2.	<i>In vitro</i> test rasta kličnih cijevi na fungicidima.....	89
<b>5.</b>	<b>RASPRAVA .....</b>	<b>92</b>
5.1.	Identifikacija <i>Monilinia</i> vrsta i nalaz vrste <i>M. fructicola</i> u Hrvatskoj.....	92
5.2.	Raširenost <i>Monilinia</i> vrsta na koštičavom voću u Hrvatskoj .....	97
5.3.	Bioraznolikost populacija <i>Monilinia</i> vrsta na koštičavom voću u Hrvatskoj .....	97



5.4.	Fenotipska varijabilnost <i>Monilinia</i> vrsta u Hrvatskoj .....	103
5.4.1.	Brzina rasta micelija na različitim temperaturama .....	103
5.4.2.	Patogenost na plodovima breskve, nektarine i šljive .....	105
5.4.3.	Sporulacija na plodovima nektarine .....	106
5.4.4.	Vijabilnost konidija na plodovima nektarine.....	107
5.4.5.	Osjetljivost na fungicide .....	109
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČCI .....</b>	<b>121</b>
<b>7.</b>	<b>POPIS LITERATURE .....</b>	<b>124</b>
<b>8.</b>	<b>ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>148</b>
<b>9.</b>	<b>PRILOZI .....</b>	<b>150</b>

## Popis kratica

<b>bp</b>	parovi baza (eng. <i>base pair</i> )
<b>CZB</b>	Centar za zaštitu bilja
<b>DMI</b>	inhibitori demetilacije (eng. <i>demethylation inhibitors</i> )
<b>DNK</b>	deoksiribonukleinska kiselina
<b>EC<sub>50</sub></b>	srednja učinkovita koncentracija (eng. <i>half maximal effective concentration</i> )
<b>EC<sub>90</sub></b>	90 %-tna učinkovita koncentracija (eng. <i>90 % effective concentration</i> )
<b>EFSA</b>	Europska agencija za sigurnost hrane (eng. <i>European Food Safety Authority</i> )
<b>EPPO</b>	Europska i mediteranska organizacija za zaštitu bilja (eng. <i>European and Mediterranean Plant Protection Organization</i> )
<b>EU</b>	Europska unija
<b>FAO</b>	Organizacija za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda (eng. <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> )
<b>FRAC</b>	Akcijnski odbor za rezistentnost na fungicide (eng. <i>Fungicide Resistance Action Committee</i> )
<b>G3PDH</b>	gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza
<b>HAPIH</b>	Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu
<b>ITS</b>	nekodirajuća intergenska regija (eng. <i>internal transcribed spacer</i> )
<b>KDA</b>	krumpir-dekstrozni agar
<b>KRI</b>	inhibitori keto reduktaze (eng. <i>keto reductase inhibitors</i> )
<b>MA</b>	malt agar
<b>MAP</b>	mitogen-aktivacijski protein (eng. <i>mitogen-activated protein</i> )
<b>MBC</b>	metil benzimidazol karbamati (eng. <i>methyl benzimidazole carbamates</i> )
<b>PCR</b>	lančana reakcija polimerazom (eng. <i>polymerase chain reaction</i> )
<b>PP</b>	fenilpiroli eng. ( <i>phenylpyrroles</i> )
<b>QoI</b>	vanjski inhibitori kvinona (eng. <i>quinone outside inhibitors</i> )
<b>rRNK</b>	ribosomska ribonukleinska kiselina
<b>SAD</b>	Sjedinjene Američke Države

<b>SDHI</b>	inhibitori sukcinat-dehidrogenaze (eng. <i>succinate dehydrogenase inhibitors</i> )
<b>SGD</b>	eng. <i>spiral gradient dilution</i>
<b>SHAM</b>	salicil hidroksamska kiselina (eng. <i>salicyl hydroxamic acid</i> )
<b>SSU</b>	mala podjedinica (eng. <i>small subunit</i> )
<b>TAE</b>	tris-acetat-EDTA
<b>TUB2</b>	beta-tubulin
<b>UK</b>	Ujedinjeno Kraljevstvo
<b>UPGMA</b>	eng. <i>unweighted pair group method with arithmetic mean</i>
<b>VA</b>	vodeni agar

### Popis tablica

- Tablica 1.** Zbirni prikaz ukupnog broja uzorkovanih plodova prema županiji, godini i domaćinu
- Tablica 2.** PCR reakcijske smjese po jednom izolatu
- Tablica 3.** Parovi početnica specifičnih za *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* (Côté i sur., 2004a)
- Tablica 4.** Temperaturne faze PCR reakcije (Côté i sur., 2004a)
- Tablica 5.** Par početnica specifičnih za *M. fructicola* (loos i Frey, 2000)
- Tablica 6.** Temperaturne faze PCR reakcije (loos i Frey, 2000)
- Tablica 7.** Parovi početnica specifičnih za *M. mumeicola* i *M. yunnanensis* (Hu i sur., 2011)
- Tablica 8.** Temperaturne faze PCR reakcije s parovima početnica specifičnih za *M. mumeicola* i *M. yunnanensis* (Hu i sur., 2011)
- Tablica 9.** Parovi univerzalnih početnica ITS1 i ITS4 (White i sur., 1990)
- Tablica 10.** Temperaturne faze PCR reakcije s univerzalnim početnicama ITS1 i ITS4 (loos i Frey, 2000)
- Tablica 11.** Parovi početnica za sekvenciranje fragmenata gena G3PDH i TUB2 (Hu i sur., 2011)
- Tablica 12.** Temperaturne faze PCR reakcije s početnicama za sekvenciranje fragmenata gena G3PDH i TUB2 (Hu i sur., 2011)

- Tablica 13.** Pristupni brojevi i opisi reprezentativnih sekvenci iz baze podataka GenBank, korišteni za usporedbu i filogenetske analize
- Tablica 14.** Reprezentativni izolati *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola*
- Tablica 15.** Aktivne tvari korištene u testu osjetljivosti na fungicide i metode pripreme
- Tablica 16.** Broj tipičnih i atipičnih izolata *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* sukladno sinoptičkom ključu (Lane, 2002)
- Tablica 17.** Broj i postotak izolata *M. laxa* s određenim morfološkim obilježjem (Lane, 2002)
- Tablica 18.** Broj i postotak izolata *M. fructigena* s određenim morfološkim obilježjem (Lane, 2002)
- Tablica 19.** Broj i postotak izolata *M. fructicola* s određenim morfološkim obilježjem (Lane, 2002)
- Tablica 20.** Najčešći morfološki profil *Monilinia* vrsta u Hrvatskoj
- Tablica 21.** Zastupljenost *Monilinia* vrsta prema županijama i lokacijama (voćnjacima) obuhvaćenima istraživanjem
- Tablica 22.** Broj i udio (%) *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* u odnosu na ukupnu populaciju *Monilinia* vrsta obuhvaćenu istraživanjem u Republici Hrvatskoj
- Tablica 23.** Broj i udio (%) *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* u odnosu na ukupnu populaciju *Monilinia* vrsta u pojedinim županijama
- Tablica 24.** Broj i udio (%) *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* u odnosu na ukupnu populaciju *Monilinia* vrsta u 2012., 2013. i 2016. godini
- Tablica 25.** Broj i udio (%) *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* u odnosu na ukupnu populaciju *Monilinia* vrsta na breskvi, nektarini i šljivi
- Tablica 26.** Brzina rasta micelija izolata *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* (mm/dan) na VA na različitim temperaturama
- Tablica 27.** Prosječan porast lezije na plodovima breskve inokuliranim izolatima *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola*
- Tablica 28.** Prosječan porast lezije *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* na inokuliranim plodovima breskve
- Tablica 29.** Prosječan porast lezije na plodovima nektarine inokuliranim izolatima *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola*

- Tablica 30.** Prosječan porast lezije *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* na inokuliranim plodovima nektarine
- Tablica 31.** Prosječan porast lezije na plodovima šljive inokuliranim izolatima *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola*
- Tablica 32.** Prosječan porast lezije *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* na inokuliranim plodovima šljive
- Tablica 33.** Prosječan broj spora na plodovima nektarine inokuliranim izolatima *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola*
- Tablica 34.** Prosječan broj spora *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* na inokuliranim plodovima nektarine
- Tablica 35.** Prosječan postotak vijabilnih konidija na prezimjelim plodovima nektarine inokuliranim izolatima *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola*
- Tablica 36.** Prosječan postotak vijabilnih konidija *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* na prezimjelim plodovima nektarine
- Tablica 37.** Srednje učinkovite koncentracije (EC<sub>50</sub>) *Monilinia* vrsta u *in vitro* testu rasta micelija na fungicidima (µg/ml)
- Tablica 38.** Srednje (EC<sub>50</sub>) i 90 % učinkovite (EC<sub>90</sub>) koncentracije *Monilinia* vrsta u *in vitro* testu rasta kličnih cijevi na fungicidima (µg/ml)

#### Popis slika

- Slika 1.** Prikaz karakterističnog oblika lanca makrokonidija *Monilinia* spp. skupine *Junctoriae* pod mikroskopom.
- Slika 2.** Prikaz raširenosti *M. fructigena* u svijetu; izvor: EPPO Global Database (preuzeto s: <https://gd.eppo.int>; 1.11.2019.).
- Slika 3.** Prikaz raširenosti *M. fructicola* u svijetu; izvor: EPPO Global Database (preuzeto s: <https://gd.eppo.int>; 1.11.2019.).
- Slika 4.** Prikaz raširenosti *M. polystroma* u svijetu; izvor: EPPO Global Database (preuzeto s: <https://gd.eppo.int>; 1.11.2019.).
- Slika 5.** Životni ciklus *Monilinia* vrsta na koštičavom voću; izvor: Plant Pathology, 3<sup>rd</sup> Edition. Autor: George N. Agrios. Academic Press, 1988 (Agrios, 1988).
- Slika 6.** Tipični simptomi smeđe truleži koštičavog voća prilikom uzorkovanja plodova: a) smežurani plodovi šljive sa sporonosnim nakupinama *Monilinia*

spp.; b) otpali plodovi breskve zahvaćeni smeđom truleži na tlu u voćnjaku; c) zaraženi plod breskve; d)-f) zaraženi plodovi nektarine prorasli micelijem *Monilinia* spp.

- Slika 7.** Ispitivanje patogenosti *Monilinia* spp. izolata na plodovima breskve i nektarine u klima komori.
- Slika 8.** Priprema plodova nektarine za test vijabilnosti konidija: a) sušenje plodova nektarine u laboratoriju nakon sterilizacije; b) omatanje mjesta inokulacije s *Monilinia* spp. parafilmom.
- Slika 9.** Plodovi nektarine zaraženi s *Monilinia* spp. te izloženi vanjskim uvjetima u testu vijabilnosti konidija: a) mumificirani plodovi nektarine u zaštitnoj konstrukciji; b) zaštitna konstrukcija.
- Slika 10.** Morfološka obilježja izolata *M. laxa* ZD 150/12 (lijevo), BA 27/13 (sredina) i ZD 128/13 (desno) na KDA nakon inkubacije na 22 °C na režimu 12 sati tame/12 sati svjetlosti.
- Slika 11.** Morfološka obilježja izolata *M. fructigena* OS 67/13 (lijevo), PL 8/13 (sredina) i PO 114/12 (desno) na KDA nakon inkubacije na 22 °C na režimu 12 sati tame/12 sati svjetlosti.
- Slika 12.** Morfološka obilježja izolata *M. fructicola* ZG 26/13 (lijevo), VŽ 24/13 (sredina) i VD 45/12 (desno) na KDA nakon inkubacije na 22 °C na režimu 12 sati tame/12 sati svjetlosti.
- Slika 13.** Prikaz elektroforeze PCR produkata veličine 402 bp (*M. fructigena*) i 351 bp (*M. laxa*) u 1,5 % agaroznom gelu umnoženih parovima početnica MO368-8R/MO368-5 (*M. fructigena*) i Laxa-R2/MO368-5 (*M. laxa*) u 'duplex' PCR reakciji (Côté i sur., 2004a). Jažice 1-2: *M. fructigena*; jažice 3-6: *M. laxa*; jažica 7: DNK ljestvica 1000 bp; jažice 8-18: *M. laxa*.
- Slika 14.** Prikaz elektroforeze PCR produkata veličine 535 bp u 1,5 % agaroznom gelu umnoženih parom početnica MO368-10R/MO368-5 (Côté i sur., 2004a). Jažice 1-15: *M. fructicola*; jažica 16: *M. laxa*; jažica 17: *M. fructigena*; jažica 18: DNK ljestvica 1000 bp.
- Slika 15.** Prikaz elektroforeze PCR produkata veličine 356 bp u 1 % agaroznom gelu umnoženih parom početnica ITS1Mfc1/ITS4Mfc1 (Ioos i Frey, 2000). Jažice 1-15: *M. fructicola*; jažica 16: *M. laxa*; jažica 17: *M. fructigena*; jažica 18: DNK ljestvica 1000 bp.

- Slika 16.** Kolonija izolata ZD 167/12 na KDA nakon inkubacije na 22 °C na režimu 12 sati tame/12 sati svjetlosti.
- Slika 17.** Prikaz elektroforeze PCR produkata veličine 534 bp (*M. yunnanensis*) i 712 bp (*M. mumeicola*) u 1,2 % agaroznom gelu umnoženih parovima početnica Ensis-F/Mon-R (*M. yunnanensis*) i Mume-F/Mon-R (*M. mumeicola*) u 'duplex' PCR reakciji (Hu i sur., 2011). Jažica 1: DNK ljestvica 1500 bp; jažice 2-6: *M. yunnanensis*; jažice 7-8: *M. mumeicola*; jažica 9: *M. fructicola*; jažica 10: *M. fructigena*; jažica 11: *M. laxa*.
- Slika 18.** Prikaz elektroforeze PCR produkata veličine 538 bp (*Monilinia* spp.) u 1,5 % agaroznom gelu umnoženih univerzalnim parovima početnica ITS1 i ITS4 (White i sur., 1990) u PCR reakciji (loos i Frey, 2000). Jažice 1-7: *M. laxa*; jažice 8-11: *M. fructigena*; jažice 12-13: *M. fructicola*; jažica 14: DNK ljestvica 1000 bp.
- Slika 19.** Filogenetsko stablo dobiveno analizom nukleotidnih sekvenci fragmenta ITS genske regije, uz korištenje UPGMA metode i modela 'number of differences'. Brojevi u čvorištu grana predstavljaju vrijednosti dobivene statističkom metodom 'bootstrap' uz 1000 ponavljanja. Za ukorjenjivanje stabla korištene su sekvence vrsta *B. dothidea* i *T. deformans*, a u analizu su uvrštene i sekvence drugih *Monilinia* vrsta. Na stablu su vidljivi pristupni brojevi sekvenci iz baze podataka GenBank (Tablica 13) te oznake izolata iz ovog istraživanja (Prilog 4).
- Slika 20.** Prikaz elektroforeze PCR produkata veličine 786 bp (*Monilinia* spp.) u 1,5 % agaroznom gelu umnoženih parovima početnica Mon-G3pdhF/Mon-G3pdhR u PCR reakciji (Hu i sur., 2011). Jažice 1-7: *Monilinia* spp.; jažica 8: DNK ljestvica 1500 bp.
- Slika 21.** Prikaz elektroforeze PCR produkata veličine 1630 bp (*Monilinia* spp.) u 1,5 % agaroznom gelu umnoženih parovima početnica Mon-TubF1/Mon-TubR1 u PCR reakciji (Hu i sur., 2011). Jažica 1: DNK ljestvica 1500 bp; jažice 2-8: *Monilinia* spp.
- Slika 22.** Filogenetsko stablo dobiveno analizom nukleotidnih sekvenci fragmenta gena za TUB2, uz korištenje UPGMA metode i modela 'number of differences'. Brojevi u čvorištu grana predstavljaju vrijednosti dobivene statističkom metodom 'bootstrap' uz 1000 ponavljanja. Za ukorjenjivanje stabla korištena je sekvenca vrste *B. cinerea*, a u analizu su uvrštene i

sekvence drugih *Monilinia* vrsta. Na stablu su vidljivi pristupni brojevi sekvenci iz baze podataka GenBank (Tablica 13) te oznake izolata iz ovog istraživanja (Prilog 4).

- Slika 23.** Mjerenje radijalnog porasta lezije izolata VŽ 25/13 (*M. fructigena*) na plodovima breskve (lijevo), nektarine (u sredini) i šljive (desno).
- Slika 24.** Mikroskopski prikaz očitavanja broja spora izolata ZD 143/12 (*M. laxa*), prvo ponavljanje (A), prvi isječak (1) na hemocitometru, prilikom određivanja razlika u sporulaciji *Monilinia* vrsta.
- Slika 25.** Mikroskopski prikaz očitavanja broja spora izolata VŽ 25/13 (*M. fructigena*), prvo ponavljanje (A), drugi isječak (2) na hemocitometru, prilikom određivanja razlika u sporulaciji *Monilinia* vrsta.
- Slika 26.** Mikroskopski prikaz očitavanja broja spora izolata VD 4/13 (*M. fructicola*), drugo ponavljanje (B), prvi isječak (1) na hemocitometru, prilikom određivanja razlika u sporulaciji *Monilinia* vrsta.
- Slika 27.** Mumificirani plodovi nektarine nakon devetomjesečne izloženosti vanjskim uvjetima u testu vijabilnosti konidija. S lijeva na desno: plodovi inokulirani s *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola*.
- Slika 28.** Mikroskopski prikaz očitavanja vijabilnih i nevijabilnih konidija izolata ZD 145/12 (*M. laxa*) s prezimjelog ploda nektarine, prvo ponavljanje (A).
- Slika 29.** Mikroskopski prikaz očitavanja vijabilnih i nevijabilnih konidija izolata VŽ 19/13 (*M. fructigena*) s prezimjelog ploda nektarine, prvo ponavljanje (A).
- Slika 30.** Mikroskopski prikaz očitavanja vijabilnih i nevijabilnih konidija izolata VD 4/13 (*M. fructicola*) s prezimjelog ploda nektarine, drugo ponavljanje (B).

### Popis grafikona

- Grafikon 1.** Zastupljenost *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* unutar ukupne istraživane populacije *Monilinia* vrsta.
- Grafikon 2.** Broj tipičnih i atipičnih izolata *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* te svih *Monilinia* spp. izolata temeljen na usporedbi morfoloških obilježja (Lane, 2002) i identifikacije PCR-om (Ioos i Frey, 2000; Côté i sur., 2004a).
- Grafikon 3.** Ukupna bioraznolikost populacija *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* u Republici Hrvatskoj.



**Grafikon 4.** Bioraznolikost populacija *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* u istraživanju 2012. i 2013. godine.

**Grafikon 5.** Bioraznolikost populacija *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* na breskvi, nektarini i šljivi.

### Popis karata

**Karta 1.** Prikaz raširenosti vrste *M. laxa* u hrvatskim županijama prema lokacijama na kojima je potvrđena njena prisutnost: Dubrovačko-neretvanska (Modrić, Metković i Vrbovci), Splitsko-dalmatinska (Umčani), Zadarska (Podgradina, Kašić, Smilčić, Baštica i Škabrnja), Istarska (Finida i Kaldir), Varaždinska (Biškupec), Međimurska (Vratišinec), Zagrebačka (Staro Čiče, Novo Čiče i Bukovje Bistransko), Sisačko-moslavačka (Velika Ludina), Virovitičko-podravaska (Vukosavljevica), Bjelovarsko-bilogorska (Rovišće), Koprivničko-križevačka (Novigrad Podravski), Osječko-baranjska (Kamenac i Tovljač), Brodsko-posavska (Završje) i Vukovarsko-srijemska (Borinci).

**Karta 2.** Prikaz raširenosti vrste *M. fructigena* u hrvatskim županijama prema lokacijama na kojima je potvrđena njena prisutnost: Dubrovačko-neretvanska (Vrbovci), Splitsko-dalmatinska (Umčani i Kroška), Zadarska (Podgradina, Kašić, Smilčić, Baštica i Škabrnja), Istarska (Finida i Kaldir), Varaždinska (Biškupec), Međimurska (Vratišinec), Zagrebačka (Staro Čiče), Sisačko-moslavačka (Velika Ludina), Virovitičko-podravaska (Vukosavljevica, Vukosavljevica - Brdo i Vukosavljevica - Potok), Bjelovarsko-bilogorska (Rovišće), Koprivničko-križevačka (Novigrad Podravski), Osječko-baranjska (Kamenac i Tovljač), Brodsko-posavska (Završje) i Vukovarsko-srijemska (Borinci).

**Karta 3.** Prikaz raširenosti vrste *M. fructicola* u hrvatskim županijama prema lokacijama na kojima je potvrđena njena prisutnost: Dubrovačko-neretvanska (Vrbovci), Splitsko-dalmatinska (Umčani, Kroška, Veliki Prolog i Dusina), Istarska (Kaldir), Međimurska (Vratišinec), Zagrebačka (Staro Čiče) i Vukovarsko-srijemska (Borinci).

# 1. UVOD

Breskva (*Prunus persica* (L.) Batsch), nektarina (*Prunus persica* var. *nucipersica* (L.) C.K. Schneider), marelica (*Prunus armeniaca* L.), šljiva (*Prunus domestica* L.), trešnja (*Prunus avium* (L.) L.) i višnja (*Prunus cerasus* L.) svrstavaju se u koštičave voćne vrste. Sistematizirane su u carstvo Plantae, diviziju Magnoliophyta, razred Magnoliopsida, red Rosales, porodicu Rosaceae, potporodicu Amygdaloideae, rod *Prunus*. Arheološki nalazi iz zapadne Kine ukazuju na kultivaciju breskve još 3000 pr. n. e. (Li, 1984).

Prema podacima FAOSTAT-a za 2017. godinu, ukupne svjetske površine pod breskvom, nektarinom, marelicom, šljivom, trešnjom i višnjom iznosile su više od 5 milijuna hektara, s godišnjom proizvodnjom većom od 44 milijuna tona. Od toga, više od polovice svjetske proizvodnje zauzimaju breskva i nektarina s više od 24,5 milijuna tona. U 2017. godini, najveći svjetski proizvođač breskve i nektarine bila je Kina s više od 14,5 milijuna tona, a Kina prednjači i u proizvodnji šljiva s oko 6,7 milijuna tona. Turska je u 2017. godini bila svjetski predvodnik u proizvodnji marelice i trešnje s godišnjom proizvodnjom od oko 985000 i 627000 tona, a Ruska federacija višnje s oko 186000 tona (FAO, 2018).

Kako navodi EUROSTAT, u Europskoj je uniji (EU) godišnja proizvodnja breskve u 2017. godini iznosila 2,9 milijuna tona. S više od 90 % ukupnog proizvodnog udjela, Španjolska (37,2 %), Italija (27,1 %) i Grčka (26,9 %) vodeći su proizvođači breskve u EU (Europska unija, 2018).

Koštičave voćne vrste su se u Hrvatskoj u 2017. godini uzgajale na površini od 9128 hektara, od čega je šljiva zauzimala 4364 hektara. Ukupna godišnja proizvodnja koštičavog voća u Hrvatskoj iznosila je 26528 tona, od čega je proizvodnja višnje bila najveća s ukupnom godišnjom proizvodnjom od 8770 tona (Državni zavod za statistiku Republike Hrvatske, 2018).

Fitopatogene vrste gljiva najčešći su uzročnici bolesti na svim vrstama koštičavog voća. Među brojnim gljivama uzročnicima raznih bolesti, vrste roda *Monilinia* ubrajaju se u najvažnije. *Monilinia* vrste na koštičavom voću uzrokuju dva tipa simptoma, palež cvjetova i sušenje izbojaka te smeđu trulež plodova (Byrde i Willetts, 1977). *Monilinia laxa* (Aderh. & Ruhland) Honey, *Monilinia fructigena* (Aderh. & Ruhland) Honey i *Monilinia fructicola* (G. Winter) Honey najčešći su uzročnici smeđe truleži plodova u Europi. Smeđa trulež smatra se i gospodarski najznačajnijom skladišnom bolesti koštičavog voća (Casals i sur., 2010; Cvjetković, 2010).

Vrste *M. laxa* i *M. fructigena* nazivaju se i „vrstama Staroga svijeta“ (Côté i sur., 2004a) te su široko rasprostranjene, kako u Hrvatskoj, tako i cijelim europskim kontinentom

(Cvjetković, 2010; EPPO, 2019). Bez obzira na te spoznaje, u Hrvatskoj su znanstvena istraživanja *Monilinia* vrsta vrlo oskudna (Kišpatić i sur., 1976; Cvjetković, 2010; Jemrić i sur., 2011). Za razliku od njih, vrsta *M. fructicola* je u Europi potvrđena tek 2001. godine u Francuskoj (EPPO, 2002), nakon čega su brojne europske zemlje, od kojih mnoge i susjedne Hrvatskoj, potvrdile njenu prisutnost (Petróczy i Palkovics, 2006; Pellegrino i sur., 2009; Munda i Viršček Marn, 2010; Hrustić i sur., 2013).

*Monilinia fructicola* je do 2014. godine imala status karantenskog štetnog organizma u EU te su administrativne mjere zaštite uključivale i sprječavanje unosa u nova područja te širenja unutar područja u kojima je već utvrđena (Europska unija, 2000). Obzirom da se glavnim načinom širenja vrste *M. fructicola* na međunarodnoj razini smatra trgovina svježim zaraženim plodovima i sadnim materijalom (EPPO, 2009), karantenski je status tog patogena omogućavao bolju kontrolu i primjenu karantenskih mjera zaštite prilikom uvoza iz izvaneuropskih zemalja. Danas se *M. fructicola* nalazi na A2 listi Europske i mediteranske organizacije za zaštitu bilja (EPPO), čime se državama članicama EPPO-a preporuča regulacija štetnog organizma unutar sustava karantene, bez obzira na prisutnost unutar EPPO regije (EPPO/CABI, 1996). Takve se preporuke mogu smatrati opravdanima, obzirom da se smeđa trulež uzrokovana gljivom *M. fructicola* smatra jednom od najdestruktivnijih bolesti koštičavog voća (Michailides i Morgan, 1997; Hong i sur., 1998; Fulton i sur., 1999).

Osim vrsta *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola*, biljke roda *Prunus* mogu parazitirati i neke druge *Monilinia* vrste. Od prvog nalaza (Van Leeuwen i sur., 2002), posljednjih se godina u Europi na koštičavom voću sve više opisuje vrsta *Monilinia polystroma* (G.C.M. Leeuwen) Kohn (Hilber-Bodmer i sur., 2012; Poniatowska i sur., 2013; Martini i sur., 2014; Munda, 2015), dok su nalazi vrsta *Monilinia mumeicola* (Y. Harada, Y. Sasaki & Sano) Sand.-Den. & Crous i nedavno opisane *Monilinia yunnanensis* (M.J. Hu & C.X. Luo) Sand.-Den. & Crous do danas ograničeni samo na Japan i Kinu (Harada i sur., 2004; Hu i sur., 2011; Yin i sur., 2014a; Yin i sur., 2014b).

Sa sve većim brojem nalaza vrste *M. fructicola* u Europi, javila se potreba za utvrđivanjem njene eventualne prisutnosti u nasadima koštičavog voća u Hrvatskoj, kao i potreba za sustavnim istraživanjem raširenosti i populacije *Monilinia* vrsta u različitim dijelovima Hrvatske na breskvi, nektarini i šljivi. Ulaskom Hrvatske u EU 2013. godine, ona je postala dio jedinstvenog europskog tržišta, čime se povećao i fitosanitarni rizik od prodora invazivnih stranih patogena na ovo područje. Obzirom da je i *M. fructicola* invazivni strani patogen za Europu, istraživanje fenotipskih obilježja triju *Monilinia* vrsta na koštičavom voću omogućilo bi bolji uvid u fitopatološke značajke koje bi *M. fructicola* mogla imati u odnosu

na udomaćene vrste *M. laxa* i *M. fructigena*. Saznanja o osjetljivosti *Monilinia* vrsta na fungicide pružila bi znanstveno utemeljen doprinos istraživanjima suzbijanja smeđe truleži u nasadima koštičavog voća u Hrvatskoj te omogućila unaprjeđenje učinkovitosti mjera zaštite od te bolesti.

## 1.1. Hipoteze i ciljevi istraživanja

Postavljene su sljedeće hipoteze ovog istraživanja:

1. Struktura populacije *Monilinia* vrsta na plodovima breskve, nektarine i šljive različita je ovisno o voćnjaku.
2. *Monilinia* vrste međusobno se razlikuju u patogenosti.
3. *Monilinia* vrste međusobno se razlikuju u brzini rasta i vijabilnosti konidija.
4. *Monilinia* vrste međusobno se razlikuju u osjetljivosti na fungicide.

Ciljevi ovog istraživanja bili su:

1. Determinirati *Monilinia* vrste na zaraženim plodovima breskve, nektarine i šljive te istražiti njihovu raširenost i zastupljenost.
2. Utvrditi razlike u patogenosti između izolata *Monilinia* vrsta.
3. Utvrditi razlike u brzini rasta i vijabilnosti konidija između izolata *Monilinia* vrsta.
4. Utvrditi razlike u osjetljivosti na fungicide između izolata *Monilinia* vrsta.

## 2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

### 2.1. Fitopatogene vrste gljiva iz roda *Monilinia* i njihov gospodarski značaj

Vrste roda *Monilinia* su prema mrežnoj bazi podataka *Mycobank* (preuzeto s: <http://www.mycobank.org>) klasificirane u odjeljak Ascomycota, pododjeljak Pezizomycotina, razred Leotiomycetes, podrazred Leotiomycetidae, red Helotiales, porodicu Sclerotiniaceae. Nesavršeni (anamorfni) oblici *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* su *Monilia laxa* (Ehrenb.) Sacc. & Voglino, *Monilia fructigena* (Pers.) Pers. i *Monilia fructicola* L.R. Batra. Vrste roda *Monilinia* dijele se na skupinu Junctoriae i skupinu Disjunctoriae (Honey, 1936; Batra, 1991).

Vrste *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* pripadaju skupini Junctoriae, za koju je uobičajen širok krug domaćina (Honey, 1936; Batra, 1991) te imaju međusobno spojene makrokonidije koje sačinjavaju lanac i tako poprimaju karakterističan izgled ogrlice (lat. *Monile*, *monilis* – ogrlica) (Slika 1).



**Slika 1.** Prikaz karakterističnog oblika lanca makrokonidija *Monilinia* spp. skupine Junctoriae pod mikroskopom.

Za razliku od njih, vrste skupine Disjunctoriae karakteriziraju lanci sačinjeni od makrokonidija između kojih su smještene manje stanice zvane disjunktori (Honey, 1936; Batra, 1991). Ovoj skupini pripadaju *Monilinia* vrste koje su visoko specijalizirane, kao što su *Monilinia linhartiana* (Prill. & Delacr.) N.F. Buchw. koja parazitira na dunji (*Cydonia oblonga* Mill.) ili *Monilinia vaccinii-corymbosi* (J.M. Reade) Honey na američkoj borovnici (*Vaccinium corymbosum* L.).

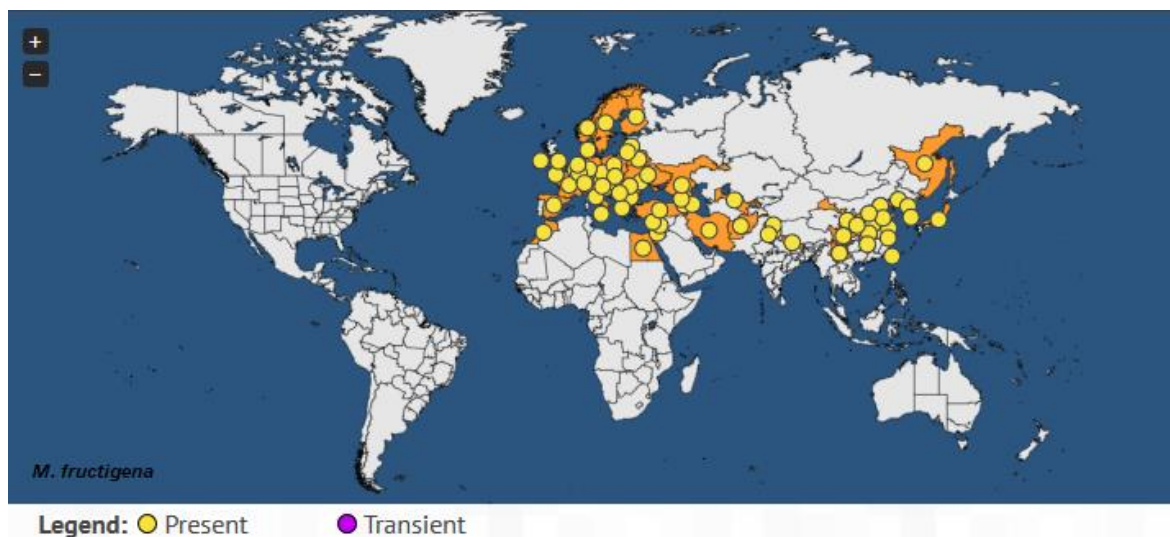
*Monilinia laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* srodne su vrste (Byrde i Willetts, 1977), koje na breskvi, nektarini, marelici, šljivi, trešnji i višnji mogu uzrokovati dva tipa simptoma, palež cvjetova i sušenje izbojaka te smeđu trulež plodova (Byrde i Willetts, 1977).

Smeđa trulež plodova smatra se gospodarski najvažnijom bolesti koštičavog voća (Hu i sur., 2011). Bolest je koja uzrokuje značajne gubitke u voćarskoj proizvodnji, kako prije, tako i nakon berbe (Byrde i Willetts, 1977) te se diljem svijeta smatra i najznačajnijom skladišnom bolesti na plodovima koštičavog voća (Casals i sur., 2010). Gubici u proizvodnji koštičavog voća mogu značajno varirati te uvelike ovise o klimatskim uvjetima u razdoblju dozrijevanja plodova i oko berbe (Van Leeuwen i sur., 2001). Obzirom da se smeđa trulež može pojaviti i tijekom skladištenja, prijevoza ili prerade plodova, gubici nakon berbe mogu biti puno veći u usporedbi s onima prije berbe (Hong i sur., 1998; Larena i sur., 2005). Hong i sur. (1998) navode kako je u Kaliforniji uslijed zaraze s *M. fructicola* uobičajeno propadanje čak 50 % plodova nakon berbe, bez obzira na učestalost zaraze u nasadu. Ipak, Villarino i sur. (2010) utvrđuju pozitivnu korelaciju između broja mumificiranih plodova na stablu breskve i učestalosti pojave smeđe truleži nakon berbe. U svijetu se provode brojna istraživanja patogenosti *Monilinia* vrsta (Hong i sur., 1998; Hu i sur., 2011; Hrustić i sur., 2015; Papavasileiou i sur., 2015a).

Vrsta *M. laxa* prisutna je u svim dijelovima svijeta i smatra se najčešćim patogenom iz roda *Monilinia* na koštičavom voću u Europi (Villarino, 2010) te najčešćim uzročnikom paleži cvjetova i izbojaka koštičavog voća (Byrde i Willetts, 1977). Calavan i Keitt (1948) navode kako *M. laxa* rjeđe parazitira plodove nego cvjetove i izbojke. Cvjetković (2010) navodi kako kod šljive, breskve i nektarine može uzrokovati trulež plodova, ali i palež cvjetova i izbojaka. Istraživanja pokazuju kako je *M. laxa* globalno rasprostranjeni patogen (Batra, 1991), a status karantenskog štetnog organizma ima još samo u Jordanu (EPPO, 2019). Specijalizirana forma (*forma specialis*) *M. laxa* f.sp. *mali* Harrison može zaraziti i cvjetove jezgričavog voća (Spiegel i Stammler, 2006).

Osim vrste *M. laxa*, trulež plodova na vrstama roda *Prunus* može uzrokovati i vrsta *M. fructigena*, raširena u Europi i u nekim dijelovima Afrike i Azije (Byrde i Willetts, 1977; EPPO, 2019). Status karantenskog štetnog organizma ima u Kanadi, Sjedinjenim Američkim Državama (SAD-u), Novom Zelandu i Čileu (EPPO, 2019) (Slika 2). Dominantan je uzročnik truleži plodova jabuke (*Malus domestica* Borkh.) i kruške (*Pyrus communis* L.) (Byrde i Willetts, 1977) te se bolest koju uzrokuje često naziva i „smeđa trulež jabuke“ (Jones, 1990). Češći je parazit jezgričavog, nego koštičavog voća (Batra, 1991), a neki autori navode kako je na koštičavom voću manje patogena u odnosu na *M. fructicola* (Byrde i Willetts, 1977; Villarino i sur., 2012a). Cvjetković (2010) navodi kako *M. fructigena* na šljivi uzrokuje trulež

ploda, a često na plodovima parazitira zajedno s *M. laxa*. Kod breskve i nektarine rijetko uzrokuje trulež plodova, a napad najčešće nije jak (Cvjetković, 2010). Osim na vrstama roda *Prunus*, *Malus* i *Pyrus*, domaćini *M. fructigena* mogu biti i vrste rodova *Cydonia*, *Chaenomeles*, *Corylus*, *Rubus* i *Sorbus* (EPPO, 2019). Smatra se kako je pojava smeđe truleži na plodovima najčešći simptom kojeg izaziva *M. fructigena* (Jones, 1990).

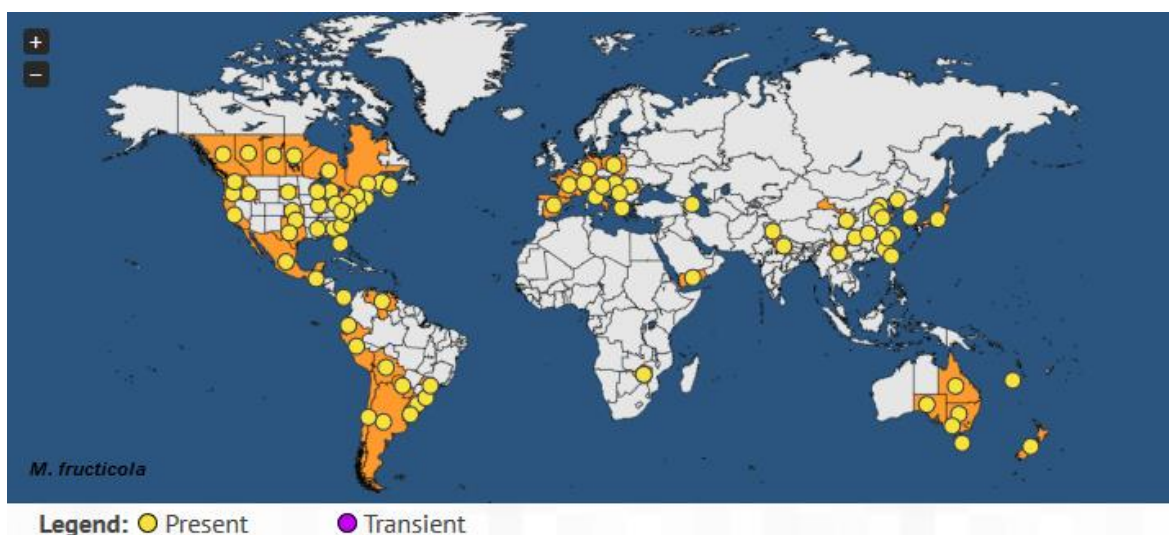


**Slika 2.** Prikaz raširenosti *M. fructigena* u svijetu; izvor: EPPO Global Database (preuzeto s: <https://gd.eppo.int>; 1.11.2019.).

Općenito se smatra kako smeđu trulež plodova koštičavog voća u mediteranskom dijelu Europe prvenstveno uzrokuju vrste *M. laxa* i *M. fructigena* (De Cal i Melgarejo, 1999) te se stoga u literaturi katkad nazivaju i „vrstama Staroga svijeta“ (Côté i sur., 2004a).

*Monilinia fructicola* smatra se najvažnijom *Monilinia* vrstom na koštičavom voću u istočnoj Aziji, Sjevernoj i Južnoj Americi, Australiji i Oceaniji (Corbin, 1963; Byrde i Willetts, 1977; Landgraf i Zehr, 1982; Biggs i Northover, 1985; Biggs i Northover, 1988; Cruickshank i Wade, 1992; Ogawa i sur., 1995; Zhu i sur., 2011) (Slika 3) te se zbog toga ponekad naziva i „vrstom Novog svijeta“ (Côté i sur., 2004a). Do početka 21. stoljeća *M. fructicola* nije bila poznata u Europi te je do 2014. godine Direktivom Vijeća 2000/29/EC bila administrativno regulirana kao karantenski štetni organizam za EU i Hrvatsku (Europska unija, 2000). Usprkos karantenskim mjerama, *M. fructicola* utvrđena je 2001. na breskvi u Francuskoj (EPPO, 2002). U sljedećih petnaest godina nakon prvog nalaza, *M. fructicola* je na koštičavom voću utvrđena u brojnim europskim zemljama, kao što su Švicarska (Bosshard i sur., 2006), Mađarska (Petróczy i Palkovics, 2006), Italija (Pellegrino i sur., 2009), Španjolska (De Cal i sur., 2009a), Njemačka (EPPO, 2010), Slovenija (Munda i Viršček Marn, 2010), Poljska (Poniatowska i sur., 2013), Srbija (Hrustić i sur., 2013), Grčka

(Papavasileiou i sur., 2015b) i Crna Gora (Latinović i sur., 2017), dok je u Austriji i Slovačkoj službeno eradikirana (EPPO, 2006; Ondejková i sur., 2010). Danas se nalazi na EPPO A2 listi (EPPO/CABI, 1996), a status reguliranog štetnog organizma ima u Čileu, Bahreinu, Kazahstanu, Rusiji, Turskoj, Ukrajini, Izraelu, Jordanu i Norveškoj (EPPO, 2019). Osim vrsta rodova *Malus*, *Pyrus* i *Prunus*, kao domaćini tog patogena zabilježene su i vrste rodova *Chaenomeles*, *Cornus*, *Crataegus*, *Cydonia*, *Eriobotrya* i *Vitis* (EPPO, 2019). Iste godine kada je *M. fructicola* prvi puta potvrđena u Europi, Van Leeuwen i sur. (2001) provode analizu rizika te predviđaju kako bi daljnje širenje *M. fructicola* u Europi dovelo do značajnog smanjenja priroda marelice, breskve i nektarine, što bi za posljedicu imalo povećanje troškova zaštite te povećanje rizika od razvoja rezistentnosti na fungicide. Deset godina kasnije, analizu rizika od *M. fructicola* provodi i Europska agencija za sigurnost hrane (eng. *European Food Safety Authority – EFSA*) koja zaključuje kako za suzbijanje ovog patogena nisu potrebne dodatne mjere u odnosu na mjere koje se u praksi primjenjuju za suzbijanje *M. laxa* i *M. fructigena* (EFSA, 2011).

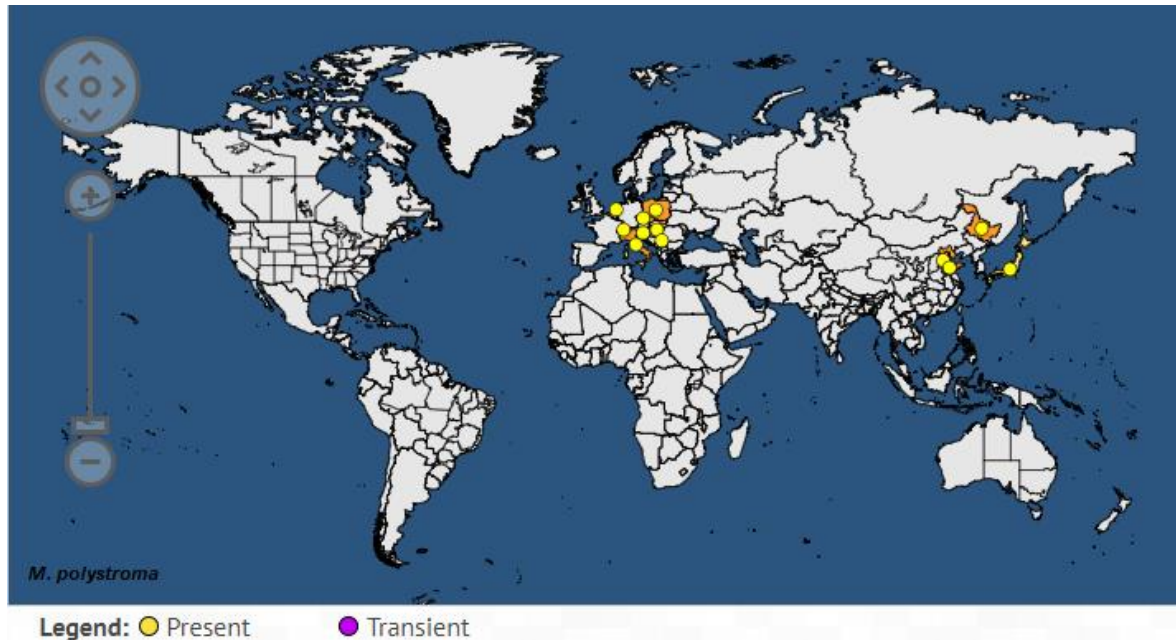


**Slika 3.** Prikaz raširenosti *M. fructicola* u svijetu; izvor: EPPO Global Database (preuzeto s: <https://gd.eppo.int>; 1.11.2019.).

Osim vrsta *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola*, na koštičavom su voću kao uzročnici truleži plodova opisane i neke druge *Monilinia* vrste. *Monilinia polystroma* opisana je kao zasebna vrsta kada su Van Leeuwen i sur. (2002) utvrdili kako se izolati iz Japana, za koje se prvotno smatralo da pripadaju vrsti *M. fructigena*, morfološki i genetski razlikuju od europskih izolata. Istraživanja su pokazala kako *M. polystroma* može biti uzročnik smeđe truleži na jezgričavom (Van Leeuwen i sur., 2002; Petróczy i Palkovics, 2009; EPPO, 2011; Vasić i sur., 2013; Poniatowska i sur., 2013; Di Francesco i sur., 2015) te na koštičavom voću (Van



Leeuwen i sur., 2002; Zhu i Guo, 2010; Hilber-Bodmer i sur., 2012; Poniatowska i sur., 2013; Martini i sur., 2014; Munda, 2015). Raširenost vrste *M. polystroma* u svijetu prikazana je na Slici 4.



**Slika 4.** Prikaz raširenosti *M. polystroma* u svijetu; izvor: EPPO Global Database (preuzeto s: <https://gd.eppo.int>; 1.11.2019.).

Vrsta *M. mumeicola* prvi je puta izolirana u Japanu s japanske marelice (*Prunus mume* (Siebold) Siebold & Zucc.) (Harada i sur., 1990; Nakao, 1992) te je kasnije klasificirana kao zasebna vrsta (Harada i sur., 2004). Potvrđena je i kao uzročnik smeđe truleži višnje (Yin i sur., 2014a), marelice (Yin i sur., 2014b), breskve i nektarine (Hu i sur., 2011) te papaje (*Carica papaya* L.) (Shao, 2009).

Vrsta *M. yunnanensis* opisana je kao uzročnik smeđe truleži breskve i nektarine u Kini (Hu i sur., 2011) te jezgričavog voća (Zhu i sur., 2016). Nađena je i na kineskom glogu (*Crataegus pinnatifida* var. *major*) (Zhao i sur., 2013).

U Republici Hrvatskoj nedovoljno je istražena prisutnost i raširenost *Monilinia* vrsta na koštičavom voću. Cvjetković (2010) navodi kako je *M. laxa* dominantan uzročnik paleži cvjetova i sušenja mladica breskve, nektarine, marelice, šljive, višnje i trešnje, dok smeđu trulež plodova uzrokuju *M. fructigena* i *M. laxa* sa sličnom učestalošću. Bez obzira na takve tvrdnje, sustavnih istraživanja zastupljenosti različitih *Monilinia* vrsta na koštičavom voću u Hrvatskoj nije bilo. Ulaskom i širenjem vrste *M. fructicola* u Europi, posljednjih su godina u nekim zemljama zabilježene značajne promjene u strukturi, odnosno bioraznolikosti

populacija *Monilinia* vrsta (Petróczy i sur., 2012; Poniatowska i sur., 2013; Hrustić i sur., 2015; Abate i sur., 2018). Međutim, neke zemlje, a među njima i Hrvatska, ne raspolažu prijašnjim podacima koji bi omogućili odgovarajuću usporedbu, već se istraživanja raširenosti i bioraznolikosti populacija provode po prvi puta (Papavasileiou i sur., 2015a). Iako je *M. fructicola* na američkom kontinentu udomaćena vrsta, već osamdesetih godina prošlog stoljeća Michailides i sur. (1987) primjećuju povećanje zastupljenosti te vrste u kalifornijskim nasadima šljive i marelice, pripisujući je pojavi rezistentnosti na fungicid benomil. *Monilinia fructicola* identificirana je i kao dominantan uzročnik smeđe truleži plodova koštičavog voća u Kini (Zhu i sur., 2011).

## 2.2. Biologija *Monilinia* vrsta na koštičavom voću

Biologija *Monilinia* vrsta iz skupine *Junctoriae* vrlo je slična (Byrde i Willetts, 1977) (Slika 5). Prezimljuju u pazušcima listova i pupova, rak-ranama na izbojcima i grančicama te na mumificiranim plodovima (mumijama) u obliku micelija (Byrde i Willetts 1977; Landgraf i Zehr 1982; Biggs i Northover 1985). U povoljnim uvjetima sporuliraju i stvaraju konidije (Byrde i Willetts, 1977), koje u nasadu uzrokuju primarne zaraze. Izvor primarnih zaraza mogu biti i askospore (Byrde i Willetts, 1977; Landgraf i Zehr, 1982). Za razliku od *M. fructicola* na američkom kontinentu, *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* u Europi vrlo rijetko stvaraju apotecije (Ogawa i sur., 1995). Kako savršeni stadij *Monilinia* vrsta nikada nije zabilježen u uvjetima u Hrvatskoj, smatra se kako nema značajnu ulogu u ostvarivanju zaraza u nasadu (Cvjetković, 2010).

Pri povoljnim vremenskim uvjetima u proljeće, konidije ili askospore mogu zaraziti cvjetove i izbojke, a nakon toga i nedozrele plodove (Biggs i Northover, 1985; Gell i sur., 2009). Iako svi dijelovi cvijeta mogu poslužiti kao mjesta primarne zaraze, Holb (2008a) navodi kako su najosjetljiviji potpuno otvoreni cvjetovi. Ipak, Holb (2008a) također navodi kako se osjetljivost dijelova cvijeta može razlikovati kod različitih voćnih vrsta. Tako su kod pojave paleži na cvjetovima višnje, njuška tučka, prašnici i latice najčešća mjesta zaraze s *Monilinia* vrstama (Calavan i Keitt, 1948), dok se kod marelice i šljive svi dijelovi cvijeta smatraju vrlo osjetljivima (Holb, 2008a). Marelica se ujedno smatra i najosjetljivijom *Prunus* vrstom na pojavu paleži cvijeta, dok se nešto manje osjetljivima smatraju trešnja, breskva, višnja i šljiva (Holb, 2008a). Prvi simptomi paleži cvjetova pojavljuju se u vidu smeđih lezija na laticama, prašnicima i tučku (Holb, 2008a). Pri vlažnom vremenu, zaraženi dijelovi cvijeta omekšaju i počinju trunuti, dok pri suhom vremenu mogu nastupiti promjene u boji, a cvjetovi se suše i postaju lomljivi (Holb, 2008a). Promjena boje može se proširiti na peteljku i mlade plodove (Byrde i Willetts, 1977). Micelij gljive, preko zaraženih latica i prašnika, može

doprijeti i do cvjetne čaške (Weaver, 1950) i tako dalje zaraziti susjedne cvjetove (Holb, 2008a). Zaraženi cvjetovi mogu otpasti ili ostati na stablu, poprimajući izgled tipične paleži, a zaraza se može proširiti na listove i izbojke koji se počinju sušiti (Byrde i Willetts, 1977; Holb, 2008a). Listovi mogu postati vodenasti te poprimiti svijetlo-smeđu boju (Cvjetković, 2010). U nekim se slučajevima na izbojcima mogu pojaviti rak-rane (Cvjetković, 2010) ili eksudat gumaste konzistencije (Weaver, 1950). U uvjetima nepovoljnima za razvoj paleži, latentno zaraženi cvjetovi mogu se razviti u latentno zaražene plodove (Northover i Cerkauskas, 1994), a zaraze mogu ostati latentne sve dok ne nastupe uvjeti povoljni za rast gljive u plodu i pojavu truleži (Byrde i Willetts, 1977; Cruickshank i Wade, 1992; Ogawa i sur., 1995; Gell i sur., 2008). Zehr (1982) navodi kako inokul sa zaraženih cvjetova može biti izvor zaraze za nedozrele plodove ili za ranije sorte breskve, ali ne i za one kasnije. Byrde i Willetts (1977) navode kako je smeđa trulež ploda najdestruktivnija faza bolesti uzrokovana zarazom s *Monilinia* vrstama. Prva indikacija pojave smeđe truleži jest pojava manje, okrugle smeđe pjege na plodu koja se postupno širi (Byrde i Willetts, 1977; Cvjetković, 2010). Kako bolest napreduje, micelij probija epidermu ploda i stvara nakupine sporodohija u obliku jastučića na površini ploda (Byrde i Willetts, 1977; EPPO, 2009). Sporodohiji često stvaraju karakterističan oblik koncentričnih krugova oko mjesta zaraze (Byrde i Willetts, 1977; Cvjetković, 2010). U kasnijim stadijima bolesti, plod može potpuno izgubiti boju i vlagu te poprimiti karakterističan oblik mumije (Byrde i Willetts, 1977).

Mumije se formiraju ispreplitanjem hifa na površini ploda i stvaranjem strome, koja se u ljetnom razdoblju razvija osam do 16 tjedana. Predstavljaju tvorevine sastavljene od strome i stanica domaćina, vrlo su čvrste strukture te se teško razgrađuju (Roberts i Dunegan, 1924; Terui i Harada, 1966; Willetts i Harada, 1984; Batra, 1991). Villarino i sur. (2010) upravo mumificirane plodove na stablu identificiraju kao glavne izvore primarnih zaraza u nasadu, dok mumije koje nastaju od otpalih plodova na tlu smatraju manje značajnim izvorom inokula. Razlog tome moguće je antagonističko djelovanje drugih mikroorganizama u tlu na gljive roda *Monilinia* (Hong i sur., 2000).

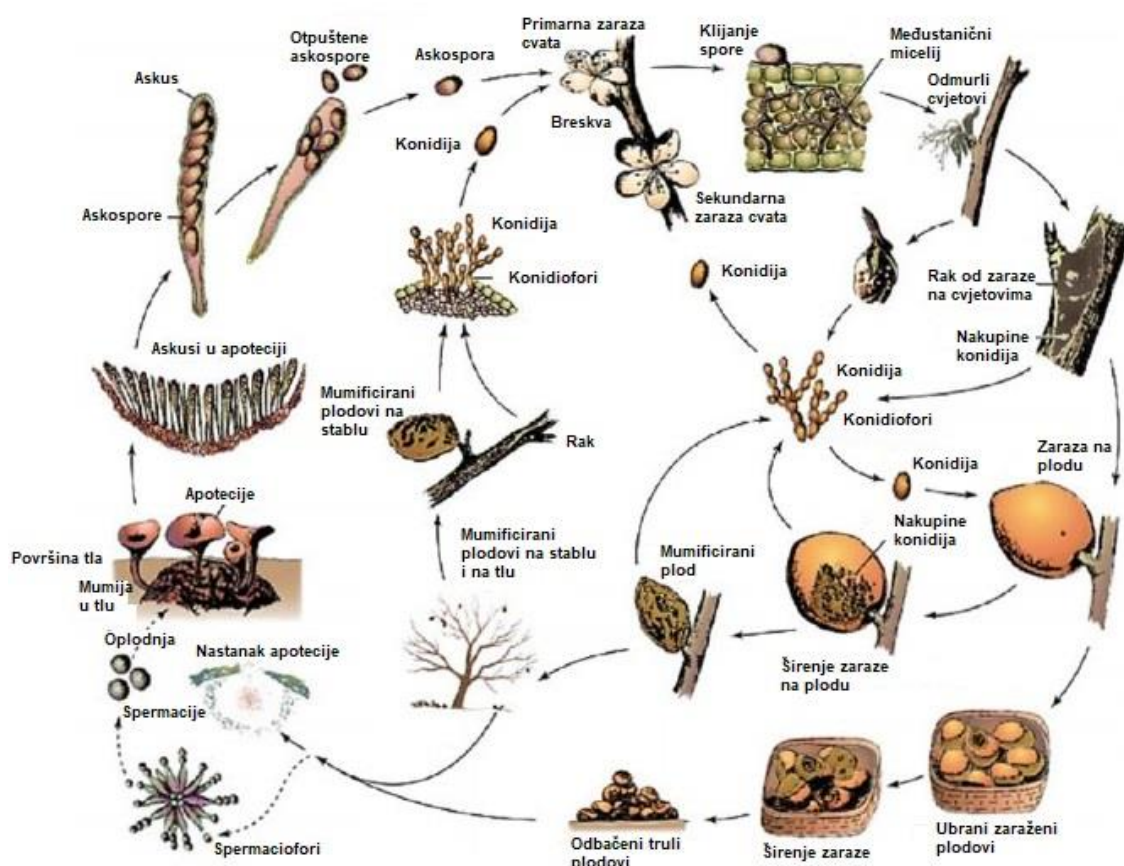
Holtz i sur. (1998) provode istraživanje razvoja apotecija kod vrste *M. fructicola* na plodovima breskve i nektarine u Kaliforniji. Zaključuju kako do njihovog formiranja dolazi samo u veljači ili početkom ožujka na mumificiranim plodovima zaostalima u voćnjaku u listopadu, studenom ili prosincu prijašnje godine, i to na površinama koje nisu obrađivane te na kojima nisu primijenjeni herbicidi. Osim toga, mumificirani plodovi trebaju proći razdoblje inkubacije na niskim temperaturama od najmanje osam tjedana te trebaju biti u doticaju s tlom. Razvoj apotecija izostaje kod plodova koji nisu bili u potpunosti stromatizirani te kod mumija koje su u voćnjaku ostavljene u kolovozu, rujnu, siječnju ili

veljači, dok pozicija plodova (na ili ispod površine tla) nema učinak na njihov razvoj. Willetts i Harada (1984) također utvrđuju kako je razdoblje stvaranja strome kritično za razvoj apotecija *M. fructicola* u Japanu. To razdoblje treba uključivati četiri do osam tjedana na temperaturi između 15 i 20 °C, četiri do osam tjedana na temperaturi između 20 i 30 °C te tri do četiri mjeseca na nižim temperaturama (0-15 °C).

*Monilinia* vrste mogu zaraziti plod u bilo kojem stadiju razvoja, ali se osjetljivost plodova na zarazu povećava s njihovim dozrijevanjem (Ogawa i sur., 1995; Xu i sur., 2007; Gell i sur., 2008; Villarino i sur., 2011). Ipak, zaraza često ostaje latentna čak i nakon berbe, a u takvim slučajevima do pojave simptoma dolazi tijekom skladištenja plodova (Byrde i Willetts, 1977). Smatra se kako su učestalost latentnih zaraza s *Monilinia* vrstama i učestalost pojave simptoma smeđe truleži u vrijeme i nakon berbe u pozitivnoj korelaciji (Northover i Cerkauskas, 1994; Emery i sur., 2000; Luo i Michailides, 2001; Gell i sur., 2008). *Monilinia* vrste zarazu mogu vršiti preko rana na plodovima (Xu i Robinson, 2000; Holb, 2006; Van Brouwershaven i sur., 2010; Hrustić i sur., 2015), no mogu zaraziti i neoštećeni plod (Michailides i Morgan, 1997; Rungjindamai i sur., 2014; Hrustić i sur., 2015). Ipak, oštećenja na plodovima mogu ubrzati propadanje plodova breskve (Jerome, 1958), marelice (Wade, 1956) i šljive (Valleau, 1915). Michailides i Morgan (1997) navode kako se kod plodova šljive koje na stablu rastu u skupini mogu stvoriti povoljniji uvjeti za zarazu s *M. fructicola*. Razlog tome je smanjena količina epikutikularnog voska na površini ploda koji predstavlja barijeru za ulazak gljive u plod. Gell i sur. (2009) utvrđuju kako je pojavnost latentnih i simptomatičnih zaraza bila znatno viša na nektarinama u usporedbi s breskvama, što se može pripisati različitoj građi površine ploda (Lee i Bostock, 2006). Cvjetković (2010) također navodi kako su plodovi nektarine osobito osjetljivi na smeđu trulež.

Sekundarni inokul *Monilinia* vrsta stvara se na zaraženim biljnim organima (Landgraf i Zehr, 1982). Kako su *Monilinia* vrste policiklični patogeni, sekundarni inokul ima značajan učinak na pojavnost i jačinu razvoja bolesti (Byrde i Willetts, 1977; Hong i sur., 1997). Osim toga, može se razviti na bilo kojem dijelu zaraženog tkiva u kojem je dovoljno vlage za sporulaciju gljive (Landgraf i Zehr, 1982). Sve od trenutka pojave prvih simptoma na plodu pa do berbe, u zraku se neprekidno povećava koncentracija spora *Monilinia* vrsta u voćnjaku (Corbin i sur., 1968; Holb, 2008b). Northover i Biggs (1995) navode kako u nasadu brzo nastupa propadanje neoštećenih plodova breskve i trešnje od smeđe truleži uslijed visokih koncentracija inokula vrste *M. fructicola*. U istraživanju provedenom u dolini rijeke Ebro u Španjolskoj, Villarino i sur. (2012a) utvrđuju kako se praćenjem dinamike sekundarnog inokula u voćnjaku može predvidjeti pojava smeđe truleži breskve prije, ali i nakon berbe. Fry (1982) također navodi kako je predviđanje pojave smeđe truleži potrebno temeljiti

upravo na količini sekundarnog inokula u nasadu ili na broju sekundarnih ciklusa bolesti. To potvrđuje podatak kako broj spora *Monilinia* vrsta na površini ploda breskve i nektarine u trenutku berbe može iznositi od 1000 do 100000 spora po plodu (Gell i sur., 2009). Hong i sur. (1997) navode kako jedan plod breskve zaražen s *M. fructicola* može proizvesti od 3,5 do 11,7 milijuna konidija tijekom vegetacije. Villarino i sur. (2012a) utvrđuju kako do propadanja cjelokupnog uroda breskve nakon berbe može doći pri učestalosti smeđe truleži od 30 % u trenutku berbe.



**Slika 5.** Životni ciklus *Monilinia* vrsta na koštičavom voću; izvor: Plant Pathology, 3<sup>rd</sup> Edition. Autor: George N. Agrios. Academic Press, 1988 (Agrios, 1988).

Konidije *Monilinia* vrsta mogu se širiti vjetrom, vodom, kukcima, pticama ili ljudskim aktivnostima (Byrde i Willetts, 1977). Njihovo preživljavanje, kolonizacija biljnih organa, latentnost, klijanje, razmnožavanje, prenošenje i depozicija usko su vezani uz okolišne uvjete kao što su temperatura, relativna vlažnost zraka, količina oborina te smjer vjetera (Corbin i sur., 1968; Bannon i sur., 2009). Ipak, najvažniji abiotski čimbenici koji utječu na klijanje konidija i razvoj propagula na površini ploda su temperatura i relativna vlažnost zraka (Magan i Lacey, 1988; Casals i sur., 2010). Visoka vlažnost zraka i umjerene

temperature predstavljaju povoljne uvjete za zarazu s *M. fructicola* (Biggs i Northover, 1988), a slobodna vlaga neophodna je za klijanje spora (Clayton, 1942). Weaver (1950) navodi kako je temperatura zraka od 25 °C optimalna za zarazu cvjetova breskve i trešnje te da se jačina zaraze povećava s relativnom vlagom zraka, što kasnije potvrđuju Biggs i Northover (1988) te Watson i sur. (2002). Weaver (1950) također navodi kako je temperatura zraka od 15 do 25 °C optimalna za pojavu smeđe truleži. Najkraće inkubacijsko razdoblje zapaženo je kod visokih razina inokula i većih oštećenja na pokožici zrelih plodova (Corbin, 1963), dok uslijed zaraze s *M. fructicola* inkubacija može trajati znatno kraće u uvjetima dužeg trajanja vlažnosti (Biggs i Northover, 1988). Hong i Michailides (1998) navode kako je stopostotna klijavost askospora zabilježena nakon inkubacijskog perioda od 24 sata na temperaturama od 15, 20 i 25 °C. Xu i sur. (2001) navode kako su konidije vrste *M. fructigena* sposobne klijeti u rasponu temperatura od 3 do 30 °C. Kod vrste *M. laxa*, najveće klijanje konidija zabilježeno je pri rasponu temperatura od 15 do 25 °C te izloženosti stopostotnoj relativnoj vlažnosti zraka, dok je 88 % konidija prokljalo u rasponu temperatura od 5 do 30 °C (Tamm i Fluckiger, 1993). Tian i Bertolini (1999) zabilježili su klijanje konidija vrste *M. laxa* pri temperaturi -4 °C. Klijanje konidija vrste *M. fructigena* slabije je kod relativne vlažnosti zraka niže od 97 %, dok se optimalnom temperaturom smatra raspon od 23 do 25 °C (Casals i sur., 2010). Isti autori utvrđuju kako u *in vitro* uvjetima konidije *Monilinia* vrsta mogu klijeti u rasponu temperatura od 0 do 35 °C, dok do inhibicije klijanja dolazi kod temperature od 38 °C. Papavasileiou i sur. (2015a) uspoređuju razlike u rastu micelija i klijanju konidija vrsta *M. laxa* i *M. fructicola* na različitim temperaturama te utvrđuju kako su te razlike značajnije kada se promatra rast micelija. Test rasta micelija *Monilinia* vrsta na različitim temperaturama također je predmet istraživanja u Italiji i Srbiji (Abate i sur., 2018; Hrustić i sur., 2018). Još u prošlom stoljeću, Harada (1977) utvrđuje kako trajanje dnevnog i noćnog osvjetljenja utječe na rast i sporulaciju *Monilinia* vrsta te na formiranje strome.

Brojni autori navode fitopatološke značajke vrste *M. fructicola* zbog kojih se smatra potencijalno opasnijom u odnosu na *M. laxa* i *M. fructigena*. Naime, *M. fructicola* raste brže i sporulira obilnije (Byrde i Willetts, 1977; Ogawa i sur., 1995; Lane, 2002; Hu i sur., 2011; Abate i sur., 2018), ima veću klijavost konidija (Villarino, 2010) te češće razvija teleomorfni (spolni) stadij (Byrde i Willetts, 1977; Landgraf i Zehr, 1982). Češće stvaranje apotecija u prirodi pridonosi povećanju mogućih izvora primarnog inokula, čime se povećava i njen evolucijski potencijal (Free i sur., 1996). Visoka genetska heterogenost izolata *M. fructicola* iz SAD-a i Kine (Förster i Adaskaveg, 2000; Fan i sur., 2010) ukazuje na pojavu seksualne rekombinacije u područjima u kojima je savršeni stadij ovog patogena uobičajen. Istraživanja genetske varijabilnosti izolata vrste *M. fructicola* provode se i u Europi (Jänsch

i sur., 2012; Villarino i sur., 2012b; De Cal i sur., 2014; Papavasileiou i sur., 2015b), gdje u prirodnim uvjetima još nije zabilježeno stvaranje spolnog stadija (Jänsch i sur., 2012; Villarino i sur., 2012b; De Cal i sur., 2014). Villarino (2010) predviđa kako će u Europi na koštičavom voću *M. fructicola* djelomično potisnuti vrstu *M. laxa*, dok će obje vrste gotovo u potpunosti potisnuti vrstu *M. fructigena*.

### 2.3. Identifikacija *Monilinia* vrsta

Na plodovima koje parazitiraju, *Monilinia* vrste uzrokuju vrlo slične simptome na temelju kojih ih nije moguće međusobno razlikovati (Van Leeuwen, 2000; Hrustić i sur., 2015).

U tu su svrhu u svijetu razvijene brojne metode identifikacije *Monilinia* vrsta, od kojih se neke temelje na morfološkim obilježjima pojedinih vrsta u *in vitro* uvjetima, dok neke na molekularnoj razini omogućuju brzu i pouzdanu detekciju te identifikaciju.

Identifikacija *Monilinia* vrsta prema morfološkim obilježjima u čistoj kulturi temelji se na identifikacijskim ključevima te se takve metode ne mogu smatrati u potpunosti pouzdanima. Naime, identifikaciju na temelju morfologije otežava česta pojava morfološki atipičnih izolata, kao i pojava zajedničkih morfoloških obilježja različitih vrsta (Byrde i Willetts, 1977; loos i Frey, 2000; Gell i sur., 2007). Već je sedamdesetih i osamdesetih godina prošlog stoljeća zabilježeno kako identifikacija *Monilinia* vrsta u čistoj kulturi može biti otežana zbog velike fenotipske varijabilnosti između pojedinih izolata unutar iste vrste, koji se mogu morfološki značajno razlikovati (Penrose i sur., 1976; Byrde i Willetts, 1977; Harada, 1977; Batra, 1979; Wilcox, 1989). Općenito se smatra kako je identifikacija na temelju morfologije dugotrajna, podložna uvjetima okoline te često nepouzdana (Ma i Michailides, 2007; Petróczy i sur., 2012; Hrustić i sur., 2015; Abate i sur., 2018; Wang i sur., 2018).

Unatoč nedovoljnoj pouzdanosti metoda koje se baziraju na analizi morfoloških obilježja *Monilinia* vrsta u svrhu identifikacije, njihova primjena omogućava promatranje i utvrđivanje različitih fenotipskih obilježja pojedinih izolata, poput boje, brzine i načina rasta ili duljine klične cijevi (Van Leeuwen i Van Kesteren, 1998; De Cal i Melgarejo, 1999). Usporedbu različitih fenotipskih obilježja, kako između vrsta, tako i unutar same vrste, omogućava određivanje morfoloških profila *Monilinia* vrsta. Lane (2002) razvija sinoptički ključ za identifikaciju *Monilinia* vrsta na temelju morfoloških obilježja u čistoj kulturi, a isti dijagnostički protokol preporuča i EPPO (2009). Uvjeti inkubacije te hranjiva podloga mogu uvelike utjecati na ispoljavanje morfoloških obilježja u vidu boje i oblika kolonije, veličine konidija ili formiranja kličnih cijevi (Lane, 2002). Lane (2002) također navodi kako ova metoda nije prikladna za identifikaciju *Monilinia* vrsta prilikom izravne izolacije sa zaraženog

biljnog materijala, ali je njena prednost što zahtijeva samo osnovne mikrobiološke vještine i opremu.

Upravo zbog otežane identifikacije *Monilinia* vrsta klasičnim metodama koje se temelje na morfologiji i identifikacijskim ključevima, pojavila se potreba primjene suvremenijih i pouzdanijih načina identifikacije, kao što je metoda lančane reakcije polimerazom (eng. *polymerase chain reaction* – PCR). Primjena ove metode omogućila je relativno brzu i pouzdanu dijagnostiku invazivnih i udomaćenih biljnih patogena, pa tako i razlikovanje vrste *M. fructicola* od vrsta *M. laxa* i *M. fructigena* u Europi. Martin i sur. (2000) navode kako se primjena dijagnostičkih metoda temeljenih na analizi deoksiribonukleinske kiseline (DNK) progresivno povećava, posebice za potrebe identifikacije karantenskih štetnih organizama.

U svrhu identifikacije *Monilinia* vrsta, u svijetu su razvijene relativno brojne PCR metode (Fulton i Brown, 1997; Snyder i Jones, 1999; Förster i Adaskaveg, 2000; loos i Frey, 2000; Boehm i sur., 2001; Ma i sur., 2003a; Côté i sur., 2004a; Gell i sur., 2007). Određene metode pružaju mogućnost identifikacije pojedine *Monilinia* vrste, dok istovremeno ne omogućavaju identifikaciju ostalih. Fulton i Brown (1997) razvijaju metodu pomoću koje je moguće razlikovati vrstu *M. fructicola* od vrsta *M. laxa* i *M. fructigena*, ali ne i vrste *M. laxa* i *M. fructigena* međusobno (loos i Frey, 2000). S druge strane, Snyder i Jones (1999) razvijaju PCR metodu koja omogućava razlikovanje vrste *M. laxa* od vrste *M. fructicola*. EPPO (2009) navodi kako neke metode (Fulton i Brown, 1997; Snyder i Jones, 1999) nisu dovoljno pouzdane jer se temelje na maloj podjedinici (eng. *small subunit* – SSU) ribosomske DNK grupe I introna, za koju je kasnije utvrđeno da nedostaje kod nekih *M. fructicola* izolata (Fulton i sur., 1999; Côté i sur., 2004b). loos i Frey (2000) razvijaju PCR metodu na temelju nekodirajuće intergenske regije (eng. *internal transcribed spacer* – ITS) između 18S i 28S ribosomske ribonukleinske kiseline (rRNK) gena vrsta *M. fructigena* i *M. laxa* te navode kako je analiza ITS sekvenci pokazala najmanji polimorfizam između navedenih vrsta. Kasnije, Côté i sur. (2004a) navode kako sekvenciranje ITS regija genoma vrsta *M. fructigena*, *M. fructicola*, *M. laxa* i *M. polystroma* nije dovoljno pouzdano upravo radi velike sličnosti unutar samog roda. Spomenuti autori razvijaju PCR metodu koja u jednoj reakciji istovremeno (eng. *multiplex*) detektira i razlikuje vrste *M. fructigena*, *M. fructicola*, *M. laxa* i *M. polystroma*. Za usporedbu, u metodi razvijenoj od strane autora loos i Frey (2000), u svrhu identifikacije *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* potrebne su tri zasebne PCR reakcije jer stvaraju PCR produkte iste veličine (Côté i sur., 2004a). Abate i sur. (2018) modificiraju PCR metodu prema Côté i sur. (2004a) koja omogućava provođenje izravne PCR reakcije bez prethodne ekstrakcije DNK iz micelija ili konidija.



U suvremenoj se dijagnostici gljiva danas sve više primjenjuju filogenetske analize koje uključuju direktno sekvenciranje te analizu dobivenih sekvenci. White i sur. (1990) razvijaju PCR protokol za umnažanje i direktno sekvenciranje rRNK gena kod gljiva te početnice ITS1 i ITS4 koje umnažaju ITS regiju. Osim identifikacije do razine vrste, analize sekvenci mogu pružiti i bolji uvid u filogenetske odnose između vrsta.

Posljednjih se godina za identifikaciju *Monilinia* vrsta razvijaju i metode lančane reakcije polimerazom u realnom vremenu (eng. *real time PCR* – RT-PCR) (Van Brouwershaven i sur., 2010; Fan i sur., 2014; Papavasileiou i sur., 2016; Garcia-Benitez i sur., 2017; Abate i sur., 2018; Wang i sur., 2018). Wang i sur. (2018) ističu kako je, u odnosu na konvencionalne, najveća prednost RT-PCR metoda veća osjetljivost i specifičnost te razvijaju RT-PCR metodu za detekciju *M. laxa*, *M. fructigena*, *M. fructicola*, *M. polystroma*, *M. yunnanensis* i *M. mumeicola* s plodova jabuke. Osim u svrhu identifikacije, suvremene RT-PCR metode potencijalno omogućavaju i kvantifikaciju gustoće spora *Monilinia* vrsta u samom nasadu (Luo i sur., 2007).

Dijagnostički protokol za identifikaciju vrste *M. fructicola* razvijen od strane EPPO-a (2009) preporuča konvencionalnu PCR metodu autora Loos i Frey (2000) te RT-PCR metodu autora Van Brouwershaven i sur. (2010).

## 2.4. Mjere suzbijanja *Monilinia* vrsta

Zaštita od bolesti koštičavog voća u suvremenoj intenzivnoj voćarskoj proizvodnji temelji se na načelima integralne, odnosno integrirane zaštite bilja, koja podrazumijeva integraciju svih kemijskih i nekemijskih mjera, u svrhu smanjenja gubitaka u proizvodnji na najmanju moguću mjeru. Uobičajene mjere suzbijanja bolesti uzrokovanih *Monilinia* vrstama prema načelima integrirane zaštite bilja uključuju uklanjanje zaraženih biljnih dijelova, uklanjanje mumificiranih plodova, pažljivu manipulaciju plodovima kako bi se smanjila mogućnost njihova oštećenja i primjenu sredstava za zaštitu bilja (Cvjetković, 2010). Brannen i Schnabel (2005) navode kako strategija kontrole smeđe truleži treba uključivati higijenske, agrotehničke i kemijske mjere. U takvom je sustavu zaštite bilja primjena fungicida dopuštena samo uz određena ograničenja, tek kada druge mjere nisu u potpunosti smanjile opasnost od gospodarskih šteta koje mogu izazvati štetni organizmi (Ministarstvo poljoprivrede, 2013). U svrhu racionalizacije primjene kemijskih mjera suzbijanja u nasadu breskve, Fazinić i sur. (2017) istražuju upotrebu prognoznog modela za *Monilinia* vrste. Iako prognozni model predviđa vrijeme ostvarenih zaraza u nasadu koristeći podatke s agrometeorološke stanice, autori zaključuju kako je njegova primjena ograničena, upravo jer su zaraze s *Monilinia* vrstama u nasadu vrlo često latentne te do intenzivne pojave

simptoma na plodovima najčešće dolazi blizu berbe ili u skladištu. Larena i sur. (2005) navode kako primjena fungicida prije berbe često nije dovoljno učinkovita. U Republici Hrvatskoj trenutno nema registriranih fungicida za zaštitu jezgričavog i koštičavog voća od smeđe truleži nakon berbe (Ministarstvo poljoprivrede, 2019). Iz tog razloga, veliki potencijal u zaštiti plodova koštičavog voća od skladišnih bolesti ima primjena bioloških mjera zaštite, a u svijetu i Hrvatskoj istražuju se i fizikalne mjere zaštite od pojave smeđe truleži na plodovima.

#### 2.4.1. Agrotehničke mjere suzbijanja *Monilinia* vrsta

Ključnu mjeru kontrole pojave smeđe truleži u nasadima koštičavog voća predstavlja uklanjanje zaraženih biljnih organa iz voćnjaka, odnosno uklanjanje izvora primarnog inokula (Kovačević i sur., 1960; Kišpatić i Maceljski, 1981; Landgraf i Zehr, 1982; Holtz i sur., 1998; Cvjetković, 2010). Gell i sur. (2009) potvrđuju kako uklanjanje mumificiranih plodova te nekrotičnih grančica sa stabala i s tla znatno doprinosi smanjenju primarnog inokula u španjolskim voćnjacima. Uklanjanjem mumija smanjuje se i mogućnost stvaranja apotecija, posebno kod gljive *M. fructicola* u dijelovima svijeta u kojima je to česta pojava (Ivić i Novak, 2012). Standardna agrotehnička mjera u nasadima koštičavog voća je i prorjeđivanje plodova, a upravo zaraženi prorijeđeni plodovi koji zaostaju na tlu mogu predstavljati važan izvor sekundarnog inokula (Landgraf i Zehr, 1982; Hong i sur., 1997). U svrhu smanjenja pojave smeđe truleži u voćnjaku, prorjeđivanje plodova potrebno je provesti rano u vegetacijskoj sezoni (Landgraf i Zehr, 1982), a prorijeđene je plodove potrebno uništiti ili ukloniti iz nasada (Hong i sur., 1997). Kako kontakt između plodova olakšava širenje smeđe truleži, Michailides i Morgan (1997) naglašavaju važnost prorjeđivanja plodova šljive koji rastu skupini i često se dodiruju. Holb (2006) navodi kako i zaoravanje otpalih plodova može znatno smanjiti količinu inokula u voćnjaku, a Villarino i sur. (2010) kako važan izvor sekundarnog inokula mogu predstavljati i neoplođeni plodovi koji tijekom zime zaostaju na stablu te je i takve plodove potrebno ukloniti iz nasada. Važnu agrotehničku mjeru predstavlja i uklanjanje mumificiranih plodova te zaraženih izboja tijekom zimske rezidbe u voćnjaku (Kišpatić i Maceljski, 1981; Holtz i sur., 1998; Cvjetković, 2010). Osim toga, smanjenju mogućnosti pojave biljnih bolesti u nasadu doprinosi i redovno održavanje prozračnosti krošnje te izbjegavanje podizanja nasada na lokacijama na kojima je viša vlažnost zraka ili na kojima se zadržava voda (Ivić i Novak, 2012). Isti autori navode kako je prilikom berbe i transporta potrebna pažljiva manipulacija plodovima radi izbjegavanja mehaničkih oštećenja, čime je olakšan prodor gljive u plod.

Istraživanje provedeno na Novom Zelandu pokazalo je kako folijarna prihrana kalcijem može znatno smanjiti pojavu smeđe truleži na plodovima breskve prije i nakon berbe (Elmer i sur., 2007).

U literaturi se također navode podaci o različitoj osjetljivosti *Prunus* vrsta na palež cvijeta i smeđu trulež te se općenito smatra kako su neke koštičave voćne vrste osjetljivije na zarazu s *Monilinia* vrstama od drugih. Tako Cvjetković (2010) navodi kako su plodovi trešnje osjetljiviji na zarazu s *M. fructigena* od plodova višnje, dok su na zarazu s *M. laxa* posebno osjetljivi plodovi nektarine (Ivanović i Ivanović, 2005; Cvjetković, 2010). Kao posebno osjetljiva na palež cvijeta i izbojaka ističe se marelica, kod koje uslijed zaraze s *M. laxa* može doći do sušenja čitavog stabla (Cvjetković, 2010). Izborom otpornijih sorti također je moguće smanjiti pojavu smeđe truleži u nasadu. Prema Turecheku i sur. (2001), najosjetljivije sorte breskve na zarazu s *M. fructicola* su Mayflower, Halehaven, Southhaven i Summercrest, osjetljive su Cresthaven, Early Sunhaven, Monroe, Redhaven i Sunhaven, a relativno su otporne Glohaven i Elberta. U odnosu na breskvu, nektarina se smatra osjetljivijom na smeđu trulež (Ivić i Novak, 2012). Kao vrlo osjetljive sorte ističu se Armking i Caldesi 2010 (Turechek i sur., 2001), dok se sorte marelice Pannonia, Mađarska najbolja, Kečkemetska ruža, Ceglédi Bibor i Rakovszky spominju kao relativno otporne na palež cvijeta (Holb, 2006; Holb, 2008a). Čačanska lepotica navodi se u kontekstu relativno otporne sorte šljive, a President, Stanley i California Blue kao osjetljive (Dragoyski i sur., 2005; Holb, 2008a). Kako bi se spriječilo ili usporilo širenje smeđe truleži, Michailides i Morgan (1997) preporučuju uzgoj sorti šljive čiji plodovi ne rastu u skupinama. Ivanović i Ivanović (2005) te Milatović i sur. (2011) govore o osjetljivosti sorata trešnje i višnje. Tako se sorte trešnje Celeste, Bing, Van, Stella, Lapins i Newstar te višnje Oblačinska, Keleris 16 i Hajmanova mogu svrstati u osjetljive. Sorte višnje Rexelle i Keleris 14 smatraju se umjereno osjetljivima, a Čačanski rubin i Richmorency relativno otpornima.

#### 2.4.2. Kemijske mjere suzbijanja *Monilinia* vrsta

Primjena sredstava za zaštitu bilja u svrhu suzbijanja uzročnika paleži cvjetova i sušenja mladica te smeđe truleži plodova, također je uobičajena mjera zaštite u gotovo svim intenzivnim nasadima koštičavog voća u svijetu. Cvjetković (2010) preporuča do tri tretiranja tijekom cvatnje u zaštiti breskve, šljive, marelice, trešnje i višnje od zaraze s *M. laxa*, ovisno o osjetljivosti sorte, kišnim razdobljima te trajanju same cvatnje. Kod osjetljivih sorti trešanja preporuča se primjena sredstava za zaštitu bilja na početku cvatnje, a ako za vrijeme cvatnje potraju kišna razdoblja, tretiranje se preporuča ponoviti na kraju cvatnje (Šubić, 2016). Zimsko tretiranje fungicidima na osnovi bakarnih spojeva u Hrvatskoj uobičajena je

kemijska mjera zaštite koštičavog voća (Cvjetković, 2010; Šubić, 2016). Broj primjena nekog fungicida u nasadu prvenstveno ovisi o njegovim karakteristikama, vrsti i sorti biljke domaćina te vremenu i intenzitetu pojave bolesti. Spiegel i Stammler (2006) navode kako su za suzbijanje paleži cvjetova potrebna do tri tretiranja fungicidima, a za suzbijanje smeđe truleži do pet tretiranja tijekom razvoja ploda i dozrijevanja.

U svrhu suzbijanja gljiva roda *Monilinia* na koštičavom voću, u Hrvatskoj je registriran veći broj sredstava za zaštitu bilja. Za tu namjenu odobreni su fungicidi na osnovi bakarnih spojeva, boskalida, ciprodinila, difenkonazola, fluopirama, fludioksonila, fenheksamida, fenbukonazola, piraklostrobina, tebukonazola, trifloksistrobina i tiofanat-metila (Ministarstvo poljoprivrede, 2019). Učinkovitost navedenih fungicida, između ostalog, ovisi i o osjetljivosti jedinki unutar populacije *Monilinia* vrsta u voćnjaku, ali i o količini inokula u samom nasadu.

Pojava rezistentnosti patogena može značajno utjecati na učinak pojedinog fungicida u praksi. Rezistentnost na fungicide složena je pojava, koja ponajprije ovisi o sklonosti samog patogena da razvije mehanizme rezistentnosti, mogućnosti fungicida da potakne pojavu rezistentnosti u patogenu na temelju mehanizma i načina djelovanja te agronomskoj praksi koja podrazumijeva uzgojni sustav, sortiment i program zaštite unutar nasada (Kuck i Russell, 2006; Miessner i Stammler, 2010). U svijetu postoje brojna istraživanja osjetljivosti *Monilinia* vrsta na fungicide. FRAC (2014) svrstava gljive roda *Monilinia* u skupinu patogena kod kojih postoji srednji rizik od razvoja rezistentnosti na fungicide. Unutar roda *Monilinia*, najveći broj slučajeva zabilježene rezistentnosti ili smanjene osjetljivosti na fungicide veže se uz vrstu *M. fructicola* (Schnabel i Dai, 2004; Amiri i sur., 2010; May-de Mio i sur., 2011; Chen i sur., 2013a; Hrustić i sur., 2018). Naime, ona pokazuje najveću sposobnost prilagodbe na izloženost fungicidima (Schnabel i Dai, 2004; Luo i Schnabel, 2008). Osim toga, u svijetu se provode i brojna istraživanja osjetljivosti na fungicide srodnih vrsta gljiva iz porodice Sclerotiniaceae (McManus i sur., 1999; Baroffio i sur., 2003; Matheron i Porchas, 2004; Förster i sur., 2007; Myresiotis i sur., 2007; Fillinger i sur., 2008; Weber, 2010; Esterio i sur., 2011; Leroch i sur., 2011; Weber i Hahn, 2011; Moorman i sur., 2012; Fernández-Ortuño i sur., 2016a; Fernández-Ortuño i sur., 2016b; Ren i sur., 2016; Amiri i sur., 2017; Fernández-Ortuño i sur., 2017).

Prvi slučaj rezistentnosti fitopatogenih gljiva u Hrvatskoj zabilježen je 1992. godine, kod vrste *Erysiphe necator* Schwein. na triadimefon, aktivnu tvar iz kemijske skupine triazola (Cvjetković i Isaković, 1992), koja danas više nije odobrena na razini EU. U Hrvatskoj je sedamdesetih godina prošlog stoljeća istraživana učinkovitost fungicida u zaštiti višnje Maraske od pojave paleži izboja uzrokovanom gljivom *M. laxa*, (Kišpatić i sur., 1976). Iako u Hrvatskoj nisu provedena istraživanja osjetljivosti *Monilinia* vrsta na fungicide novijeg

datuma, provode se istraživanja osjetljivosti nekih drugih vrsta gljiva kao što su *E. necator* (Cvjetković i Isaković, 1992) i *Botrytis cinerea* Pers (Miličević, 2005), kao i ispitivanja učinkovitosti fungicida (Cvjetković i sur., 1987; Tomić, 1993).

Skupina fungicida metil benzimidazol karbamati (eng. *methyl benzimidazole carbamates* – MBC), kemijske skupine tiofanati, inhibira rad motornih proteina i stanični skelet (skupina B), odnosno inhibira stvaranje beta-tubulina tijekom mitoze (skupina B1) (FRAC, 2020). Jones i Ehret (1976) u SAD-u te Whan (1976) u Australiji još sedamdesetih godina prošlog stoljeća utvrđuju rezistentnost vrste *M. fructicola* na fungicide iz skupine metil benzimidazol karbamata, a rezistentnost *Monilinia* vrsta potvrđena je i u kasnijim istraživanjima (Ogawa i sur., 1984; Michailides i sur., 1987; Penrose, 1990; Zehr i sur., 1991; Sanoamuang i Gaunt, 1995; Ma i sur., 2003b; Yoshimura i sur., 2004; Amiri i sur., 2008; Luo i Schnabel, 2008; May-De Mio i sur., 2011; Weger i sur., 2011; Malandrakis i sur., 2012; Chen i sur., 2013a; Egüen i sur., 2015; Egüen i sur., 2016). Upravo se smanjena osjetljivost vrste *M. fructicola* na metil benzimidazol karbamate navodi kao jedan od mogućih razloga sve veće zastupljenosti te vrste u zemljama diljem svijeta (Michailides i sur., 1987). FRAC (2020) također metil benzimidazol karbamate svrstava u visoko rizičnu skupinu od pojave rezistentnosti, a za ovu je skupinu fungicida karakteristična i pojava unakrsne rezistentnosti (Brent i Hollomon, 2007). Brent i Hollomon (2007) navode kako se rezistentnost na benzimidazole javila već krajem šezdesetih godina prošlog stoljeća, samo jednu do dvije godine nakon njihove introdukcije. U ovu se skupinu fungicida ubraja i aktivna tvar tiofanat-metil.

Boskalid pripada skupini inhibitora sukcinat-dehidrogenaze (eng. *succinate dehydrogenase inhibitors* – SDHI), kemijskoj skupini piridin karboksamida. Inhibitor je respiracije (skupina C), odnosno inhibitor kompleksa II sukcinat-dehidrogenaze (skupina C2) (FRAC, 2020). Boskalid je ponajprije botriticid, no pokazuje širi spektar djelovanja. Inhibira različite razvojne stadije gljiva, kao što su klijanje spora i rast micelija (Bartlett i sur., 2002; Stammler i sur., 2007; Myresiotis i sur., 2008). Chen i sur. (2013b) utvrđuju rezistentnost vrste *M. fructicola* s breskve na boskalid, što je u skladu s navodima FRAC-a (2020) koji ga svrstava u srednje do visoko rizičnu skupinu od pojave rezistentnosti. Osjetljivost *Monilinia* vrsta na boskalid istražuje se u sklopu mnogih istraživanja (Spiegel i Stammler, 2006; Amiri i sur., 2010; Hrustić i sur., 2018). Rezistentnost srodne vrste *B. cinerea* na boskalid zabilježena je na brojnim domaćinima, pa tako i na jabuci (Kim i Xiao, 2010), vinovoj lozi (*Vitis vinifera* L.) (Leroch i sur., 2011) te jagodi (*Fragaria x ananassa* Duch.) (Weber i Hahn, 2011; Fernández-Ortuño i sur., 2016a), dok neka istraživanja pokazuju zadovoljavajuću razinu osjetljivosti izolata *B. cinerea* na boskalid (Myresiotis i sur., 2008).

Fluopiram, kao i boskalid, pripada skupini SDHI fungicida, ali je svrstan u kemijsku skupinu piridin-etil-benzamida. Kao i boskalid, inhibitor je respiracije (skupina C), odnosno inhibitor kompleksa II sukcinat-dehidrogenaze (skupina C2) (FRAC, 2020). FRAC (2020) također navodi kako je rizik od pojave rezistentnosti patogena na fluopiram srednji do visok. U Srbiji, Hrustić i sur. (2018) nalaze izolate *M. fructicola* smanjene osjetljivosti na fluopiram, dok Abate i sur. (2018) u Italiji utvrđuju manju osjetljivost vrste *M. fructigena* na fluopiram, u odnosu na vrste *M. laxa* i *M. fructicola*. U svijetu se provode i istraživanja osjetljivosti drugih gljiva iz porodice Sclerotiniaceae na fluopiram (Amiri i sur., 2017; Fernández-Ortuño i sur., 2017).

Aktivne tvari piraklostrobin i trifloksistrobin ubrajaju se u skupinu vanjskih inhibitora kvinona (eng. *quinone outside inhibitors* – QoI). Piraklostrobin pripada kemijskoj skupini metoksi-karbamata, a trifloksistrobin skupini oksimino-acetata. Inhibitori su respiracije (skupina C), pri čemu inhibiraju kompleks III citokroma *bc1* (ubikvinol oksidaza) (skupina C3) (FRAC, 2020). Razvijeni su iz prirodnih fungicidnih spojeva, a vežu se na specifično mjesto ubihidrokinon te inhibiraju prijenos elektrona u mitohondrijskom respiratornom lancu kompleksa *bc1* (Amiri i sur., 2010). FRAC (2020) navodi kako je rizik od pojave rezistentnosti za ovu skupinu fungicida visok te kako je između aktivnih tvari iz ove skupine moguća pojava unakrsne rezistentnosti. Iako inhibitori respiracije mogu snažno djelovati na različite razvojne stadije gljiva (Bartlett i sur., 2002; Stammler i sur., 2007; Myresiotis i sur., 2008), dominira njihov inhibitorni učinak na klijanje spora (Bartlett i sur., 2002; Mondal i sur., 2005; Pasche i sur., 2005). Rezistentnost na vanjske inhibitore kvinona zabilježena je kod brojnih patogena kao što su *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter (Steinfeld i sur., 2002) i *B. cinerea* (Jiang i sur., 2009; Weber i Hahn, 2011). Brojna istraživanja u svijetu pokazuju različitu razinu osjetljivosti *Monilinia* vrsta na QoI fungicide. Neki autori bilježe pojavu smanjene osjetljivosti (Amiri i sur., 2010; Chen i sur., 2014; Pereira i sur., 2017; Hrustić i sur., 2018), dok neki nalaze samo osjetljive populacije (Spiegel i Stammler, 2006; Luo i Schnabel, 2008; May-De Mio i sur., 2011; Chen i sur., 2013a). Prilikom izloženosti QoI fungicidima kod gljiva može doći do pojave alternativne respiracije, metaboličkog puta kojim se izbjegava prijenos elektrona preko ciljanog mjesta, citokroma *b* (Mondal i sur., 2005), pri čemu je aktivnost fungicida smanjena. U laboratorijskim istraživanjima osjetljivosti na QoI fungicide, u svrhu sprječavanja pojave alternativne respiracije (Weber i Hahn, 2011), često se u medije na kojima se istražuje reakcija gljive dodaje salicil hidroksamska kiselina (eng. *salicylhydroxamic acid* – SHAM), a njegovi učinci na gljive iz porodice Sclerotiniaceae predmet su mnogih istraživanja u svijetu (Schnabel i sur., 2003; Amiri i sur., 2008; Luo i Schnabel, 2008; Myresiotis i sur., 2008; Amiri i sur., 2010; May-De Mio i sur., 2011; Weber i Hahn, 2011; Chen i sur., 2014; Pereira i sur., 2017; Abate i sur., 2018; Hrustić i sur., 2018).

Fludioksonil pripada skupini i kemijskoj skupini fenilpirola (eng. *phenylpyrroles* – PP) koji inhibiraju prijenos signala (skupina E2) u kompleksu mitogen-aktivacijskih proteinskih kinaza (MAP) (FRAC, 2020). FRAC (2020) navodi kako je rizik od pojave rezistentnosti patogena na ovu skupinu fungicida nizak do srednji. Fludioksonil inhibira rast micelija i klijanje spora, a može utjecati i na morfologiju kličnih cijevi (Hilber, 1992; Leroux i Descotes, 1996; Zhao i sur., 2010; Ren i sur., 2016), iako neki autori navode kako učinkovitije djeluje na rast micelija (Förster i sur., 2004; Förster i sur., 2007). U *in vitro* testu rasta micelija, Förster i sur. (2007) te Abate i sur. (2018) istražuju osjetljivost *Monilinia* vrsta na fludioksonil, a u svijetu se provode i istraživanja osjetljivosti drugih vrsta gljiva iz porodice Sclerotiniaceae (Leroux i Descotes, 1996; Matheron i Porchas, 2004; Förster i sur., 2007; Myresiotis i sur., 2007; Leroch i sur., 2011; Weber i Hahn, 2011; Fernández-Ortuño i sur., 2016b; Ren i sur., 2016).

Difenkonazol, fenbukonazol i tebukonazol fungicidi su iz skupine inhibitora demetilacije (eng. *demethylation inhibitors* – DMI), kemijske skupine triazola. Inhibitorno djeluju na biosintezu sterola u staničnoj membrani (skupina G), odnosno na C-14 demetilazu tijekom biosinteze sterola (skupina G1). Triazoli su svrstani u srednje rizičnu skupinu od pojave rezistentnosti (FRAC, 2020) te se diljem svijeta smatraju vrlo učinkovitim u suzbijanju paleži cvjetova i smeđe truleži plodova (Schnabel i sur., 2004; Holb i Schnabel, 2007). Ipak, Zehr i sur. (1999) navode kako se smanjena osjetljivost vrste *M. fructicola* na triazole može javiti već nakon 12 tretiranja u samo tri godine. U nasadima koštičavog voća u SAD-u (Schnabel i sur., 2004; Parker i sur., 2006; Luo i sur., 2008; Villani i Cox, 2011; Chen i sur., 2013a; Janisiewicz i sur., 2013) i Brazilu (May-De Mio i sur., 2011) utvrđena je smanjena osjetljivost i rezistentnost vrste *M. fructicola* na triazole. Osjetljivost *Monilinia* vrsta na triazole istražuje se i u Europi (Abate i sur., 2018; Hrustić i sur., 2018). Rezistentnost vrste *M. fructicola* na triazole često se povezuje s insercijom sekvence „Mona“, veličine 65 baznih parova (eng. *base pair* – bp), smještene uzvodno od gena 14 $\alpha$ -demetilaza (MfCYP51) (Chen i sur., 2013b).

Aktivna tvar fenheksamid pripada skupini inhibitora keto reduktaze (eng. *keto reductase inhibitors* – KRI), kemijskoj skupini hidroksianilida, kod koje je rizik od pojave rezistentnosti nizak do srednji (FRAC, 2020). Hidroksianilidi inhibiraju sintezu sterola u staničnoj membrani (skupina G), odnosno inhibiraju enzim 3-ketoreduktazu koji katalizira demetilaciju C-4 tijekom biosinteze ergosterola (skupina G3) (Malandrakis i sur., 2013; FRAC, 2020). U nižim koncentracijama, fenheksamid inhibira izduživanje kličnih cijevi i rast micelija, a u višim klijanje spora (Baroffio i sur., 2003; Schnabel i sur., 2004). Iako neki autori istražuju osjetljivost *Monilinia* vrsta na fenheksamid (Förster i sur., 2007; Malandrakis i sur., 2013;

Abate i sur., 2018), veći se broj istraživanja temelji na ispitivanju osjetljivosti vrste *B. cinerea*, koja također pripada porodici Sclerotiniaceae. O smanjenoj osjetljivosti vrste *B. cinerea* na fenheksamid govore brojni autori (Myresiotis i sur., 2007; Fillinger i sur., 2008; Weber, 2010; Esterio i sur., 2011; Moorman i sur., 2012).

Dok primjena fungicida predstavlja izravnu kemijsku mjeru suzbijanja, primjena insekticida na neizravan način pridonosi zaštiti koštičavog voća od smeđe truleži. Naime, suzbijanjem štetnika smanjuje se mogućnost oštećenja ploda, a Cvjetković (2010) naglašava kako je suzbijanje štetnika obavezna mjera zaštite. Tako se u praksi gotovo uvijek suzbijaju trešnjina muha (*Ragoletis cerasi* Linnaeus, 1758), šljivin savijač (*Grapholita (Aspila) funebrana* Treitschke, 1835), breskvin moljac (*Anarsia lineatella* Zeller, 1839) i breskvin savijač (*Grapholita (Aspila) molesta* (Busck, 1916)) (Holb, 2006).

Osim fungicida u užem smislu, u svijetu se istražuje i potencijal korištenja nekih drugih kemijskih spojeva u suzbijanju smeđe truleži. Metoda umakanja zaraženih plodova breskve u različite otopine kalcijevih soli pokazala se kao potencijalno učinkovita u smanjenju zaraze s *M. fructicola*, pri čemu su se kao najbolje pokazale otopine kalcijevog propanoata, kalcijevog silikata, kalcijevog oksida i kalcijevog hidroksida (Biggs i sur., 1997). El Ghaouth i sur. (1995) istražuju djelovanje šećernih spojeva na smanjenje zaraze s *M. fructicola* na plodovima breskve i zaključuju kako 2-deoksi-D-glukoza ima najveći potencijal u kontroli smeđe truleži nakon berbe.

#### 2.4.3. Biološke mjere suzbijanja *Monilinia* vrsta

U svrhu suzbijanja *Monilinia* vrsta prije i nakon berbe, provode se brojna istraživanja učinkovitosti bioloških fungicida na osnovi mikroorganizama. Prvi antagonistički mikroorganizmi izolirani su iz tla, a korišteni su u biološkoj zaštiti voćnih vrsta od skladišnih bolesti (Tronsmo i Raa, 1977; Pusey i Wilson, 1984). U kasnijim su istraživanjima epifitski mikroorganizmi s antagonističkim djelovanjem nađeni i na jabuci (Janisiewicz, 1987). Sharma i sur. (2009) navode kako se najveća djelotvornost pripravaka na osnovi antagonističkih mikroorganizama postiže primjenom nakon berbe, a učinkovitijom se pokazala i primjena miješanih populacija mikroorganizama u odnosu na one pojedinačne. Najčešći mehanizmi djelovanja antagonističkih mikroorganizama su kompeticija za hranjiva i prostorna kompeticija, a mikroorganizmi mogu djelovati i putem izravnog parazitizma, imati antibiotsko djelovanje, ali i pridonositi otpornosti domaćina (Sharma i sur., 2009). Primjena bioloških pripravaka na bazi antagonističke gljive *Epicoccum nigrum* Link pokazala se vrlo uspješnom u smanjenju broja konidija *Monilinia* vrsta na površini plodova breskve i nektarine te općenito u smanjenju pojave smeđe truleži na plodovima (Madrigal i sur., 1994;



Larena i sur., 2005; De Cal i sur., 2009b). Gljiva *Penicillium frequentans* Westling svojim antibiotskim i antagonističkim djelovanjem može znatno inhibirati vrstu *M. laxa* na grančicama breskve (Melgarejo i sur., 1986; De Cal i sur., 1988; De Cal i sur., 1990), kao i vrsta *Penicillium purpureogenum* Stoll (Melgarejo i sur., 1986; Larena i Melgarejo, 1993). Hong i sur. (1998) navode kako gljive *Trichoderma atroviride* P. Karst. i *Trichoderma viride* Pers. imaju veliki potencijal za kontrolu smeđe truleži u skladištu. U istraživanju provedenom na vrstama *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* (Mari i sur., 2012), sojevi kvasca vrste *Aureobasidium pullulans* (de Bary) G. Arnaud uspješno su smanjili pojavu smeđe truleži na breskvi i nektarini, dok je primjena bakterije *Pantoea agglomerans* (Ewing & Fife) Gavini i sur. soja EPS125 smanjila promjer lezije smeđe truleži uzrokovane vrstom *M. laxa* na plodovima breskve, nektarine i marelice (Bonaterra i sur., 2003). Primjena soja B-3 bakterije *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn može smanjiti pojavu smeđe truleži nakon berbe (McKeen i sur., 1986; Hong i sur., 1998), a vrsta *Pseudomonas corrugata* Roberts & Scarlett i *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* (Palleroni & Holmes) Yabuuchi i sur. smanjiti propadanje umjetno zaraženih plodova breskve i nektarine (Smilanick i sur., 1993; Hong i sur., 1998).

Antimikrobna svojstva eteričnih ulja poznata su još od 19. stoljeća (Chamberlain, 1887). U suvremenim se istraživanjima primjena eteričnih ulja pokazala kao vrlo uspješna metoda kontrole biljnih patogena. Veliki potencijal za suzbijanje vrsta roda *Monilinia* pokazala su eterična ulja timijana (*Thymus vulgaris* L.) (Tanović i sur., 2013; Elshafie i sur., 2015), bosiljka (*Ocimum* spp.) (Carović-Stanko i sur., 2013), limunske mirte (*Backhousia citriodora* F.Muell.) (Lazar-Baker i sur., 2011) te verbene (*Verbena officinalis* L.) (Elshafie i sur., 2015). Eterična se ulja u biljkama mogu stvarati uslijed djelovanja različitih patogena u sklopu obrambene reakcije te zapravo predstavljaju njihov „imuni“ odgovor (Oxenham, 2003).

Osim što primjena bioloških sredstava u suvremenoj zaštiti bilja ima veliki komercijalni potencijal, ona potencijalno omogućava i smanjenje broja primjena kemijskih sredstava, što je u skladu s odrednicama Zakona o održivoj uporabi pesticida (Narodne novine, 2014).

#### 2.4.4. Fizikalne mjere suzbijanja *Monilinia* vrsta nakon berbe

Kao alternativa kemijskim mjerama zaštite koštičavog voća od smeđe truleži, istražuju se i one fizikalne. Jemrić i sur. (2011) navode kako tretmani vrućom vodom značajno smanjuju klijavost konidija vrste *M. laxa* na plodovima breskve i nektarine, zaraza na plodovima je manja, pri čemu ne dolazi do oštećenja plodova uslijed izloženosti visokim temperaturama. S druge strane, Karabulut i sur. (2010) navode kako tretmani plodova breskve, nektarine i šljive vodom temperature iznad 65 °C mogu dovesti do pojave simptoma fitotoksičnosti i

uzrokovati umjerena do jaka oštećenja. Ipak, mnogi autori navode kako tretmani plodova vrućom vodom imaju veliki potencijal, posebice u ekološkoj proizvodnji u kojoj izostaju kemijske mjere zaštite, a gubici nakon berbe mogu biti vrlo visoki (Mari i sur., 2007; Karabulut i sur., 2010; Jemrić i sur., 2011). Tretmani plodova vrućom vodom u kombinaciji s nekim drugim metodama također su pokazali vrlo dobre rezultate u suzbijanju patogena nakon berbe (Jemrić i sur., 2011). To mogu biti kombinacije s dodatkom etilnog alkohola (Margosan i sur., 1997), natrijevih soli (Palou i sur., 2002) ili antagonista (Mari i sur., 2007). De Vries-Paterson i sur. (1991) nalaze kako fumigacija plodova trešnje ugljičnim dioksidom može usporiti i smanjiti pojavu lezija uslijed zaraze s *M. fructicola* za jedan do sedam dana. Ipak, kako se propadanje plodova ne može izbjeći nakon vraćanja u normalne uvjete, autori zaključuju kako tretmani ugljičnim dioksidom imaju fungistatični, ali ne i fungicidni učinak.

Sholberg i Gaunce (1996) navode kako kod fumigacije zaraženih plodova breskve, nektarine, marelice i breskve octenom kiselinom postoji velika mogućnost pojave oštećenja. Ipak, takvi tretmani imaju veliki potencijal kod plodova namijenjenim industrijskoj preradi, kod kojih sam izgled ploda nije presudan. Stevens i sur. (1996) nalaze kako niske doze ultraljubičastog svjetla imaju pozitivan učinak, uslijed kojeg dolazi do značajno manjeg propadanja plodova breskve nakon berbe. Desetak godina kasnije, Stevens i sur. (2005) utvrđuju kako se izlaganje peteljke plodova ultraljubičastom svjetlu, u usporedbi s konvencionalnim načinom okretanja plodova prilikom izlaganja, pokazalo uspješnijim načinom poticanja razvoja otpornosti domaćina na zarazu s *M. fructicola*.

### 3. MATERIJAL I METODE RADA

#### 3.1. Uzorkovanje plodova breskve, nektarine i šljive

U svrhu prikupljanja izolata *Monilinia* vrsta, 2012. i 2013. godine provedeno je uzorkovanje plodova breskve, nektarine i šljive na kojima su zapaženi simptomi smeđe truleži. Uzorkovanje je provedeno u sklopu službenog nadzora kojim je istraživana prisutnost vrste *M. fructicola* u Hrvatskoj, ali i raširenost ostalih prisutnih *Monilinia* vrsta u nasadima breskve, nektarine i šljive. Nadzor je proveden sukladno Međunarodnom fitosanitarnom standardu za praćenje organizama štetnih za bilje br. 6 (FAO, 2006). U 2016. godini dodatno su uzorkovana dva ploda šljive sa simptomima smeđe truleži. Uzimani su plodovi sa stabla, a na lokacijama na kojima nisu nađeni simptomatični plodovi, sakupljeni su otpali truli plodovi s tla u voćnjaku (Slika 6).



**Slika 6.** Tipični simptomi smeđe truleži koštičavog voća prilikom uzorkovanja plodova: a) smežurani plodovi šljive sa sponoznim nakupinama *Monilinia* spp.; b) otpali plodovi breskve zahvaćeni smeđom truležom na tlu u voćnjaku; c) zaraženi plod breskve; d)-f) zaraženi plodovi nektarine prorasli micelijem *Monilinia* spp.

Tijekom srpnja 2012. godine, uzorkovanje je provedeno u 24 mješovita nasada breskve i nektarine u 13 županija (Dubrovačko-neretvanska, Splitsko-dalmatinska, Zadarska, Istarska, Zagrebačka, Varaždinska, Međimurska, Sisačko-moslavačka, Bjelovarsko-bilogorska, Virovitičko-podravska, Koprivničko-križevačka, Brodsko-posavska i Osječko-baranjska). Ukupno su sakupljena 172 ploda na kojima su zapaženi simptomi smeđe truleži, od čega 114 plodova breskve i 58 plodova nektarine.

Tijekom lipnja, srpnja i kolovoza 2013. godine, sakupljeno je 190 plodova sa simptomima smeđe truleži, od čega 95 plodova breskve, 50 plodova nektarine i 45 plodova šljive. Simptomatični plodovi sakupljeni su u 17 mješovitih nasada breskve i nektarine te u dva nasada šljive u 12 županija (Dubrovačko-neretvanska, Splitsko-dalmatinska, Zadarska, Istarska, Zagrebačka, Varaždinska, Međimurska, Virovitičko-podravska, Koprivničko-križevačka, Brodsko-posavska, Osječko-baranjska i Vukovarsko-srijemska).

U kolovozu 2016. godine sakupljena su dva ploda šljive sa simptomima smeđe truleži u Splitsko-dalmatinskoj županiji.

Ukupno su tijekom 2012., 2013. i 2016. godine uzorkovana 364 ploda sa simptomima smeđe truleži, od čega 209 plodova breskve, 108 plodova nektarine i 47 plodova šljive.

Sakupljeni plodovi stavljani su u vrećice i označeni, zabilježeni su datum i lokacija njihovog uzorkovanja te biljka domaćin s kojeg potječe simptomatični plod. Svi uzorkovani plodovi sa simptomima smeđe truleži prikazani su zbirno u Tablici 1 prema županiji, godini i domaćinu, dok je cjelovit popis svih uzetih uzoraka naveden u Prilogu 1. Uzorci su preneseni u Laboratorij za mikologiju Centra za zaštitu bilja (CZB) pri Hrvatskoj agenciji za poljoprivredu i hranu (HAPIH).

**Tablica 1.** Zbirni prikaz ukupnog broja uzorkovanih plodova prema županiji, godini i domaćinu

<b>Županija</b>	<b>Domaćin</b>	<b>Broj uzorkovanih plodova</b>
<b>2012.</b>		
Bjelovarsko-bilogorska	Breskva	3
	Nektarina	2
Brodsko-posavska	Breskva	7
Dubrovačko-neretvanska	Breskva	5
Istarska	Breskva	20
	Nektarina	11
Koprivničko-križevačka	Breskva	5
Međimurska	Breskva	2
	Nektarina	4
Osječko-baranjska	Breskva	6
	Nektarina	4
Sisačko-moslavačka	Breskva	4
	Nektarina	6
Splitsko-dalmatinska	Breskva	9
	Nektarina	11
Varaždinska	Breskva	6
Virovitičko-podravska	Breskva	7
Zadarska	Breskva	27
	Nektarina	18
Zagrebačka	Breskva	13
	Nektarina	2
<b>2013.</b>		
Brodsko-posavska	Breskva	5
Dubrovačko-neretvanska	Breskva	17
Istarska	Šljiva	15
Koprivničko-križevačka	Breskva	10
Međimurska	Nektarina	5
Osječko-baranjska	Nektarina	5
Splitsko-dalmatinska	Breskva	28
	Šljiva	30
Varaždinska	Nektarina	5
Virovitičko-podravska	Nektarina	5
Vukovarsko-srijemska	Breskva	20
Zadarska	Nektarina	30
Zagrebačka	Breskva	15
<b>2016.</b>		
Splitsko-dalmatinska	Šljiva	2

### 3.2. Izolacija i uzgoj izolata *Monilinia* vrsta

Kao hranjiva podloga za izolaciju i uzgoj gljiva roda *Monilinia* u čistoj kulturi korišten je krumpir dekstrozni agar – KDA (Biolife, Italija). U laboratorijsku bocu volumena 1000 ml uliveno je 750 ml destilirane vode te je dodan 31,5 g KDA. Nakon miješanja, pripravljena hranjiva podloga autoklavirana je 15 minuta na 121 °C. Hranjiva podloga ohlađena je na 50-60 °C i izlivena u sterilne Petrijeve zdjelice promjera 90 mm. Malen dio površine ploda zahvaćenog smeđom truleži uzet je laboratorijskom iglom te prenesen u tublicu (Eppendorf, Njemačka) napunjenu s 2 ml sterilne vode. Suspenzija je promiješana pomoću vorteks miješalice (Combi-spin PCV-2400, Grant Instruments, UK) te izlivena u prethodno pripravljene Petrijeve zdjelice na KDA. Višak suspenzije je izliven, a Petrijeve su zdjelice postavljene okomito i inkubirane na sobnoj temperaturi. Nakon četiri do pet sati inkubacije, prokljale konidije pregledane su stereomikroskopom (Carl Zeiss 200S, Njemačka), nakon čega su izrezane i prebačene u nove Petrijeve zdjelice na KDA. Kolonija razvijena iz jedne konidije opisanom metodom monosporne izolacije smatrana je izolatom. Izolati su inkubirani u 'walk-in' klima komori (Kambič RK-3, Kambič, Slovenija) na 22 °C, režimu 12 sati tame/12 sati svjetlosti (Lane, 2002).

### 3.3. Analiza morfoloških obilježja izolata *Monilinia* vrsta

Ukupno sakupljena 364 *Monilinia* spp. izolata inkubirana su na 22 °C i režimu 12 sati tame/12 sati svjetlosti. Nakon 10 dana zabilježena su njihova morfološka obilježja prema identifikacijskom ključu (Lane, 2002):

1. Boja kolonije vidljiva na licu Petrijeve zdjelice:

- a) sive boje (A),
- b) žute boje (B) ili
- c) krem/bijele boje (C).

2. Brzina rasta:

- a) prosječan promjer kolonije > 80 mm – raste brzo (D),
- b) prosječan promjer kolonije 70–80 mm – raste umjereno (E) ili
- c) prosječan promjer kolonije < 70 mm – raste sporo (F).

3. Sporulacija:

a) obilna (G) ili

b) oskudna (H).

4. Sporulacija u koncentričnim krugovima:

a) prisutna (I) ili

b) nije prisutna (J).

5. Izgled ruba kolonije vidljivog na naličju Petrijeve zdjelice:

a) valovit (K) ili

b) ravan (L).

6. Rozete:

a) prisutne (M) ili

b) nisu prisutne (N).

7. Režnjevi:

a) crni režnjevi ili krugovi uz rozete (O),

b) crni točkasti dijelovi ili smeđi režnjevi ili krugovi (P) ili

c) režnjevi nisu prisutni (Q).

Prema identifikacijskom ključu (Lane, 2002), sinoptički ključ za identifikaciju određene *Monilinia* vrste je sljedeći:

***M. laxa*: A, (C), (E), F, H, J, K, M, (N), O.**

***M. fructigena*: B, (C), (D), E, (F), (G), H, (I), J, L, N, Q.**

***M. fructicola*: A, D, (E), G, I, (J), L, (M), N, (P), Q.**

Slova u zagradi označavaju obilježje koje nije često prisutno kod određene *Monilinia* vrste, ali se može pojaviti kod pojedinih izolata.

Zabilježena morfološka obilježja svakog *Monilinia* spp. izolata uspoređena su s rezultatima identifikacije PCR-om (loos i Frey, 2000; Côté i sur., 2004a) te je određena pripadnost izolata do razine vrste. Utvrđen je broj morfološki tipičnih i atipičnih izolata unutar vrsta *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola*, kao i broj morfološki tipičnih i atipičnih izolata u ukupnoj

populaciji *Monilinia* vrsta. Osim toga, utvrđen je broj izolata *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* koji pokazuje određeno morfološko obilježje te su uspoređeni s rezultatima identifikacije PCR-om (Ioos i Frey, 2000; Côté i sur., 2004a). Dobiveni podaci omogućili su izradu najčešćeg morfološkog profila *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* u Hrvatskoj te usporedbu s morfološkim profilom prema identifikacijskom ključu (Lane, 2002). Najčešći morfološki profili sve tri *Monilinia* vrste označeni su kao Laxa-HR (*M. laxa*), Gena-HR (*M. fructigena*) i Cola-HR (*M. fructicola*).

Morfologija izolata analizirana je i prema opisima koje navode Hu i sur. (2011), koji u svom istraživanju opisuju novu vrstu *M. yunnanensis* te detaljnije morfološki i genetski opisuju vrstu *M. mumeicola*. Iako Hu i sur. (2011) ne navode sinoptički ključ za razlikovanje vrsta *M. mumeicola* i *M. yunnanensis* od *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola*, navode kako je kod vrsta *M. mumeicola* i *M. laxa* zabilježen rast micelija u koncentričnim krugovima s valovitim rubom kolonije, dok glavnu razliku predstavlja boja kolonije. Navode kako je kod *M. laxa* boja kolonije na KDA najčešće siva, a kod *M. mumeicola* sivo-zelena. Boja kolonije kod *M. yunnanensis* također je često sivo-zelena, dok je kod *M. fructigena* siva. Osim toga, navode kako su kod vrste *M. fructigena* često zapažene fragmentirane kružne kolonije koje su rijetko bile prisutne kod *M. yunnanensis*. Za izolate koji su prema morfološkim obilježjima nalikovali opisanom, provedena je PCR metoda prema protokolu koji navode Hu i sur. (2011).

### 3.4. Identifikacija izolata *Monilinia* vrsta PCR metodom

Identifikacija PCR metodom s početnicama specifičnim za vrstu (Ioos i Frey, 2000; Côté i sur., 2004a; Hu i sur., 2011) provedena je za 361 izolat iz roda *Monilinia*.

#### 3.4.1. Priprema početnica i izolata za PCR

Prije upotrebe, sve su početnice korištene u ovom istraživanju razrijeđene sterilnom vodom do koncentracije od 10  $\mu$ M te su čuvane sukladno uputama proizvođača.

Dio micelija monospornih *Monilinia* spp. izolata prenesen je laboratorijskom iglom u sterilne Petrijeve zdjelice promjera 90 mm na KDA. Kako bi DNK *Monilinia* spp. izolata bila zadovoljavajuće kakvoće, na površinu KDA stavljen je celofanski pokrov. Nakon desetak dana je s celofanskog pokrova sterilnom čačalicom sastrugan dio micelija svakog izolata, stavljen u tubicu od 2 ml (Eppendorf, Njemačka) te homogeniziran pomoću tekućeg dušika.



### 3.4.2. Ekstrakcija i spektrofotometrijsko mjerenje DNK

Ekstrakcija DNK provedena je korištenjem kompleta DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Njemačka) prema uputama proizvođača. Čistoća i koncentracija DNK izmjerena je na spektrofotometru (Genova Nano, Jenway), uz omjer apsorbancija A260/A280. Kada je naknadno korištena, ekstrahirana DNK pohranjena je na -20 °C.

### 3.4.3. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

U sklopu ovog su istraživanja sve PCR reakcije provedene u PCR uređaju Thermal cycler 2720 ABI (Applied Biosystems, SAD), a korištene reakcijske smjese pripremljene su u laminarnom kabinetu. Sastojci reakcijskih smjesa po jednom izolatu prikazani su u Tablici 2.

**Tablica 2.** PCR reakcijske smjese po jednom izolatu

Sastojak	Volumen (µl)
Ekstrahirana DNK	5
GoTaq® G2 Colorless Master Mix, 2X (Promega, SAD)*	12,5
Uzvodna početnica, 10 µM	1
Nizvodna početnica, 10 µM	1
Sterilna voda	5,5
<b>Ukupno</b>	<b>25</b>

\* sadrži GoTaq® G2 DNK polimerazu, reakcijski pufer (pH 8,5), 400µM dATP, 400µM dGTP, 400µM dCTP, 400µM dTTP i 3 mM MgCl<sub>2</sub>

PCR metoda za identifikaciju *Monilinia* vrsta provedena je za sve izolate sakupljene 2012. i 2013. godine s početnicama specifičnim za vrstu u tri odvojene reakcije (Côté i sur., 2004a). Parovi početnica specifičnih za vrstu te očekivane veličine fragmenta u bp prikazani su u Tablici 3.

**Tablica 3.** Parovi početnica specifičnih za *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* (Côté i sur., 2004a)

Vrsta	Početnice	Sekvenca (5' – 3')	bp
<i>M. laxa</i>	Laxa-R2 (uzvodna)	TGC ACA TCA TAT CCC TCG AC	351
	MO368-5 (nizvodna)	GCA AGG TGT CAA AAC TTC CA	
<i>M. fructigena</i>	MO368-8R (uzvodna)	TGC ACA TCA TAT CCC TCG AC	402
	MO368-5 (nizvodna)	GCA AGG TGT CAA AAC TTC CA	
<i>M. fructicola</i>	MO368-10R (uzvodna)	AAG ATT GTC ACC ATG GTT GA	535
	MO368-5 (nizvodna)	GCA AGG TGT CAA AAC TTC CA	

Dodatno su provedene 'multiplex' ili 'duplex' PCR metode koje omogućavaju identifikaciju sve tri ili dvije vrste u jednoj reakciji (Côté i sur., 2004a) sa zajedničkom nizvodnom početnicom MO368-5 te uzvodnim početnicama specifičnim za vrste *M. laxa* (Laxa-R2), *M. fructigena* (MO368-8R) ili *M. fructicola* (MO368-10R). Volumen sterilne vode smanjen je sukladno povećanju volumena početnica do ukupnog volumena 25 µl. Temperaturne faze PCR reakcije (Côté i sur., 2004a) prikazane su u Tablici 4.

**Tablica 4.** Temperaturne faze PCR reakcije (Côté i sur., 2004a)

Faza	Broj ciklusa	Temperatura	Trajanje
Početno razdvajanje (eng. <i>initial denaturation</i> )	1	95 °C	2 minute
Razdvajanje (eng. <i>denaturation</i> )	35	95 °C	15 sekundi
Polijeganje (eng. <i>annealing</i> )	35	60 °C	15 sekundi
Produljenje (eng. <i>extension</i> )	35	72 °C	1 minuta
Završno produljenje (eng. <i>final extension</i> )	1	72 °C	3 minute

Za potvrdu identifikacije izolata vrste *M. fructicola* iz 2012., 2013. i 2016. godine, provedena je i PCR metoda koju opisuju loos i Frey (2000), koristeći par specifičnih početnica prikazanih u Tablici 5. U istoj je tablici prikazana i očekivana veličina fragmenta u bp, dok su temperaturne faze PCR reakcije prikazane u Tablici 6.

**Tablica 5.** Par početnica specifičnih za *M. fructicola* (loos i Frey, 2000)

Vrsta	Početnice	Sekvenca (5' – 3')	bp
<i>M. fructicola</i>	ITS1Mfc1 (uzvodna)	TAT GCT CGC CAG AGG ATA ATT	356
	ITS4Mfc1 (nizvodna)	TGG GTT TTG GCA GAA GCA CAC T	

**Tablica 6.** Temperaturne faze PCR reakcije (loos i Frey, 2000)

Faza	Broj ciklusa	Temperatura	Trajanje
Početno razdvajanje (eng. <i>initial denaturation</i> )	1	94 °C	3 minute
Razdvajanje (eng. <i>denaturation</i> )	35	94 °C	30 sekundi
Polijeganje (eng. <i>annealing</i> )	35	63 °C	30 sekundi
Produljenje (eng. <i>extension</i> )	35	72 °C	1 minuta
Završno produljenje (eng. <i>final extension</i> )	1	72 °C	10 minuta

Kako bi se utvrdila eventualna prisutnost vrsta *M. mumeicola* i *M. yunnanensis* u Hrvatskoj, za 10 je izolata provedena 'duplex' PCR metoda koja u jednoj reakciji omogućuje identifikaciju obje vrste, prema metodologiji koju opisuju Hu i sur. (2011). Volumen sterilne vode u PCR reakcijskoj smjesi smanjen je sukladno povećanju volumena početnica do

ukupnog volumena 25 µl. Parovi početnica specifičnih za vrstu i očekivane veličine fragmenata u bp prikazani su u Tablici 7, a u Tablici 8 temperaturne faze PCR reakcije.

**Tablica 7.** Parovi početnica specifičnih za *M. mumeicola* i *M. yunnanensis* (Hu i sur., 2011)

Vrsta	Počelnice	Sekvenca (5' – 3')	bp
<i>M. mumeicola</i>	Mume-F (uzvodna)	AAA GGT AGA AGA CAT CTT AAG G	712
	Mon-R (nizvodna)	ATC TCC AAG ATC CGT GAG GAG	
<i>M. yunnanensis</i>	Ensis-F (uzvodna)	GGA AAC CAA GTG GTT GAG AT	534
	Mon-R (nizvodna)	ATC TCC AAG ATC CGT GAG GAG	

**Tablica 8.** Temperaturne faze PCR reakcije s parovima početnica specifičnih za *M. mumeicola* i *M. yunnanensis* (Hu i sur., 2011)

Faza	Broj ciklusa	Temperatura	Trajanje
Početno razdvajanje (eng. <i>initial denaturation</i> )	1	94 °C	3 minute
Razdvajanje (eng. <i>denaturation</i> )	35	94 °C	30 sekundi
Polijeganje (eng. <i>annealing</i> )	35	58 °C	30 sekundi
Produljenje (eng. <i>extension</i> )	35	72 °C	40 sekundi
Završno produljenje (eng. <i>final extension</i> )	1	72 °C	5 minuta

#### 3.4.4. Elektroforeza u agaroznom gelu

Pufer za elektroforezu (1X TAE) pripremljen je razrjeđivanjem 10X TAE pufera (UltraPure™, Thermo Fisher Scientific, SAD; sastava 40 mM Tris-acetate i 1 mM EDTA) u redestiliranoj vodi. Agarozni gel pripremljen je otapanjem 1, 1,2 i 1,5 g agaroze u 100 ml 1X TAE pufera, a njegova koncentracija ovisila je o očekivanoj veličini PCR produkta: 1 % (loos i Frey, 2000), 1,2 % (Hu i sur., 2011) i 1,5 % (Côté i sur., 2004a). Ohlađeni agarozni gel obojan je s GelRed™ Dropper Bottle (Olerup SSP®, Švedska) te izliven u kalup. Nakon stavljanja u uređaj za elektroforezu (Mini-Sub Cell GT, Bio-Rad, SAD) s 1X TAE puferom, jažice su punjene s 3-5 µl PCR produkta pomiješana s 1 µl pufera za nanošenje uzoraka (BlueJuice™ 10X Gel Loading Buffer, Invitrogen, SAD). Kao standardi za određivanje molekularne mase DNK korištene su dvije DNK ljestvice (BioBasic, Kanada): DNK ljestvica od 100 do 1000 bp koja sadrži 13 fragmenata duljine 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 i 1031 bp (na slikama označena kao 1000 bp) i DNK ljestvica od 100 do 1500 bp koja sadrži 9 fragmenata duljine 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800, 1000 i 1500 bp (na slikama označena kao 1500 bp). Nakon elektroforeze pri stalnom naponu od 70 V i trajanju od 60 minuta, gel je pregledan i fotografiran preko sustava UVIdoc HD2 (UVItec, UK).

### 3.5. Sekvenciranje i analiza sekvenci

Kako bi se dodatno potvrdila identifikacija PCR metodom s početnicama specifičnim za vrste *M. laxa* i *M. fructigena* (Côté i sur., 2004a) te *M. fructicola* (loos i Frey, 2000), za 13 je izolata umnožen dio ITS regije za direktno sekvenciranje u jednom smjeru. PCR reakcija provedena je korištenjem univerzalnog para početnica ITS1 i ITS4 (White i sur., 1990). Korištene početnice te očekivane veličine fragmenta u bp prikazane su u Tablici 9, a u Tablici 10 prikazane su temperaturne faze PCR reakcije (loos i Frey, 2000).

**Tablica 9.** Parovi univerzalnih početnica ITS1 i ITS4 (White i sur., 1990)

Regija	Početnice	Sekvenca (5' – 3')	bp
ITS	ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	538
	ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	

**Tablica 10.** Temperaturne faze PCR reakcije s univerzalnim početnicama ITS1 i ITS4 (loos i Frey, 2000)

Faza	Broj ciklusa	Temperatura	Trajanje
Početno razdvajanje (eng. <i>initial denaturation</i> )	1	94 °C	3 minute
Razdvajanje (eng. <i>denaturation</i> )	30	94 °C	30 sekundi
Polijeganje (eng. <i>annealing</i> )	30	55 °C	30 sekundi
Produljenje (eng. <i>extension</i> )	30	72 °C	1,5 minuta
Završno produljenje (eng. <i>final extension</i> )	1	72 °C	10 minuta

Za sedam izolata koji su podvrgnuti PCR metodi s parovima početnica specifičnim za vrste *M. mumeicola* i *M. yunnanensis* (Hu i sur., 2011), provedene su zasebne PCR reakcije s parovima početnica za direktno sekvenciranje fragmenata gena gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (G3PDH) i beta-tubulin (TUB2) u dva smjera (Hu i sur., 2011). Parovi početnica za sekvenciranje fragmenata gena G3PDH i TUB2 te očekivane veličine fragmenta u bp prikazani su u Tablici 11, a u Tablici 12 temperaturne faze PCR reakcije.

**Tablica 11.** Parovi početnica za sekvenciranje fragmenata gena G3PDH i TUB2 (Hu i sur., 2011)

Gen	Početnice	Sekvenca (5' – 3')	bp
G3PDH	Mon-G3pdhF (uzvodna)	ACG GTC AAT TCA AGG GTG AT	786
	Mon-G3pdhR (nizvodna)	ATC GAA GAT GGA GGA GTG GT	
TUB2	Mon-TubF1 (uzvodna)	ATG CGT GAG ATT GTA CGT AT	1630
	Mon-TubR1 (nizvodna)	GTA CCA ATG CAA GAA AGC CT	

**Tablica 12.** Temperaturne faze PCR reakcije s početnicama za sekvenciranje fragmenata gena G3PDH i TUB2 (Hu i sur., 2011)

Faza	Broj ciklusa	Temperatura	Trajanje
Početno razdvajanje (eng. <i>initial denaturation</i> )	1	94 °C	3 minute
Razdvajanje (eng. <i>denaturation</i> )	30	94 °C	1 minuta
Polijeganje (eng. <i>annealing</i> )	30	50 °C	1 minuta
Produljenje (eng. <i>extension</i> )	30	72 °C	2 minute
Završno produljenje (eng. <i>final extension</i> )	1	72 °C	5 minuta

Umnoženi dijelovi ITS regije te fragmenti gena za G3PDH i TUB2 poslani su na sekvenciranje u MacroGen Inc. (Amsterdam, Nizozemska) (dostupno na: <https://dna.macrogen.com>). Nakon što je određena primarna struktura molekule DNK, dobivene sekvence uspoređene su sa sekvencama iz baze podataka GenBank (dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) korištenjem mrežnog programa BLAST (Zhang i sur., 2000; Morgulis i sur., 2008). Pomoću računalnog programa Sequencher™ 4.10. Demo (dostupno na: <http://www.genecodes.com>), sekvence su uspoređene s odabranim reprezentativnim sekvencama te je provjerena njihova kvaliteta. Osim reprezentativnih sekvenci vrsta *M. laxa*, *M. fructigena*, *M. fructicola*, *M. polystroma*, *M. mumeicola*, *M. yunnanensis*, *M. linhartiana* i *B. cinerea*, za usporedbu su korištene i reprezentativne sekvence vrsta *Monilinia cassiopes* (Rostr.) L. Holm, *Botryosphaeria dothidea* (Moug. ex Fr.) Ces. & De Not. i *Taphrina deformans* (Berk.) Tul. Svi pristupni brojevi te opisi reprezentativnih sekvenci prikazani su u Tablici 13.

Sekvence izolata višestruko su poravnate s reprezentativnim sekvencama pomoću računalnog programa ClustalX 2.0, čime je omogućeno pronalaženje promjena među sekvencama (Thompson i sur., 1997; Larkin i sur., 2007) (dostupno na: <http://www.clustal.org>). Filogenetske analize provedene su korištenjem programa MEGA 7.0 (Kumar i sur., 2016) (dostupno na: <http://www.megasoftware.net>), UPGMA metodom (eng. *unweighted pair group method with arithmetic mean* – UPGMA) (Sneath i Sokal, 1973). Za računanje udaljenosti nukleotidnih sljedova korišten je model '*number of differences*' (Nei i Kumar, 2000), a za procjenu pogreške modela iterativna statistička metoda '*bootstrap*' (Felsenstein, 1985) uz 1000 ponavljanja.

**Tablica 13.** Pristupni brojevi i opisi reprezentativnih sekvenci iz baze podataka GenBank, korišteni za usporedbu i filogenetske analize

Regija / gen	Pristupni broj	Vrsta	Domaćin	Porijeklo
ITS	HQ166417	<i>M. fructigena</i>	<i>M. domestica</i>	Švicarska
	KC515383	<i>M. laxa</i>	<i>P. persica</i>	Srbija
	FJ411110	<i>M. fructicola</i>	<i>P. persica</i> var. <i>nucipersica</i>	Italija
	MH863200	<i>M. polystroma</i>	<i>Malus pumila</i>	Japan
	HQ908787	<i>M. mumeicola</i>	<i>P. persica</i> var. <i>nucipersica</i>	Kina
	HQ908788	<i>M. yunnanensis</i>	-	Kina
	LN908896	<i>M. linhartiana</i>	<i>C. oblonga</i>	Mađarska
	Z73776	<i>M. cassiopes</i>	<i>Cassiope tetragona</i>	Norveška
	JN607086	<i>B. dothidea</i>	-	Srbija
	AB505447	<i>T. deformans</i>	<i>P. persica</i>	Japan
TUB2	HQ908771	<i>M. fructigena</i>	<i>P. persica</i>	Kina
	LT615160	<i>M. laxa</i>	<i>Prunus triloba</i>	Mađarska
	HM051380	<i>M. fructicola</i>	<i>P. persica</i>	SAD
	LT615164	<i>M. polystroma</i>	<i>P. domestica</i>	Mađarska
	HQ908775	<i>M. mumeicola</i>	<i>P. persica</i>	Kina
	HQ908773	<i>M. yunnanensis</i>	<i>P. persica</i>	Kina
	LN908895	<i>M. linhartiana</i>	<i>C. oblonga</i>	Mađarska
	MH680908	<i>B. cinerea</i>	<i>V. corymbosum</i>	Argentina
G3PDH	JQ036027	<i>M. fructigena</i>	-	-

### 3.6. Određivanje raširenosti i bioraznolikosti populacija *Monilinia* vrsta na koštičavom voću u Hrvatskoj

Nakon provedene identifikacije svih *Monilinia* spp. izolata, utvrđen je broj identificiranih *Monilinia* vrsta te je određena njihova raširenost. Identifikacija je omogućila i određivanje bioraznolikosti populacija *Monilinia* vrsta na lokacijama na kojima je provedeno istraživanje. Bioraznolikost populacija *Monilinia* vrsta na koštičavom voću u Hrvatskoj određena je utvrđivanjem udjela (%) pojedinih *Monilinia* vrsta u: (1) ukupnoj populaciji *Monilinia* vrsta obuhvaćenoj ovim istraživanjem, (2) populaciji *Monilinia* vrsta u pojedinim županijama obuhvaćenim ovim istraživanjem, (3) populaciji *Monilinia* vrsta prema godini provođenja istraživanja te (4) populaciji *Monilinia* vrsta prema domaćinu.

Bioraznolikost populacija *Monilinia* vrsta određena je prema sljedećim formulama:

**(1) Uio (%) pojedine *Monilinia* vrste u ukupnoj populaciji (% ( $M_{sp.}$ ) UP)**

$$\% (M_{sp.}) UP = \frac{Br_{up} (M_{sp.})}{Br_{up} (M_{spp.})} \times 100$$

Pri čemu je:

$Br_{up} (M_{sp.})$  – broj izolata identificiranih kao pojedina *Monilinia* vrsta u ukupnoj populaciji

$Br_{up} (M_{spp.})$  – ukupna populacija *Monilinia* vrsta

**(2) Udio (%) pojedine *Monilinia* vrste u pojedinoj županiji (% ( $M_{sp.}$ ) ŽUP)**

$$\% (M_{sp.}) ŽUP = \frac{Br_{žup} (M_{sp.})}{Br_{žup} (M_{spp.})} \times 100$$

Pri čemu je:

$Br_{žup} (M_{sp.})$  – broj izolata identificiranih kao pojedina *Monilinia* vrsta u pojedinoj županiji

$Br_{žup} (M_{spp.})$  – ukupna populacija *Monilinia* vrsta u pojedinoj županiji

**(3) Udio (%) pojedine *Monilinia* vrste prema godini istraživanja (% ( $M_{sp.}$ ) GOD)**

$$\% (M_{sp.}) GOD = \frac{Br_{god} (M_{sp.})}{Br_{god} (M_{spp.})} \times 100$$

Pri čemu je:

$Br_{god} (M_{sp.})$  – broj izolata identificiranih kao pojedina *Monilinia* vrsta u pojedinoj godini

$Br_{god} (M_{spp.})$  – ukupna populacija *Monilinia* vrsta u pojedinoj godini

**(4) Udio (%) pojedine *Monilinia* vrste na pojedinom domaćinu (% ( $M_{sp.}$ ) DOM)**

$$\% (M_{sp.}) DOM = \frac{Br_{dom} (M_{sp.})}{Br_{dom} (M_{spp.})} \times 100$$

Pri čemu je:

$Br_{dom} (M_{sp.})$  – broj izolata identificiranih kao pojedina *Monilinia* vrsta na pojedinom domaćinu

$Br_{dom} (M_{spp.})$  – ukupna populacija *Monilinia* vrsta na pojedinom domaćinu

### 3.7. Odabir reprezentativnih izolata *Monilinia* vrsta

Za daljnja istraživanja fenotipske varijabilnosti odabrano je 10 reprezentativnih izolata vrste *M. laxa*, 10 izolata *M. fructigena* i 10 izolata *M. fructicola*. Kako bi izolati što reprezentativnije predstavljali ukupnu populaciju *Monilinia* vrsta, odabrani su izolati koji obuhvaćaju sve tri godine istraživanja, različite domaćine te dijelove Republike Hrvatske (Tablica 14).

**Tablica 14.** Reprezentativni izolati *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola*

Izolat	Županija	Lokacija (voćnjak)	Godina	Domaćin
<b><i>M. laxa</i></b>				
ZD 139/12	Zadarska	Kašić	2012.	Breskva
ZD 143/12	Zadarska	Kašić	2012.	Breskva
ZD 145/12	Zadarska	Kašić	2012.	Breskva
ZD 149/12	Zadarska	Kašić	2012.	Breskva
ZD 152/12	Zadarska	Kašić	2012.	Nektarina
ZD 153/12	Zadarska	Kašić	2012.	Nektarina
ZD 155/12	Zadarska	Kašić	2012.	Nektarina
ZG 29/13	Zagrebačka	Staro Čiče	2013.	Breskva
VŽ 20/13	Varaždinska	Biškupec	2013.	Nektarina
BA 27/13	Vukovarsko-srijemska	Borinci	2013.	Breskva
<b><i>M. fructigena</i></b>				
BR 71/12	Sisačko-moslavačka	Velika Ludina	2012.	Nektarina
VŽ 19/13	Varaždinska	Biškupec	2013.	Nektarina
VŽ 21/13	Varaždinska	Biškupec	2013.	Nektarina
VŽ 22/13	Varaždinska	Biškupec	2013.	Nektarina
VŽ 23/13	Međimurska	Vratišinec	2013.	Nektarina
VŽ 25/13	Međimurska	Vratišinec	2013.	Nektarina
VŽ 26/13	Međimurska	Vratišinec	2013.	Nektarina
VŽ 27/13	Međimurska	Vratišinec	2013.	Nektarina
BA 17/13	Vukovarsko-srijemska	Borinci	2013.	Breskva
BA 18/13	Vukovarsko-srijemska	Borinci	2013.	Breskva
<b><i>M. fructicola</i></b>				
PL 1/13	Dubrovačko-neretvanska	Vrbovci	2013.	Breskva
NS 30/13	Splitsko-dalmatinska	Umčani	2013.	Šljiva
VD 2/13	Splitsko-dalmatinska	Veliki Prolog	2013.	Breskva
VD 4/13	Splitsko-dalmatinska	Dusina	2013.	Breskva
ZG 26/13	Zagrebačka	Staro Čiče	2013.	Breskva
VŽ 24/13	Međimurska	Vratišinec	2013.	Nektarina
BA 28/13	Vukovarsko-srijemska	Borinci	2013.	Breskva
PO 129/13	Istarska	Kaldir	2013.	Šljiva
VRG 1/16	Splitsko-dalmatinska	Dusina	2016.	Šljiva
VRG 3/16	Splitsko-dalmatinska	Dusina	2016.	Šljiva



### 3.8. Određivanje fenotipske varijabilnosti *Monilinia* vrsta

Istraživanje fenotipske varijabilnosti reprezentativnih izolata *Monilinia* vrsta obuhvaćalo je određivanje razlika u brzini rasta micelija na različitim temperaturama, određivanje razlika u patogenosti na plodovima breskve, nektarine i šljive, određivanje razlika u sporulaciji na plodovima nektarine, određivanje razlika u vijabilnosti konidija na plodovima nektarine te određivanje razlika u osjetljivosti na fungicide, pri čemu su uspoređene razlike između izolata unutar vrste *M. laxa*, unutar vrste *M. fructigena* i unutar vrste *M. fructicola* te razlike između vrsta *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola*.

#### 3.8.1. Analiza brzine rasta micelija na različitim temperaturama

Istraživanje brzine rasta micelija na različitim temperaturama provedeno je za 30 odabranih *Monilinia* spp. izolata, prema metodologiji koju opisuju Papavasileiou i sur. (2015a) u dva ponavljanja. Rubni dio rastuće kolonije promjera 5 mm svakog izolata na KDA izrezan je laboratorijskom iglom te je dio micelija s KDA prenesen na svježi KDA u Petrijevu zdjelicu promjera 90 mm. Petrijeve zdjelice držane su u mraku na temperaturama od 15, 20, 25, 30 i 35 °C u inkubatoru (Binder KB 115, Binder GmbH, Austrija) te u laboratorijskom hladnjaku kod izloženosti temperaturi od 7,5 °C. Od drugog do 15. dana izloženosti, izmjeren je porast rastuće kolonije svakog izolata na različitim temperaturama. Prema dobivenim vrijednostima, određen je radijalni porast kolonije svakog izolata (mm/dan), a rast micelija svakog izolata na testiranim temperaturama prikazan je grafički u Prilogu 2.

#### 3.8.2. Analiza patogenosti na plodovima breskve, nektarine i šljive

Patogenost 30 odabranih *Monilinia* spp. izolata ispitana je na plodovima breskve, nektarine i šljive u dva ponavljanja za svaki izolat, prema metodologiji koju opisuju Hu i sur. (2011). Ukupno je 60 plodova breskve (sorta Redhaven), 60 plodova nektarine (sorta Caldesi 2020) i 60 plodova šljive (sorta Stanley) površinski sterilizirano 70 %-tnim etilnim alkoholom, isprano u sterilnoj vodi te osušeno na sobnoj temperaturi. Svaki plod zarezan je skalpelom i inokuliran rubnim fragmentom četiri dana stare kolonije na KDA, koji je izrezan kružnim rezačem promjera 5 mm. Zaraženo mjesto omotano je parafilmom te su plodovi odloženi u označene plastične podloške. Plodovi su stavljeni u 'walk-in' klima komoru (Kambič RK-3, Kambič, Slovenija) na 22 °C, režim 12 sati tame/12 sati svjetlosti i relativnu vlažnost zraka od 95 % (Slika 7). Kontrolni plodovi breskve, nektarine i šljive inokulirani su fragmentom čistog KDA te stavljeni u iste uvjete kao i plodovi inokulirani fragmentom micelija gljive. Nakon pojave prvih simptoma smeđe truleži, patogen je reizoliran na KDA, a morfološka su obilježja izolata s plodova uspoređena s onima iz čiste kulture. Parafilm je uklonjen od

drugog do 14. dana nakon inokulacije te je u dva navrata izmjeren radijalni promjer lezije na svakom zaraženom plodu breskve, nektarine i šljive (mm/danu). Određena je prosječna brzina rasta lezije svakog izolata. Kako bi se odredile razlike u patogenosti između izolata unutar vrsta *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* te između vrsta *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* na plodovima breskve, nektarine i šljive, dobiveni podaci transformirani su logaritamskom transformacijom ( $x_{trans} = \log_{10}(x)$ ) te statistički obrađeni analizom varijance (ANOVA) uz standardnu pogrešku od 5 % ( $P=0,05$ ). Prosječne vrijednosti porasta lezije uspoređene su Newman-Keulsovim (SNK) testom za višestruku usporedbu prosjeka korištenjem programske podrške XLSTAT 2014.5.03 (Addinsoft, 2014).



**Slika 7.** Ispitivanje patogenosti *Monilinia* spp. izolata na plodovima breskve i nektarine u klima komori.

### 3.8.3. Analiza sporulacije na plodovima nektarine

Nakon pojave sporulacije na plodovima nektarine (sorta Caldesi 2020), određivanje razlika u sporulaciji između izolata *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* provedeno je prema metodologiji koju opisuju Hu i sur. (2011). S inokuliranih su plodova nektarine kružnim rezačem promjera 5 mm ( $r = 2,5$  mm) izrezana četiri sporulirajuća isječka s površine ploda za svaki izolat, po dva s različitih plodova (ponavljanja). Svaki je isječak zasebno odložen u Falcon epruvetu od 50 ml te je dodano 8 ml sterilne vode. Epruvete su stavljene jednu minutu na vorteks miješalicu (Combi-spin PCV-2400, Grant Instruments, UK) te jedan sat na stolnu tresilicu (Orbital Shaker SO1, Stuart, UK). Suspenzije spora ostavljene su preko noći na sobnoj temperaturi te je sljedeći dan pomoću mikroskopa (Olympus BX51, Japan) s programskom podrškom analySIS docu© (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH,

Njemačka) očitani broj spora na četiri dijagonalna kvadrata hemocitometra, čineći ukupno 16 očitavanja po izolatu (4 isječka x 4 kvadrata). Za svaki je isječak određen broj spora po površini ploda (mm<sup>2</sup>) prema sljedećim formulama:

$$\text{Broj spora/površini ploda (mm}^2\text{)} = \frac{\text{Broj spora u 8 ml vode}}{\text{Površina isječka ploda}}$$

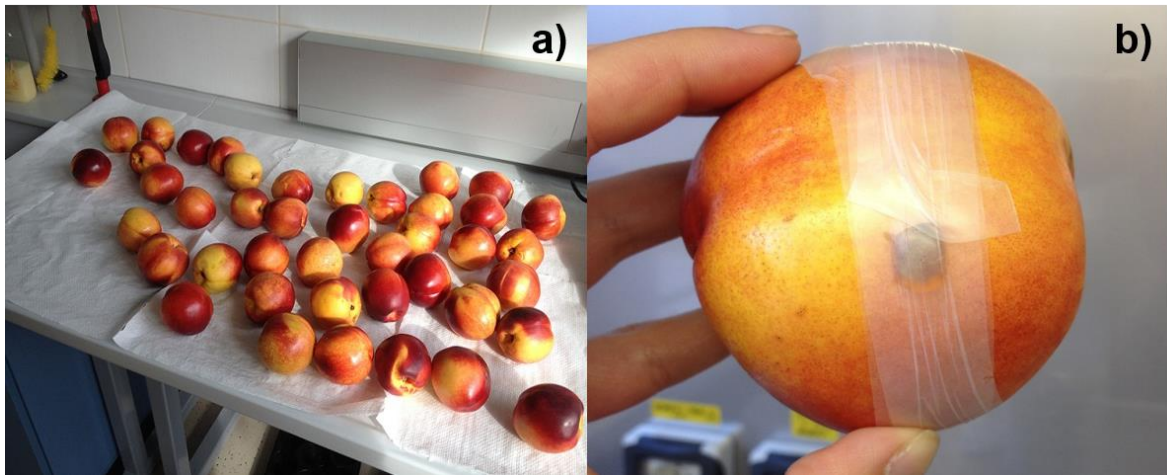
$$\text{Broj spora u 8 ml vode} = \text{Broj spora/isječku} \times 10^4 \times 8 \text{ ml}$$

$$\text{Površina isječka ploda (mm)} = r^2\pi$$

Kako bi se na plodovima nektarine utvrdile razlike u sporulaciji između izolata unutar vrsta *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* te između vrsta *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola*, dobivene vrijednosti broja spora po površini ploda logaritmirane su ( $\log_{10}x$ ) prije statističke obrade podataka te je provedena analiza varijance (ANOVA) uz standardnu pogrešku od 5 % ( $P=0,05$ ). Prosječne vrijednosti broja spora uspoređene su Newman-Keulsovim (SNK) testom za višestruku usporedbu prosjeka korištenjem programske podrške XLSTAT 2014.5.03 (Addinsoft, 2014).

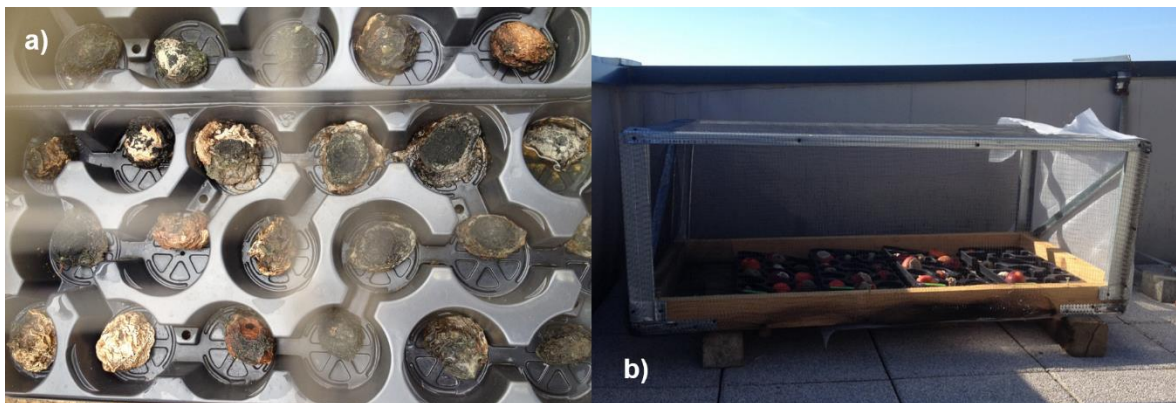
#### 3.8.4. Analiza vijabilnosti konidija na plodovima nektarine

Ukupno je 60 plodova nektarine (sorta Caldesi 2020) površinski sterilizirano 70 %-tnim etilnim alkoholom, isprano destiliranom vodom te osušeno na sobnoj temperaturi (Slika 8a). Plodovi su zarezani skalpelom te inokulirani fragmentom micelija u čistoj kulturi na KDA svakog od po 10 izolata vrsta *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* u dva ponavljanja. Mjesto inokulacije omotano je parafilmom (Slika 8b) te su plodovi odloženi u plastične podloške i označeni na način da je napravljena shema svakog izolata i svakog ponavljanja.



**Slika 8.** Priprema plodova nektarine za test vijabilnosti konidija: a) sušenje plodova nektarine u laboratoriju nakon sterilizacije; b) omatanje mjesta inokulacije s *Monilinia* spp. parafilmom.

Zaraženi plodovi držani su dva tjedna u 'walk-in' klima komori (Kambič RK-3, Kambič, Slovenija) na 22 °C i režimu 12 sati tame/12 sati svjetlosti do pojave sporulacije na plodovima, nakon čega je parafilm uklonjen. Početkom kolovoza, inokulirani plodovi premješteni su na otvoreno, u prirodne uvjete, gdje su bili zaštićeni od mogućeg napada puževa ili ptica, ali izloženi atmosferilijama (Slika 9).



**Slika 9.** Plodovi nektarine zaraženi s *Monilinia* spp. te izloženi vanjskim uvjetima u testu vijabilnosti konidija: a) mumificirani plodovi nektarine u zaštitnoj konstrukciji; b) zaštitna konstrukcija.

U travnju, nakon devet mjeseci izloženosti, mumificirani plodovi uklonjeni su s podložaka, stavljeni u vrećice, označeni te preneseni u 'walk-in' klima komoru (Kambič RK-3, Kambič, Slovenija) u mrak na 25 °C, gdje su rehidratizirani sterilnom vodom. Nakon nekoliko dana, dio stromatiziranog tkiva ili dio tkiva s vidljivom sporulacijom odrezan je skalpelom, stavljen

u Falcon epruvetu od 50 ml te je dodano 8 ml sterilne vode. Epruvete su jednu minutu držane na vorteks miješalici (Combi-spin PCV-2400, Grant Instruments, UK) nakon čega su jedan sat stavljene na stolnu tresilicu (Orbital Shaker SO1, Stuart, UK) te ostavljene preko noći. Pipetom je 1 ml suspenzije spora prenesen na gornju i donju stranu hemocitometra te je pomoću mikroskopa (Olympus BX51, Japan) s programskom podrškom analySIS docu© (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Njemačka) izbrojano 100 konidija svakog izolata i zabilježen broj vijabilnih i nevijabilnih. Vijabilnom konidijom smatrala se ona proklijala, a nevijabilnom ona neproklijala. Za svaki izolat izračunat je postotak vijabilnosti konidija. Razlike u vijabilnosti konidija između izolata unutar vrsta *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* te između vrsta *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* određene su analizom varijance (ANOVA) uz standardnu pogrešku od 5 % ( $P=0,05$ ). Prosječan postotak vijabilnosti konidija svakog izolata uspoređen je Bonferronijevim testom za višestruku usporedbu prosjeka korištenjem programske podrške XLSTAT 2014.5.03 (Addinsoft, 2014).

### 3.8.5. Analiza osjetljivosti na fungicide

#### 3.8.5.1. Priprema hranjivih podloga s dodatkom fungicida

Test osjetljivosti po 10 izolata *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* na fungicide proveden je prema metodologiji usporedbe rasta micelija na vodenom agaru (VA) s dodatkom fungicida u odnosu na kontrolu (May-De Mio i sur., 2011; Malandrakis i sur., 2013), odnosno prema metodologiji usporedbe rasta kličnih cijevi na KDA s dodatkom fungicida u odnosu na kontrolu (Amiri i sur., 2010; Weber i Hahn, 2011). Metodologija koju opisuju May-De Mio i sur. (2011) i Malandrakis i sur. (2013) izmijenjena je na način da je kao hranjiva podloga korišten VA, aktivne tvari otopljene su u metilnom alkoholu, a porast kolonije mjeren je u četiri smjera. Metodologija koju opisuju Amiri i sur. (2010) te Weber i Hahn (2011) izmijenjena je na način da je kao hranjiva podloga korišten KDA, a dužina kličnih cijevi mjerena je nakon četiri sata inkubacije.

Kod pripreme VA, 11,5 g bakteriološkog agara (Liofilchem, Italija) otopljeno je u 700 ml destilirane vode, dok je kod pripreme KDA u istom volumenu destilirane vode otopljeno 15,75 g KDA (Biolife, Italija). Nakon miješanja, pripremljene hranjive podloge autoklavirane su 15 minuta na 121 °C i ohlađene na 50-60 °C te je uslijedilo dodavanje fungicida. Korišteni fungicidi i metode pripreme otopine fungicida prije dodavanja u hranjivu podlogu navedeni su u Tablici 15.

**Tablica 15.** Aktivne tvari korištene u testu osjetljivosti na fungicide i metode pripreme

Aktivna tvar i proizvođač	Metoda pripreme (omjer)
Boskalid PESTANAL®, Sigma-Aldrich, SAD	Otapanje u metanolu (1:1)
Difenkonazol PESTANAL®, Sigma-Aldrich, SAD	Otapanje u metanolu (1:1)
Fenbukonazol PESTANAL®, Sigma-Aldrich, SAD	Otapanje u metanolu (1:1)
Fenheksamid, 500 g/l, TELDOR SC 500, Bayer AG, Njemačka	Otapanje u sterilnoj vodi (1:1)
Fludioksonil PESTANAL®, Sigma-Aldrich, SAD	Otapanje u metanolu (1:1)
Fluopiram, 500 g/l, LUNA PRIVILEGE, Bayer AG, Njemačka	Otapanje u sterilnoj vodi (1:1)
Piraklostrobin PESTANAL®, Sigma-Aldrich, SAD	Otapanje u metanolu (1:1)
Tebukonazol PESTANAL®, Sigma-Aldrich, SAD	Otapanje u metanolu (1:1)
Tiofanat-metil PESTANAL®, Sigma-Aldrich, SAD	Otapanje u metanolu (1:1)
Trifloksistrobin PESTANAL®, Sigma-Aldrich, SAD	Otapanje u metanolu (1:1)

Otopine fungicida pipetom su dodane u VA ili KDA u određenom volumenu kako bi se dobile određene koncentracije pojedinog fungicida. Sve koncentracije fungicida navedene su u Prilogu 3. Oba testa provedena su u dva ponavljanja. U testu rasta micelija je kao kontrola korišten VA bez dodatka fungicida, a u testu rasta kličnih cijevi KDA bez dodatka fungicida. Korištene su Petrijeve zdjelice promjera 60 mm.

#### 3.8.5.2. *In vitro* test rasta micelija na fungicidima

*In vitro* test rasta micelija izolata *Monilinia* vrsta na fungicidu proveden je prema izmijenjenoj metodologiji koju opisuju May-De Mio i sur. (2011) za aktivne tvari boskalid, difenkonazol, fenbukonazol, fluopiram, tebukonazol i tiofanat-metil te metodologiji koju opisuju Malandrakis i sur. (2013) za aktivnu tvar fenheksamid. Koncentracije fungicida iznosile su od 0,001 do 10 µg/ml, ovisno o reakciji pojedinog izolata (Prilog 3).

Kružnim je rezačem s ruba rastuće kolonije uzet isječak micelija na KDA promjera 5 mm koji je prenesen na Petrijeve zdjelice s dodatkom fungicida te na kontrolu. Petrijeve zdjelice inkubirane su u 'walk-in' klima komori (Kambič RK-3, Kambič, Slovenija) u mraku na temperaturi od 25 °C. Sljedećih dana praćen je rast svakog izolata na fungicidu te je dva puta očitani radijalni porast kolonije u četiri smjera kako bi se dobio prosječan porast kolonije *Monilinia* spp. izolata (mm) na određenoj koncentraciji fungicida i kontroli nakon 10 dana.

Prosječan porast kolonije nakon 10 dana izračunat je prema sljedećoj formuli:

$$P_{10} = (P_1 \times D_1) + \{(P_2 \times (10 - D_1))\}$$

Pri čemu je:

$P_{10}$  – prosječan porast kolonije određenog izolata nakon 10 dana

$P_1$  – prosječan porast kolonije određenog izolata po danu kod prvog očitavanja

$P_2$  – prosječan porast kolonije određenog izolata po danu kod drugog očitavanja

$D_1$  – dani prvog očitavanja

Temeljem dobivenih vrijednosti prosječnog porasta kolonije nakon 10 dana na određenim koncentracijama fungicida i kontroli, određen je postotak (%) inhibicije rasta micelija *Monilinia* spp. izolata prema formuli koju navode May-De Mio i sur. (2011):

$$\% \text{ In} = \frac{P_K - P_F}{P_K} \times 100$$

Pri čemu je:

$\% \text{ In}$  – % inhibicije rasta micelija

$P_K$  – prosječan porast kolonije izolata na kontroli

$P_F$  – prosječan porast kolonije izolata na određenoj koncentraciji fungicida

Vrijednosti koncentracija fungicida transformirane su u  $\log_{10}$  vrijednosti te je za dobivene vrijednosti postotka inhibicije svakog izolata provedena regresija inhibicije rasta micelija (May-De Mio i sur., 2011), koristeći Excel 2013 'Data analysis' program unutar programske podrške Microsoft Office (Microsoft, SAD). Dobivene  $\log_{10}$  vrijednosti koncentracija fungicida postavljene su u koordinatni sustav na apscisu (x os), a postotak inhibicije na ordinatu (y os). Unosom podataka u graf dobivena je krivulja koja je pretvorena u linearnu funkciju. Na dobivenom pravcu očitana je  $\log_{10}$  vrijednost srednje učinkovite koncentracije (eng. *half maximal effective concentration* –  $EC_{50}$ ) za svaki fungicid kod svakog izolata. Antilogaritmiranjem  $\log_{10}EC_{50}$  vrijednosti dobivene su  $EC_{50}$  vrijednosti, odnosno prosječne vrijednosti koncentracije fungicida koje inhibiraju rast micelija svakog izolata za 50 %.

### 3.8.5.3. *In vitro* test rasta kličnih cijevi na fungicidima

*In vitro* test rasta kličnih cijevi izolata *Monilinia* vrsta na fungicidu proveden je prema izmijenjenoj metodologiji koju opisuju Weber i Hahn (2011) za aktivnu tvar fludioksonil i Amiri i sur. (2010) za aktivne tvari boskalid, fluopiram, piraklostrobin i trifloksistrobin. Koncentracije fungicida iznosile su od 0,0001 do 3 µg/ml, ovisno o reakciji pojedinog izolata (Prilog 3).

Spore izolata *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* dobivene su umjetnom zarazom plodova nektarine (sorta Caldesi 2020) prema metodologiji opisanoj u poglavlju 3.8.2. *Analiza patogenosti na plodovima breskve, nektarine i šljive*. Nakon pojave sporulacije na plodovima, pripremljena je suspenzija spora. S različitog mjesta na plodu, konidije su u dva ponavljanja sterilnim štapićem prenesene u tubicu od 2 ml (Eppendorf, Njemačka) koja je sadržavala 1,5 ml sterilne vode. Tubice su jednu minutu vorteksirane pomoću miješalicu (Combi-spin PCV-2400, Grant Instruments, UK) te je suspenzija spora svakog izolata i ponavljanja izlivena na prethodno pripremljen KDA s dodatkom određenog fungicida ili na kontrolu. Nakon što je ocijeđen višak vode, Petrijeve su zdjelice četiri sata inkubirane u 'walk-in' klima komori (Kambič RK-3, Kambič, Slovenija) na temperaturi od 22 °C, nakon čega je svaka Petrijeva zdjelica pregledana mikroskopom (Olympus BX51, Japan). Koristeći programsku podršku analySIS docu© (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Njemačka), izmjerena je duljina klične cijevi (µm) nasumično odabranih 30 konidija po ponavljanju te je izračunata prosječna duljina klične cijevi po izolatu na određenoj koncentraciji fungicida i na kontroli. Kod neprokljalih konidija zabilježena je duljina klične cijevi od 0 µm.

Temeljem dobivenih vrijednosti prosječne duljine klične cijevi na određenim koncentracijama fungicida i kontroli, određen je postotak (%) inhibicije rasta klične cijevi svakog izolata prema formuli koju navode May-De Mio i sur. (2011):

$$\% \text{ In} = \frac{D_K - D_F}{D_K} \times 100$$

Pri čemu je:

% In – % inhibicije rasta klične cijevi

$D_K$  – prosječna duljina klične cijevi izolata na kontroli

$D_F$  – prosječna duljina klične cijevi izolata na određenoj koncentraciji fungicida



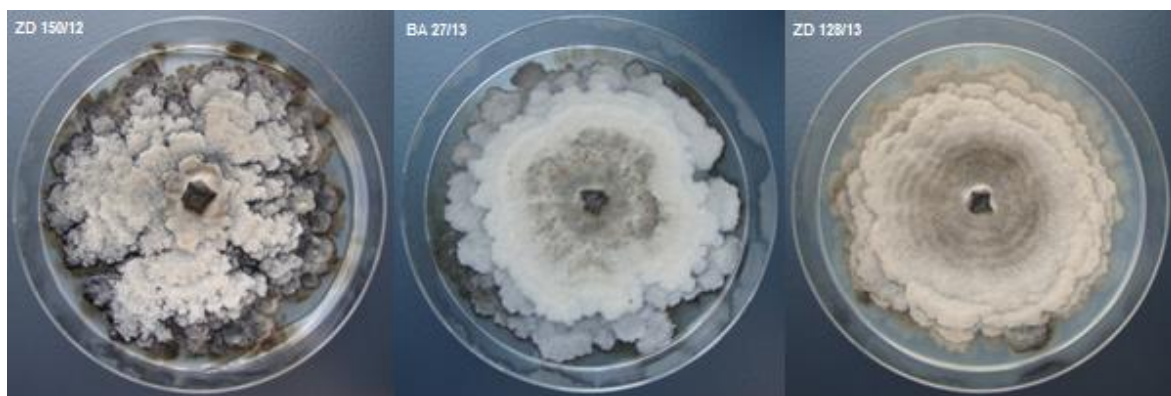
Koncentracije fungicida transformirane su u  $\log_{10}$  vrijednosti te je za dobivene vrijednosti postotka inhibicije svakog izolata provedena regresija inhibicije rasta kličnih cijevi (May-De Mio i sur., 2011) koristeći Excel 2013 '*Data analysis*' program unutar programske podrške Microsoft Office (Microsoft, SAD). Dobivene  $\log_{10}$  vrijednosti koncentracija fungicida postavljene su u koordinatni sustav na apscisu (x os), a postotak inhibicije na ordinatu (y os). Unosom podataka u graf dobivena je krivulja koja je pretvorena u linearnu funkciju. Na dobivenom pravcu očitana je  $\log_{10}$  vrijednost srednje učinkovite koncentracije ( $EC_{50}$ ) za svaki fungicid kod svakog izolata. Antilogaritmiranjem  $\log_{10}EC_{50}$  vrijednosti dobivene su  $EC_{50}$  vrijednosti, odnosno prosječne vrijednosti koncentracije fungicida koje inhibiraju rast kličnih cijevi svakog izolata za 50 %.

Kod izolata kod kojih je najniži postotak inhibicije rasta kličnih cijevi iznosio > 80 %,  $EC_{50}$  vrijednost izražena je kao  $EC_{50}$  vrijednost niža od najniže testirane koncentracije. Za te je izolate određena i  $EC_{90}$  vrijednost, odnosno koncentracija fungicida koja inhibira rast kličnih cijevi određenog izolata za 90 %.

## 4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

### 4.1. Morfološka obilježja izolata i identifikacija *Monilinia* vrsta

Od ukupno 364 prikupljena izolata, na temelju zabilježenih morfoloških obilježja prema sinoptičkom ključu (Lane, 2002), 361 izolat identficiran je kao *Monilinia* spp. Za tri je izolata utvrđeno kako ne pripadaju rodu *Monilinia*; izolat BR 75/12 identficiran je kao *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc., dok su izolati VT 22/12 i DB 41/12 identficirani kao *B. cinerea*. Morfološka obilježja svakog *Monilinia* spp. izolata prema istom sinoptičkom ključu (Lane, 2002) navedena su u Prilogu 4. Nekoliko kultura izolata vrsta *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* na KDA prikazano je na Slikama 10, 11 i 12.



**Slika 10.** Morfološka obilježja izolata *M. laxa* ZD 150/12 (lijevo), BA 27/13 (sredina) i ZD 128/13 (desno) na KDA nakon inkubacije na 22 °C na režimu 12 sati tame/12 sati svjetlosti.

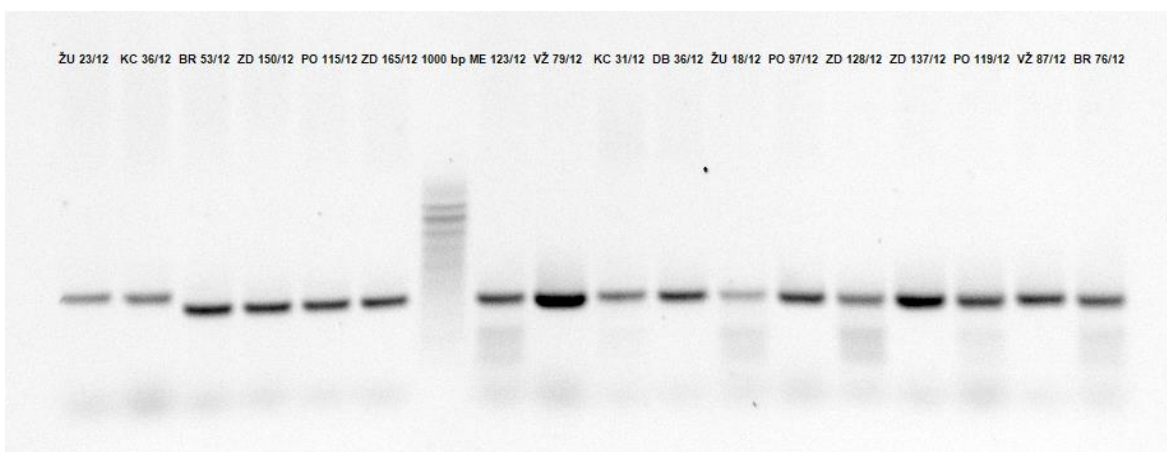


**Slika 11.** Morfološka obilježja izolata *M. fructigena* OS 67/13 (lijevo), PL 8/13 (sredina) i PO 114/12 (desno) na KDA nakon inkubacije na 22 °C na režimu 12 sati tame/12 sati svjetlosti.



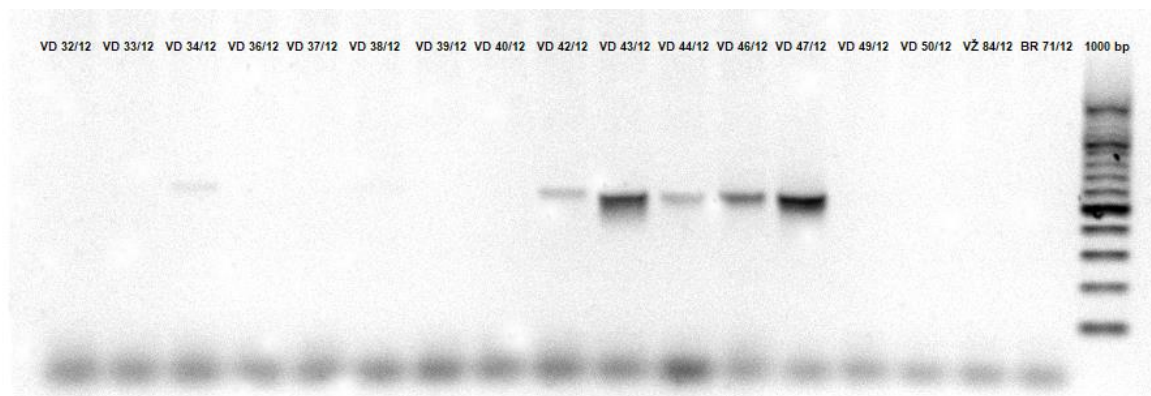
**Slika 12.** Morfološka obilježja izolata *M. fructicola* ZG 26/13 (lijevo), VŽ 24/13 (sredina) i VD 45/12 (desno) na KDA nakon inkubacije na 22 °C na režimu 12 sati tame/12 sati svjetlosti.

Nakon što su zabilježena morfološka obilježja *Monilinia* spp. izolata, uslijedila je identifikacija PCR metodom prema Côtéu i sur. (2004a). Navedena metoda korištena je za identifikaciju *Monilinia* spp. izolata sakupljenih 2012. i 2013. godine, s početnicama specifičnim za vrste *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* u zasebnim reakcijama. PCR reakcijom s početnicama specifičnim za *M. laxa* dobiveni su očekivani PCR produkti za *M. laxa* veličine 351 bp, dok su u reakciji s početnicama specifičnim za vrstu *M. fructigena* veličine produkta iznosile očekivanih 402 bp (Slika 13).



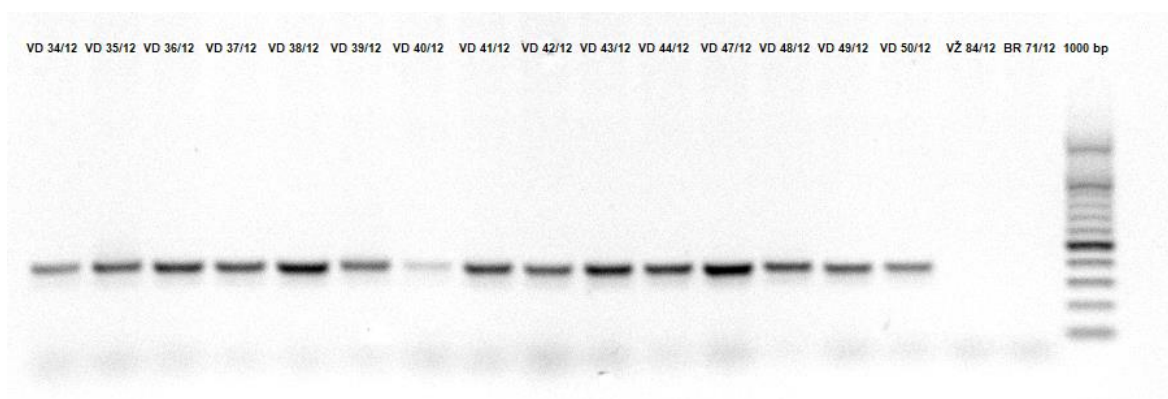
**Slika 13.** Prikaz elektroforeze PCR produkata veličine 402 bp (*M. fructigena*) i 351 bp (*M. laxa*) u 1,5 % agaroznom gelu umnoženih parovima početnica MO368-8R/MO368-5 (*M. fructigena*) i Laxa-R2/MO368-5 (*M. laxa*) u 'duplex' PCR reakciji (Côté i sur., 2004a). Jažice 1-2: *M. fructigena*; jažice 3-6: *M. laxa*; jažica 7: DNK ljestvica 1000 bp; jažice 8-18: *M. laxa*.

Međutim, u reakciji s početnicama specifičnim za *M. fructicola* (Côté i sur., 2004a), kod nekih izolata nije došlo do umnažanja dijela genoma s očekivanim fragmentom veličine 535 bp te je provedena 'multiplex' PCR metoda (Côté i sur., 2004a) koja se također pokazala nepouzdanom u umnažanju očekivanog produkta kod svih *Monilinia* spp. izolata (Slika 14).



**Slika 14.** Prikaz elektroforeze PCR produkata veličine 535 bp u 1,5 % agaroznom gelu umnoženih parom početnica MO368-10R/MO368-5 (Côté i sur., 2004a). Jažice 1-15: *M. fructicola*; jažica 16: *M. laxa*; jažica 17: *M. fructigena*; jažica 18: DNK ljestvica 1000 bp.

Iz tog je razloga provedena i PCR metoda koju opisuju loos i Frey (2000), s početnicama specifičnim za vrstu *M. fructicola*. PCR reakcijom umnožen je dio genoma *M. fructicola* te je dobiven očekivani fragment veličine 356 bp za sve *M. fructicola* izolate (Slika 15). Metoda koju opisuju loos i Frey (2000) provedena je za identifikaciju *M. fructicola* izolata sakupljenih 2012., 2013. i 2016. godine.



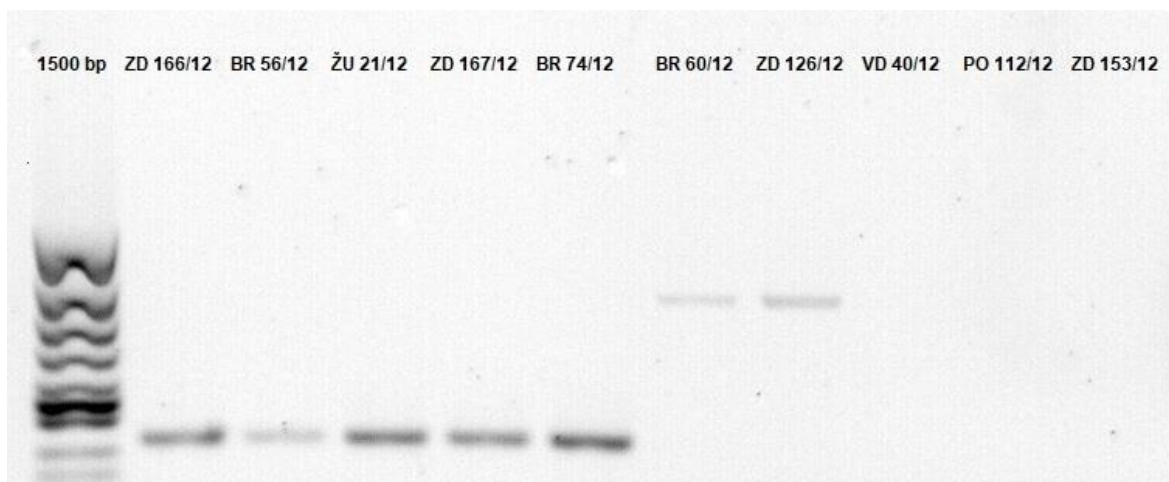
**Slika 15.** Prikaz elektroforeze PCR produkata veličine 356 bp u 1 % agaroznom gelu umnoženih parom početnica ITS1Mfc1/ITS4Mfc1 (loos i Frey, 2000). Jažice 1-15: *M. fructicola*; jažica 16: *M. laxa*; jažica 17: *M. fructigena*; jažica 18: DNK ljestvica 1000 bp.

Kod tri izolata prethodno identificiranih kao *M. laxa*, ZD 166/12, ZD 167/12 (Slika 16) i BR 60/12 te četiri izolata prethodno identificiranih kao *M. fructigena*, BR 56/12, ŽU 21/12, BR 74/12 i ZD 126/12, zapažen je morfološki izgled kulture na supstratu opisan za kineske vrste *M. mumeicola* i *M. yunnanensis* (Hu i sur., 2011).



**Slika 16.** Kolonija izolata ZD 167/12 na KDA nakon inkubacije na 22 °C na režimu 12 sati tame/12 sati svjetlosti.

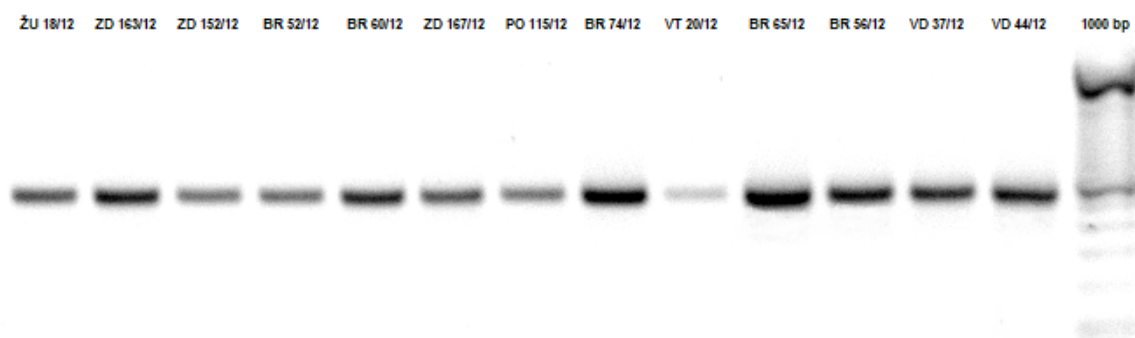
Provedenom 'duplex' PCR metodom, s početnicama specifičnim za vrste *M. mumeicola* i *M. yunnanensis* (Hu i sur., 2011), za pet su izolata (ZD 166/12, BR 56/12, ŽU 21/12, ZD 167/12 i BR 74/12) dobiveni očekivani fragmenti veličine 534 bp (*M. yunnanensis*), dok su za dva izolata (BR 60/12 i ZD 126/12) dobiveni očekivani fragmenti veličine 712 bp (*M. mumeicola*). Parovi početnica (Hu i sur., 2011) nisu umnožili produkt za tri kontrolna izolata *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* (Slika 17).



**Slika 17.** Prikaz elektroforeze PCR produkata veličine 534 bp (*M. yunnanensis*) i 712 bp (*M. mumeicola*) u 1,2 % agaroznom gelu umnoženih parovima početnica Ensis-F/Mon-R (*M. yunnanensis*) i Mume-F/Mon-R (*M. mumeicola*) u 'duplex' PCR reakciji (Hu i sur., 2011). Jažica 1: DNK ljestvica 1500 bp; jažice 2-6: *M. yunnanensis*; jažice 7-8: *M. mumeicola*; jažica 9: *M. fructicola*; jažica 10: *M. fructigena*; jažica 11: *M. laxa*.

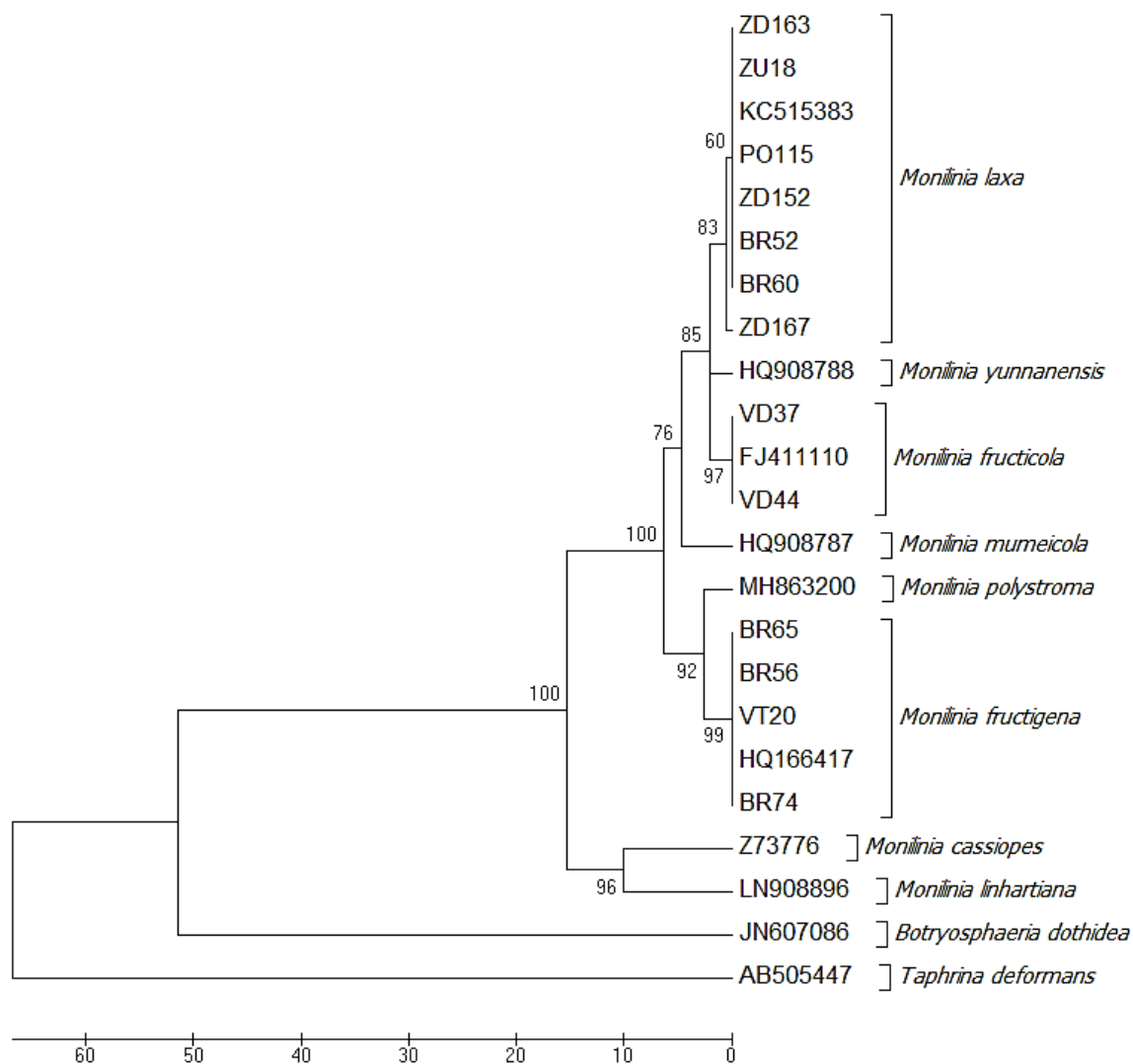
#### 4.2. Sekvenciranje i analiza sekvenci

U PCR reakciji (Ioos i Frey, 2000) umnoženi su fragmenti ITS regije 13 *Monilinia* spp. izolata s univerzalnim parom početnica ITS1 i ITS4 (White i sur., 1990). Kod svih su 13 *Monilinia* spp. izolata dobiveni očekivani fragmenti veličine 538 bp (Slika 18).



**Slika 18.** Prikaz elektroforeze PCR produkata veličine 538 bp (*Monilinia* spp.) u 1,5 % agaroznom gelu umnoženih univerzalnim parovima početnica ITS1 i ITS4 (White i sur., 1990) u PCR reakciji (Ioos i Frey, 2000). Jažice 1-7: *M. laxa*; jažice 8-11: *M. fructigena*; jažice 12-13: *M. fructicola*; jažica 14: DNK ljestvica 1000 bp.

Filogenetska analiza dobivenih sekvenci dijela ITS regije (Slika 19) dodatno je potvrdila pripadnost određenoj *Monilinia* vrsti, kako je određeno PCR metodom (Ioos i Frey, 2000; Côté i sur., 2004a) (Prilog 4).



**Slika 19.** Filogenetsko stablo dobiveno analizom nukleotidnih sekvenci fragmenta ITS genske regije, uz korištenje UPGMA metode i modela 'number of differences'. Brojevi u čvorištu grana predstavljaju vrijednosti dobivene statističkom metodom 'bootstrap' uz 1000 ponavljanja. Za ukorjenjivanje stabla korištene su sekvence vrsta *B. dothidea* i *T. deformans*, a u analizu su uvrštene i sekvence drugih *Monilinia* vrsta. Na stablu su vidljivi pristupni brojevi sekvenci iz baze podataka GenBank (Tablica 13) te oznake izolata iz ovog istraživanja (Prilog 4).

Od ukupno sedam *Monilinia* spp. izolata, kod kojih je u 'duplex' PCR reakciji s početnicama specifičnim za *M. mumeicola* i *M. yunnanensis* dobivena očekivana veličina produkta za te vrste (Hu i sur., 2011) (Slika 17), u dvije su zasebne PCR reakcije umnoženi fragmenti gena G3PDH i TUB2 s parovima početnica za direktno sekvenciranje (Hu i sur., 2011). Kod svih su sedam *Monilinia* spp. izolata dobiveni očekivani fragmenti gena G3PDH veličine 786 bp (Slika 20), odnosno fragmenti gena TUB2 veličine 1630 bp (Slika 21).



**Slika 20.** Prikaz elektroforeze PCR produkata veličine 786 bp (*Monilinia* spp.) u 1,5 % agaroznom gelu umnoženih parovima početnica Mon-G3pdhF/Mon-G3pdhR u PCR reakciji (Hu i sur., 2011). Jažice 1-7: *Monilinia* spp.; jažica 8: DNK ljestvica 1500 bp.

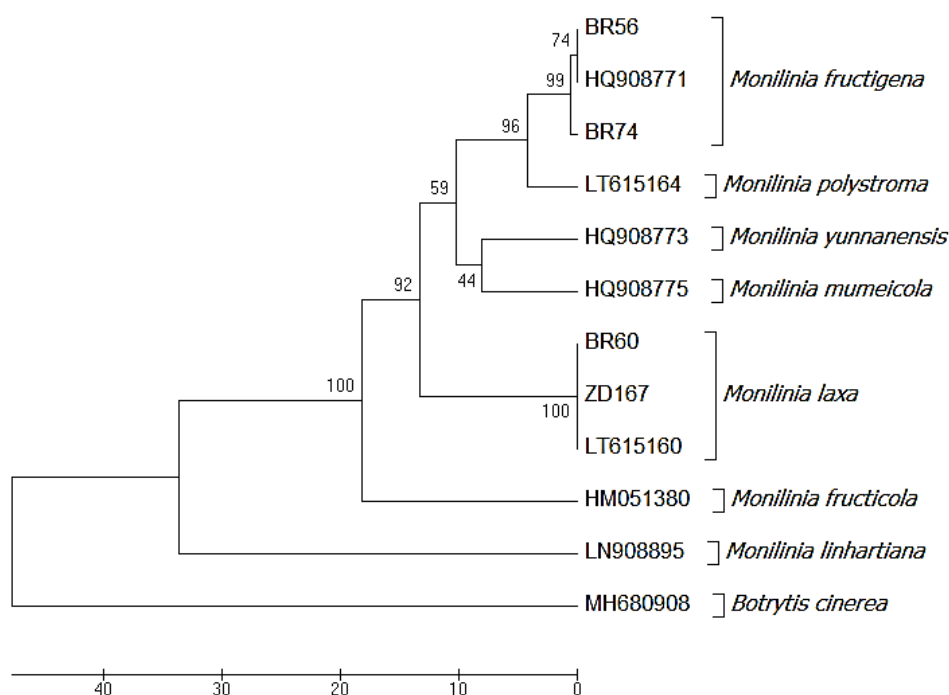


**Slika 21.** Prikaz elektroforeze PCR produkata veličine 1630 bp (*Monilinia* spp.) u 1,5 % agaroznom gelu umnoženih parovima početnica Mon-TubF1/Mon-TubR1 u PCR reakciji (Hu i sur., 2011). Jažica 1: DNK ljestvica 1500 bp; jažice 2-8: *Monilinia* spp.



Umnoženi fragmenti gena za G3PDH za četiri *Monilinia* spp. izolata (BR 56/12, BR 74/12, BR 60/12 i ZD 167/12) podvrgnuti su filogenetskoj analizi. Usporedba dobivenih sekvenci fragmenta gena za G3PDH sa sekvencama dostupnim u bazi podataka GenBank pokazala je kako je većina produkata dobivenih u PCR reakciji nespecifično umnožena te kvaliteta dobivenih sekvenci nije bila zadovoljavajuća. Usprkos niskoj kvaliteti sekvence izolata BR 56/12 koja je iznosila samo 14 %, dobivena je sličnost od 82 % sa sekvencom vrste *M. fructigena* (pristupni broj JQ036027). Isti je izolat identificiran kao *M. fructigena* i prema PCR metodi koju opisuju Côté i sur. (2004a).

Filogenetska analiza dobivenih sekvenci fragmenata gena TUB2 za četiri *Monilinia* spp. izolata (BR 56/12, BR 74/12, BR 60/12 i ZD 167/12) (Slika 22) nije potvrdila pripadnost vrstama *M. mumeicola* i *M. yunnanensis*, unatoč umnažanju dijela DNK u PCR reakciji sa specifičnim parovima početnica (Hu i sur., 2011) (Slika 17). Za navedene je izolate dodatno potvrđena pripadnost određenoj *Monilinia* spp. vrsti, kako je određeno PCR metodom koju opisuju Côté i sur. (2004a) (Prilog 4).

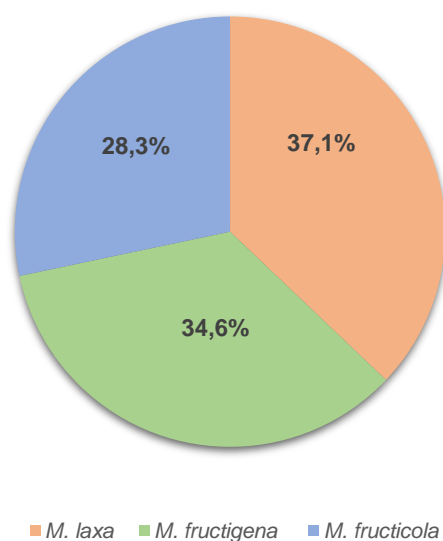


**Slika 22.** Filogenetsko stablo dobiveno analizom nukleotidnih sekvenci fragmenta gena za TUB2, uz korištenje UPGMA metode i modela 'number of differences'. Brojevi u čvorištu grana predstavljaju vrijednosti dobivene statističkom metodom 'bootstrap' uz 1000 ponavljanja. Za ukorjenjivanje stabla korištena je sekvenca vrste *B. cinerea*, a u analizu su uvrštene i sekvence drugih *Monilinia* vrsta. Na stablu su vidljivi pristupni brojevi sekvenci iz baze podataka GenBank (Tablica 13) te oznake izolata iz ovog istraživanja (Prilog 4).

Rezultati identifikacije svih *Monilinia* spp. izolata PCR-om do razine vrste te rezultati filogenetske analize sekvenci prikazani su u Prilogu 4.

Analiza morfoloških obilježja i identifikacija PCR-om provedena je za ukupno 361 izolat *Monilinia* spp., dok je za još 13 izolata dodatno provedena filogenetska analiza koja je potvrdila rezultate identifikacije PCR-om. Ukupno su 134 izolata (37,1 %) identificirana kao *M. laxa*, 125 kao *M. fructigena* (34,6 %), a 102 (28,3 %) kao *M. fructicola* (Grafikon 1). Identifikacija vrste *M. fructicola* bila je prvi je nalaz te vrste na području Republike Hrvatske.

Udio (%) identificiranih *Monilinia* vrsta



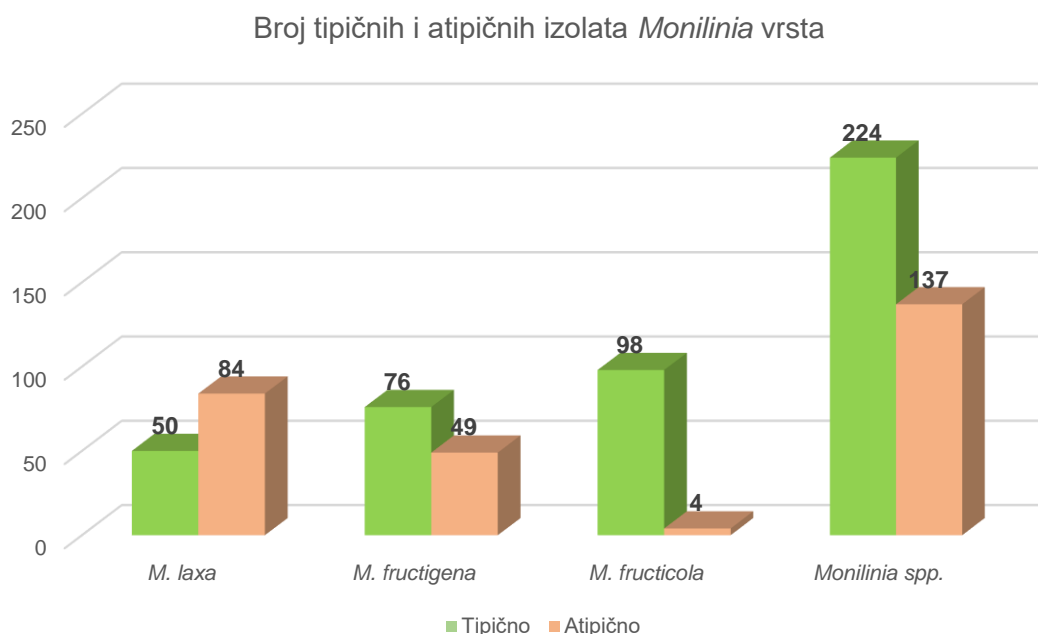
**Grafikon 1.** Zastupljenost *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* unutar ukupne istraživane populacije *Monilinia* vrsta.

Usporedbom zabilježenih morfoloških obilježja *Monilinia* spp. izolata prema sinoptičkom ključu (Lane, 2002) s rezultatima identifikacije PCR-om (Ioos i Frey, 2000; Côté i sur., 2004a), dobiven je broj tipičnih i atipičnih *Monilinia* spp. izolata unutar vrste te broj tipičnih i atipičnih izolata u ukupnoj *Monilinia* spp. populaciji (Tablica 16).

**Tablica 16.** Broj tipičnih i atipičnih izolata *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* sukladno sinoptičkom ključu (Lane, 2002)

Vrsta	Broj tipičnih izolata	Broj atipičnih izolata	Ukupno izolata po vrsti
<i>M. laxa</i>	50	84	134
<i>M. fructigena</i>	76	49	125
<i>M. fructicola</i>	98	4	102
<b>Ukupno</b>	<b>224</b>	<b>137</b>	<b>361</b>

Od ukupno 134 izolata identificiranih PCR-om kao *M. laxa* (Côté i sur., 2004a), 50 je izolata (37,3 %) pokazalo morfološka obilježja tipična za vrstu, dok je njih 84 (62,7 %) prema nekom od obilježja sinoptičkog ključa (Lane, 2002) bilo atipično. Od 125 izolata PCR-om identificiranih kao *M. fructigena* (Côté i sur., 2004a), prema sinoptičkom je ključu (Lane, 2002) njih 76 (60,8 %) bilo tipično, a atipično 49 (39,2 %). Izolati vrste *M. fructicola* pokazali su najveću podudarnost sa sinoptičkim ključem (Lane, 2002). Od ukupno 102 izolata identificiranih PCR-om (loos i Frey, 2000; Côté i sur., 2004a), njih čak 98 (96,1 %) imalo je tipična morfološka obilježja za vrstu, dok su 4 izolata (3,9 %) prema sinoptičkom ključu (Lane, 2002) bila atipična. Od ukupne *Monilinia* spp. populacije, 224 izolata (62,0 %) morfološki su bila tipična za vrstu, dok je njih 137 (38,0 %) bilo atipično. Broj tipičnih i atipičnih *Monilinia* spp. izolata prikazan je u Grafikonu 2.



**Grafikon 2.** Broj tipičnih i atipičnih izolata *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* te svih *Monilinia* spp. izolata temeljen na usporedbi morfoloških obilježja (Lane, 2002) i identifikacije PCR-om (loos i Frey, 2000; Côté i sur., 2004a).

Na temelju zabilježenih tipičnih i atipičnih morfoloških obilježja sukladno identifikacijskom ključu (Lane, 2002) te na temelju rezultata identifikacije PCR-om (loos i Frey, 2000; Côté i sur., 2004a), utvrđen je broj izolata *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* koji pokazuje određeno morfološko obilježje (Tablice 17, 18 i 19). Sva su navedena morfološka obilježja s odgovarajućim oznakama opisana u poglavlju 3.3. *Analiza morfoloških obilježja izolata Monilinia vrsta.*

**Tablica 17.** Broj i postotak izolata *M. laxa* s određenim morfološkim obilježjem (Lane, 2002)

Morfološko obilježje	Oznaka	Broj izolata (n=134)	% izolata (n=134)
Siva boja kolonije na licu Petrijeve zdjelice	A	127	94,8
<b>Žuta boja kolonije na licu Petrijeve zdjelice</b>	<b>B</b>	<b>3</b>	<b>2,2</b>
Krem/bijela boja kolonije na licu Petrijeve zdjelice	(C)	(4)	(3,0)
<b>Raste brzo (prosječan promjer kolonije &gt; 80 mm)</b>	<b>D</b>	<b>10</b>	<b>7,5</b>
Raste umjereno (prosječan promjer kolonije 70-80 mm)	(E)	(89)	(66,4)
Raste sporo (prosječan promjer kolonije < 70 mm)	F	35	26,1
<b>Obilna sporulacija</b>	<b>G</b>	<b>19</b>	<b>14,2</b>
Oskudna sporulacija	H	115	85,8
<b>Prisutna sporulacija u koncentričnim krugovima</b>	<b>I</b>	<b>3</b>	<b>2,2</b>
Nije prisutna sporulacija u koncentričnim krugovima	J	131	97,8
Rub kolonije na naličju Petrijeve zdjelice valovit	K	127	94,8
<b>Rub kolonije na naličju Petrijeve zdjelice ravan</b>	<b>L</b>	<b>7</b>	<b>5,2</b>
Prisutne rozete	M	119	88,8
Nisu prisutne rozete	(N)	(15)	(11,2)
Crni reznjevi ili krugovi uz rozete	O	70	52,2
<b>Crni točkasti dijelovi ili smeđi reznjevi ili krugovi</b>	<b>P</b>	<b>0</b>	<b>0,0</b>
<b>Reznjevi nisu prisutni</b>	<b>Q</b>	<b>64</b>	<b>47,8</b>

Morfološko obilježje atipično za vrstu *M. laxa* (Lane, 2002) označeno je podebljanim slovima.

**Tablica 18.** Broj i postotak izolata *M. fructigena* s određenim morfološkim obilježjem (Lane, 2002)

Morfološko obilježje	Oznaka	Broj izolata (n=125)	% izolata (n=125)
<b>Siva boja kolonije na licu Petrijeve zdjelice</b>	<b>A</b>	<b>15</b>	<b>12,0</b>
Žuta boja kolonije na licu Petrijeve zdjelice	B	70	56,0
Krem/bijela boja kolonije na licu Petrijeve zdjelice	(C)	(40)	(32,0)
Raste brzo (prosječan promjer kolonije > 80 mm)	(D)	(69)	(55,2)
Raste umjereno (prosječan promjer kolonije 70-80 mm)	E	45	36,0
Raste sporo (prosječan promjer kolonije < 70 mm)	(F)	(11)	(8,8)
Obilna sporulacija	(G)	(19)	(15,2)
Oskudna sporulacija	H	106	84,8
Prisutna sporulacija u koncentričnim krugovima	(I)	(14)	(11,2)
Nije prisutna sporulacija u koncentričnim krugovima	J	111	88,8
<b>Rub kolonije na naličju Petrijeve zdjelice valovit</b>	<b>K</b>	<b>45</b>	<b>36,0</b>
Rub kolonije na naličju Petrijeve zdjelice ravan	L	80	64,0
<b>Prisutne rozete</b>	<b>M</b>	<b>21</b>	<b>16,8</b>
Nisu prisutne rozete	N	104	83,2
<b>Crni reznjevi ili krugovi uz rozete</b>	<b>O</b>	<b>15</b>	<b>12,0</b>
<b>Crni točkasti dijelovi ili smeđi reznjevi ili krugovi</b>	<b>P</b>	<b>0</b>	<b>0,0</b>
Reznjevi nisu prisutni	Q	110	88,0

Morfološko obilježje atipično za vrstu *M. fructigena* (Lane, 2002) označeno je podebljanim slovima.

**Tablica 19.** Broj i postotak izolata *M. fructicola* s određenim morfološkim obilježjem (Lane, 2002)

Morfološko obilježje	Oznaka	Broj izolata (n=102)	% izolata (n=102)
Siva boja kolonije na licu Petrijeve zdjelice	A	102	100,0
<b>Žuta boja kolonije na licu Petrijeve zdjelice</b>	<b>B</b>	<b>0</b>	<b>0,0</b>
<b>Krem/bijela boja kolonije na licu Petrijeve zdjelice</b>	<b>C</b>	<b>0</b>	<b>0,0</b>
Raste brzo (prosječan promjer kolonije > 80 mm)	D	77	75,5
Raste umjereno (prosječan promjer kolonije 70-80 mm)	(E)	(25)	(24,5)
<b>Raste sporo (prosječan promjer kolonije &lt; 70 mm)</b>	<b>F</b>	<b>0</b>	<b>0,0</b>
Obilna sporulacija	G	102	100,0
<b>Oskudna sporulacija</b>	<b>H</b>	<b>0</b>	<b>0,0</b>
Prisutna sporulacija u koncentričnim krugovima	I	3	2,9
Nije prisutna sporulacija u koncentričnim krugovima	(J)	(99)	(97,1)
<b>Rub kolonije na naličju Petrijeve zdjelice valovit</b>	<b>K</b>	<b>4</b>	<b>3,9</b>
Rub kolonije na naličju Petrijeve zdjelice ravan	L	98	96,1
Prisutne rozete	(M)	(0)	(0,0)
Nisu prisutne rozete	N	102	100,0
<b>Crni reznjevi ili krugovi uz rozete</b>	<b>O</b>	<b>0</b>	<b>0,0</b>
Crni točkasti dijelovi ili smeđi reznjevi ili krugovi	(P)	(0)	(0,0)
Reznjevi nisu prisutni	Q	102	100,0

Morfološko obilježje atipično za vrstu *M. fructicola* (Lane, 2002) označeno je podebljanim slovima.

Utvrđivanje broja i postotka izolata *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* s određenim morfološkim obilježjem (Lane, 2002) omogućilo je izradu morfološkog profila sve tri *Monilinia* vrste koji se pokazao kao najzastupljeniji u Hrvatskoj (Tablica 20).

**Tablica 20.** Najčešći morfološki profil *Monilinia* vrsta u Hrvatskoj

Vrsta	Najčešća morfološka obilježja u RH	Broj izolata (%)	Najčešći morfološki profil u RH
<i>M. laxa</i>	A (E) H J K M <b>Q</b>	37/134 (27,6 %)	Laxa-HR
<i>M. fructigena</i>	B (D) H J L N Q	33/125 (26,4 %)	Gena-HR
<i>M. fructicola</i>	A D G (J) L N Q	75/102 (73,5 %)	Cola-HR

Morfološko obilježje atipično za vrstu (Lane, 2002) označeno je podebljanim slovom i sivom bojom.

Najčešći morfološki profili hrvatskih izolata vrsta *M. fructigena* (Gena-HR) i *M. fructicola* (Cola-HR) podudaraju se s tipičnim morfološkim obilježjima koje opisuje Lane (2002). Ti su profili utvrđeni kod 26,4 % (Gena-HR) i 73,5 % (Cola-HR) izolata. Najčešći morfološki profil hrvatskih izolata vrste *M. laxa* (Laxa-HR) javljao se kod ukupno 27,6 % izolata. Profil Laxa-HR obuhvaća i „Q“ morfološko obilježje, odnosno obilježje kod kojeg nisu prisutni crni ili smeđi reznjevi na kolonijama, inače tipični za vrstu *M. laxa* (Lane, 2002). Utvrđeno je kako

se morfološko obilježje „Q“, atipično za *M. laxa* prema sinoptičkom ključu (Lane, 2002), u ukupnoj *M. laxa* populaciji iz Hrvatske javlja kod 47,8 % izolata.

#### 4.3. Raširenost *Monilinia* vrsta na koštičavom voću u Hrvatskoj

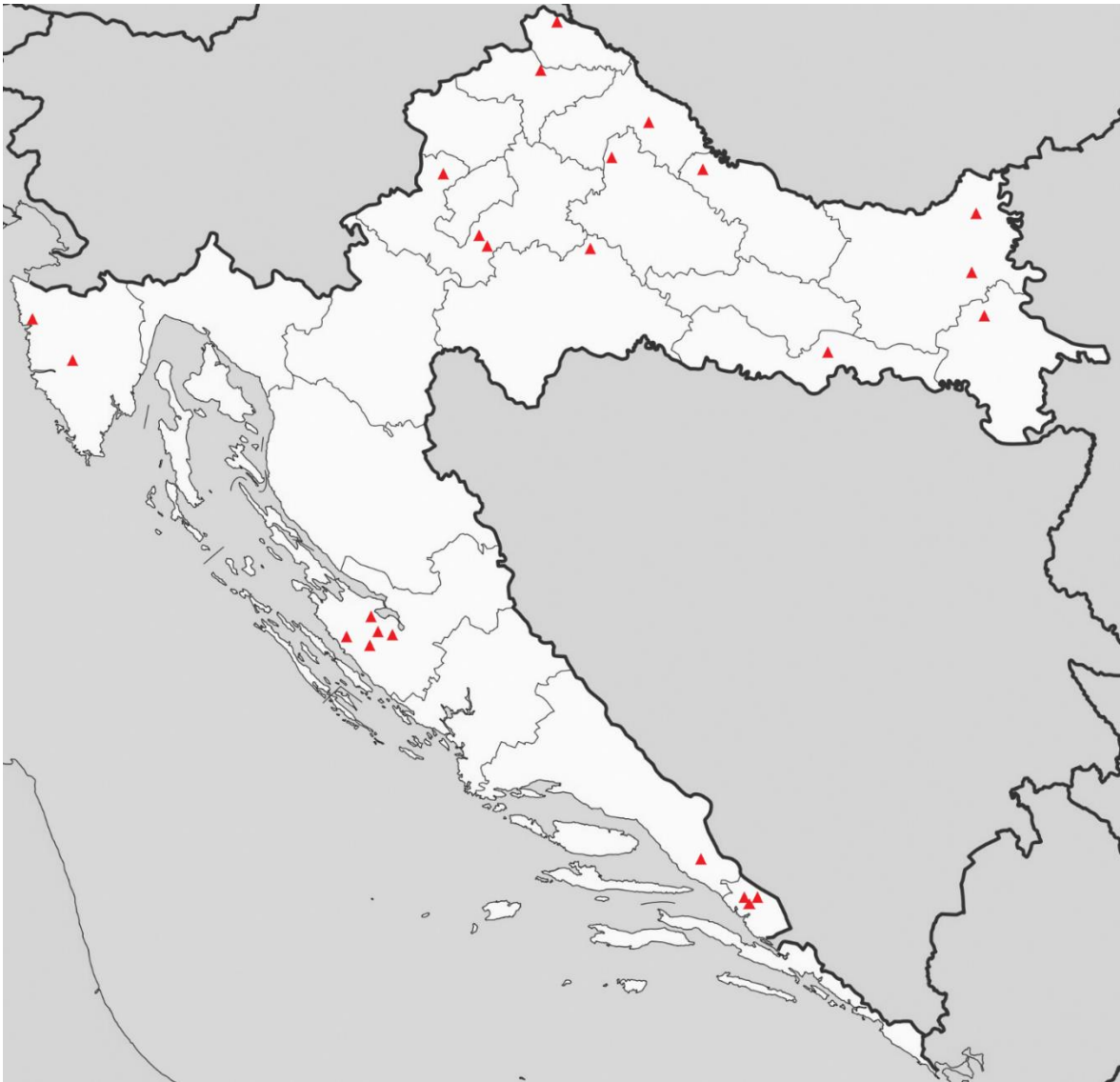
Na temelju identifikacije do razine vrste, dobiveni su podaci o raširenosti vrsta *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* na koštičavom voću u Republici Hrvatskoj prema županijama i lokacijama voćnjaka u kojima je provedeno istraživanje. Rezultati su prikazani u Tablici 21.

**Tablica 21.** Zastupljenost *Monilinia* vrsta prema županijama i lokacijama (voćnjacima) obuhvaćenima istraživanjem

Županija	Lokacija (voćnjak)	<i>M. laxa</i>	<i>M. fructigena</i>	<i>M. fructicola</i>
Dubrovačko-neretvanska	Modrić	2	0	0
	Metković	3	0	0
	Vrbovci	1	2	14
	<b>Ukupno</b>	<b>6</b>	<b>2</b>	<b>14</b>
Splitsko-dalmatinska	Umčani	1	2	48
	Kroška	0	1	19
	Veliki Prolog	0	0	1
	Dusina	0	0	8
	<b>Ukupno</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>76</b>
Zadarska	Podgradina	12	3	0
	Kašić	16	7	0
	Smilčić	11	6	0
	Baštica	3	7	0
	Škabrnja	7	3	0
	<b>Ukupno</b>	<b>49</b>	<b>26</b>	<b>0</b>
Istarska	Finida	10	21	0
	Kaldir	5	8	2
	<b>Ukupno</b>	<b>15</b>	<b>29</b>	<b>2</b>
Varaždinska	Biškupec	3	8	0
	<b>Ukupno</b>	<b>3</b>	<b>8</b>	<b>0</b>
Međimurska	Vratišinec	1	9	1
	<b>Ukupno</b>	<b>1</b>	<b>9</b>	<b>1</b>
Zagrebačka	Staro Čiče	16	9	1
	Novo Čiče	2	0	0
	Bukovje Bistransko	1	0	0
	<b>Ukupno</b>	<b>19</b>	<b>9</b>	<b>1</b>
Sisačko-moslavačka	Velika Ludina	4	6	0
	<b>Ukupno</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>0</b>

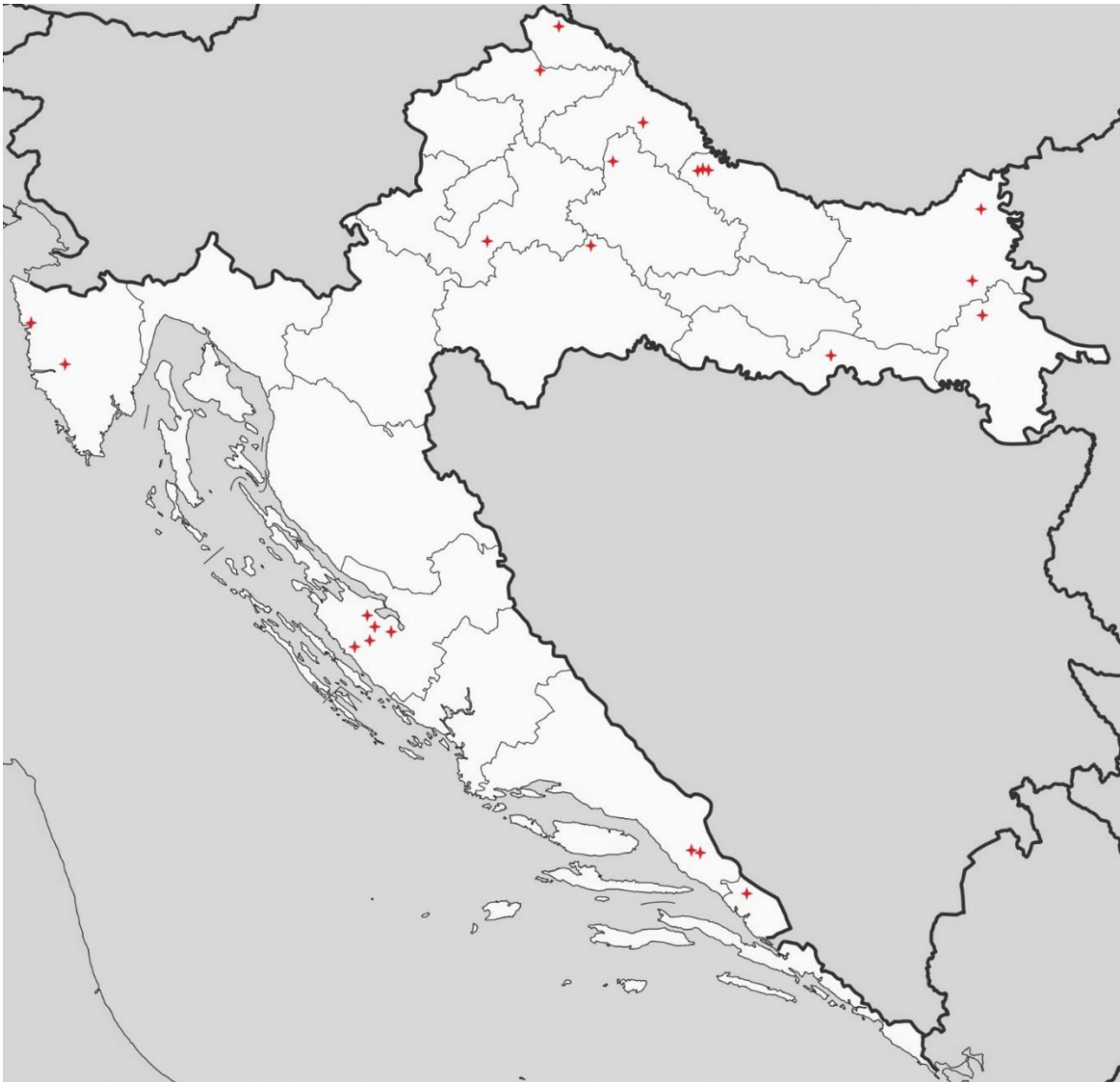
Županija	Lokacija (voćnjak)	<i>M. laxa</i>	<i>M. fructigena</i>	<i>M. fructicola</i>
Virovitičko-podravska	Vukosavljevica	1	4	0
	Vukosavljevica - Brdo	0	5	0
	Vukosavljevica - Potok	0	1	0
	<b>Ukupno</b>	<b>1</b>	<b>10</b>	<b>0</b>
Bjelovarsko-bilogorska	Rovišće	1	4	0
	<b>Ukupno</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>0</b>
Koprivničko-križevačka	Novigrad Podravski	8	7	0
	<b>Ukupno</b>	<b>8</b>	<b>7</b>	<b>0</b>
Osječko-baranjska	Kamenac	8	1	0
	Tovljač	3	2	0
	<b>Ukupno</b>	<b>11</b>	<b>3</b>	<b>0</b>
Brodsko-posavska	Završje	6	6	0
	<b>Ukupno</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>0</b>
Vukovarsko-srijemska	Borinci	9	3	8
	<b>Ukupno</b>	<b>9</b>	<b>3</b>	<b>8</b>

Prisutnost vrsta *M. laxa* i *M. fructigena* potvrđena je u svih 14 hrvatskih županija koje su bile obuhvaćene ovim istraživanjem. Raširenost tih vrsta, s lokacijama nalaska, prikazana je na Kartama 1 i 2. Vrsta *M. fructicola* nađena je u šest hrvatskih županija (Dubrovačko-neretvanska, Splitsko-dalmatinska, Istarska, Međimurska, Zagrebačka i Vukovarsko-srijemska), a njena je raširenost s lokacijama nalaska prikazana na Karti 3.

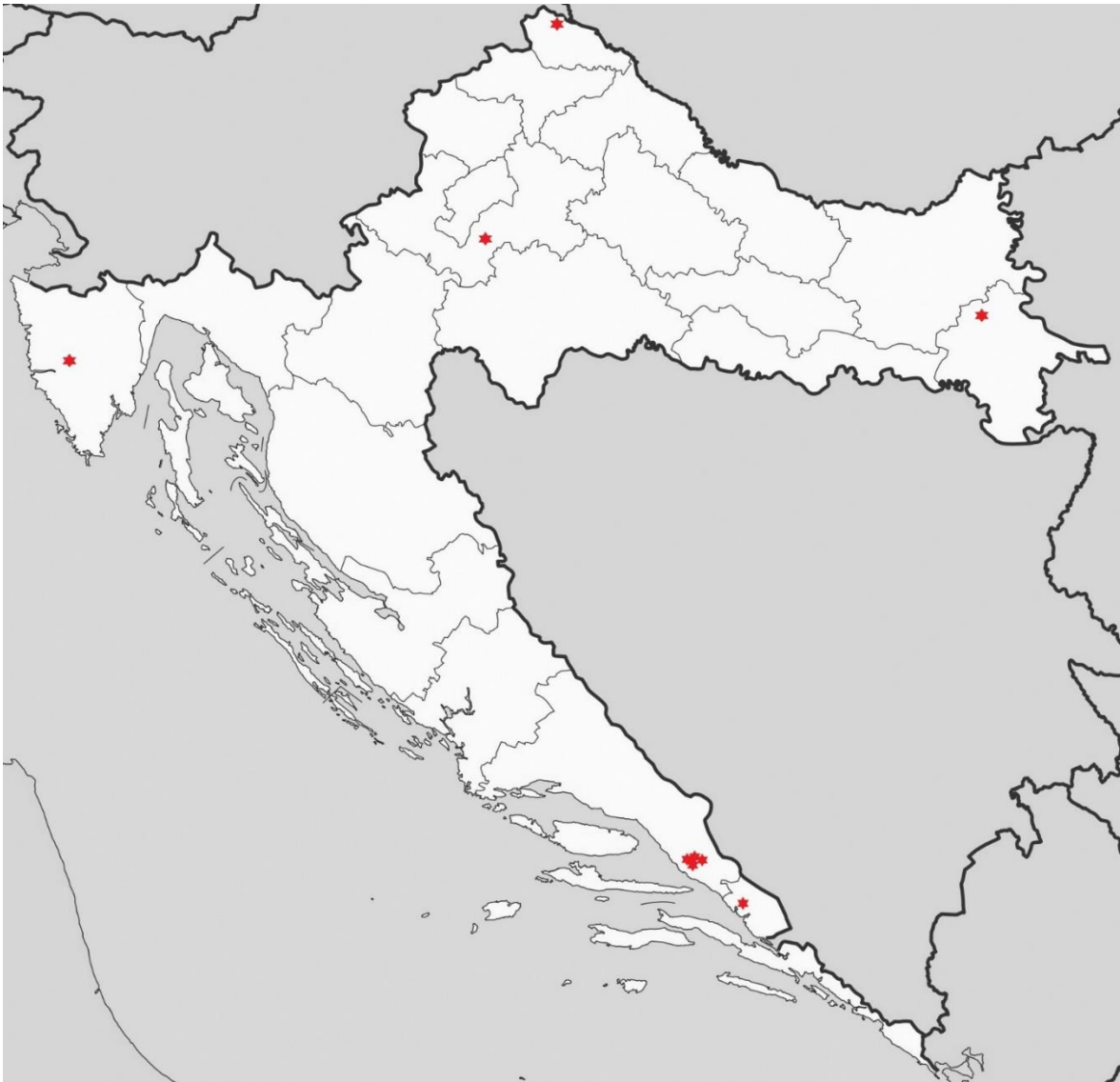


**Karta 1.** Prikaz raširenosti vrste *M. laxa* u hrvatskim županijama prema lokacijama na kojima je potvrđena njena prisutnost: Dubrovačko-neretvanska (Modrić, Metković i Vrbovci), Splitsko-dalmatinska (Umčani), Zadarska (Podgradina, Kašić, Smilčić, Baštica i Škabrnja), Istarska (Finida i Kaldir), Varaždinska (Biškupec), Međimurska (Vratišinec), Zagrebačka (Staro Čiče, Novo Čiče i Bukovje Bistransko), Sisačko-moslavačka (Velika Ludina), Virovitičko-podravska (Vukosavljevica), Bjelovarsko-bilogorska (Rovišće), Koprivničko-križevačka (Novigrad Podravski), Osječko-baranjska (Kamenac i Tovljač), Brodsko-posavska (Završje) i Vukovarsko-srijemska (Borinci).





**Karta 2.** Prikaz raširenosti vrste *M. fructigena* u hrvatskim županijama prema lokacijama na kojima je potvrđena njena prisutnost: Dubrovačko-neretvanska (Vrbovci), Splitsko-dalmatinska (Umčani i Kroška), Zadarska (Podgradina, Kašić, Smilčić, Baštica i Škabrnja), Istarska (Finida i Kaldir), Varaždinska (Biškupec), Međimurska (Vratišinec), Zagrebačka (Staro Čiče), Sisačko-moslavačka (Velika Ludina), Virovitičko-podravska (Vukosavljevica, Vukosavljevica - Brdo i Vukosavljevica - Potok), Bjelovarsko-bilogorska (Rovišće), Koprivničko-križevačka (Novigrad Podravski), Osječko-baranjska (Kamenac i Tovljač), Brodsko-posavska (Završje) i Vukovarsko-srijemska (Borinci).



**Karta 3.** Prikaz raširenosti vrste *M. fructicola* u hrvatskim županijama prema lokacijama na kojima je potvrđena njena prisutnost: Dubrovačko-neretvanska (Vrbovci), Splitsko-dalmatinska (Umčani, Kroška, Veliki Prolog i Dusina), Istarska (Kaldir), Međimurska (Vratišinec), Zagrebačka (Staro Čiče) i Vukovarsko-srijemska (Borinci).

#### 4.4. Bioraznolikost populacija *Monilinia* vrsta na koštičavom voću u Hrvatskoj

##### 4.4.1. Ukupna bioraznolikost populacija *Monilinia* vrsta u Hrvatskoj

Ukupna bioraznolikost populacija *Monilinia* vrsta u Republici Hrvatskoj određena je na temelju izračuna udjela (%) pojedinih *Monilinia* vrsta u odnosu na ukupnu populaciju *Monilinia* vrsta obuhvaćenu ovim istraživanjem. Broj izolata identificiranih kao pojedina *Monilinia* vrsta i udio (%) svake vrste u ukupnoj istraživanoj populaciji *Monilinia* vrsta prikazani su u Tablici 22.

**Tablica 22.** Broj i udio (%) *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* u odnosu na ukupnu populaciju *Monilinia* vrsta obuhvaćenu istraživanjem u Republici Hrvatskoj

RH	Br <sub>up</sub> (M <sub>spp.</sub> )	Br <sub>up</sub> (M <sub>laxa</sub> ) % (M <sub>laxa</sub> ) UP	Br <sub>up</sub> (M <sub>fructigena</sub> ) % (M <sub>fructigena</sub> ) UP	Br <sub>up</sub> (M <sub>fructicola</sub> ) % (M <sub>fructicola</sub> ) UP
Ukupno	361	134 37,1 %	125 34,6 %	102 28,3 %

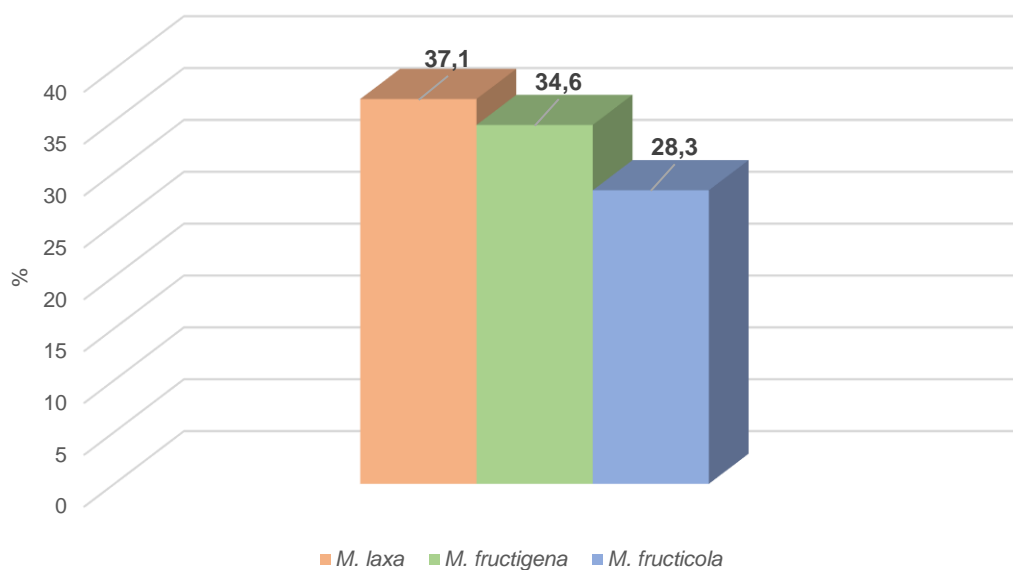
Br<sub>up</sub> (M<sub>spp.</sub>) – ukupna populacija *Monilinia* vrsta

Br<sub>up</sub> (M<sub>laxa</sub>, M<sub>fructigena</sub>, M<sub>fructicola</sub>) – broj izolata identificiranih kao *M. laxa*, *M. fructigena* ili *M. fructicola* u ukupnoj populaciji

% (M<sub>laxa</sub>, M<sub>fructigena</sub>, M<sub>fructicola</sub>) UP – udio *M. laxa*, *M. fructigena* ili *M. fructicola* u ukupnoj populaciji

Na razini Republike Hrvatske, koja je u ovom istraživanju obuhvaćala 14 županija, *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* bile su prisutne sa sličnom učestalošću (37,1 %, 34,6 % i 28,3 %) te se ni jedna ne može smatrati dominantnom u odnosu na ukupnu populaciju *Monilinia* vrsta. Ukupna bioraznolikost populacija *Monilinia* vrsta u Hrvatskoj prikazana je u Grafikonu 3.

### Bioraznolikost populacija *Monilinia* vrsta u Republici Hrvatskoj



**Grafikon 3.** Ukupna bioraznolikost populacija *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* u Republici Hrvatskoj.

#### 4.4.2. Bioraznolikost populacija *Monilinia* vrsta u pojedinim županijama

Bioraznolikost populacija *Monilinia* vrsta u pojedinim županijama određena je na temelju izračuna udjela (%) pojedinih *Monilinia* vrsta u odnosu na ukupnu populaciju *Monilinia* vrsta utvrđenu u pojedinoj županiji. Bioraznolikost populacija utvrđena je zasebno za svaku županiju obuhvaćenu ovim istraživanjem. Broj utvrđenih pojedinih *Monilinia* vrsta i udio (%) svake vrste u ukupnoj istraživanoj populaciji *Monilinia* vrsta u pojedinim županijama prikazani su u Tablici 23.

**Tablica 23.** Broj i udio (%) *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* u odnosu na ukupnu populaciju *Monilinia* vrsta u pojedinim županijama

Županija	Br <sub>žup</sub> (M <sub>spp.</sub> )	Br <sub>žup</sub> (M <sub>laxa</sub> )	Br <sub>žup</sub> (M <sub>fructigena</sub> )	Br <sub>žup</sub> (M <sub>fructicola</sub> )
		% (M <sub>laxa</sub> ) ŽUP	% (M <sub>fructigena</sub> ) ŽUP	% (M <sub>fructicola</sub> ) ŽUP
Dubrovačko-neretvanska	22	6 27,3 %	2 9,1 %	14 63,6 %
Splitsko-dalmatinska	80	1 1,2 %	3 3,8 %	76 95,0 %
Zadarska	75	49 65,3 %	26 34,7 %	0 0 %
Istarska	46	15 32,6 %	29 63,1 %	2 4,3 %
Varaždinska	11	3 27,3 %	8 72,7 %	0 0 %
Međimurska	11	1 9,1 %	9 81,8 %	1 9,1 %
Zagrebačka	29	19 65,5 %	9 31,0 %	1 3,5 %
Sisačko-moslavačka	10	4 40,0 %	6 60,0 %	0 0 %
Virovitičko-podravsko	11	1 9,1 %	10 90,9 %	0 0 %
Bjelovarsko-bilogorska	5	1 20,0 %	4 80,0 %	0 0 %
Koprivničko-križevačka	15	8 53,3 %	7 46,7 %	0 0 %
Osječko-baranjska	14	11 78,6 %	3 21,4 %	0 0 %
Brodsko-posavska	12	6 50,0 %	6 50,0 %	0 0 %
Vukovarsko-srijemska	20	9 45,0 %	3 15,0 %	8 40,0 %

Br<sub>žup</sub> (M<sub>spp.</sub>) – ukupna populacija *Monilinia* vrsta u pojedinoj županiji

Br<sub>žup</sub> (M<sub>laxa</sub>, M<sub>fructigena</sub>, M<sub>fructicola</sub>) – broj izolata identificiranih kao *M. laxa*, *M. fructigena* ili *M. fructicola* u pojedinoj županiji

% (M<sub>laxa</sub>, M<sub>fructigena</sub>, M<sub>fructicola</sub>) ŽUP – udio *M. laxa*, *M. fructigena* ili *M. fructicola* u pojedinoj županiji

Vrsta *M. laxa* pokazala se najučestalijom *Monilinia* vrstom u Osječko-baranjskoj županiji, u kojoj zauzima 78,6 % u odnosu na ukupnu *Monilinia* spp. populaciju, dok se najmanje zastupljenom pokazala u Splitsko-dalmatinskoj županiji sa samo 1 % zastupljenosti. *Monilinia fructigena* bila je najučestalija u Virovitičko-podravskoj županiji s 90,9 % učestalosti u odnosu na ukupnu *Monilinia* spp. populaciju, a najmanje je zastupljena također

bila u Splitsko-dalmatinskoj županiji s 3,8 %. Za razliku od *M. laxa* i *M. fructigena*, *M. fructicola* se u odnosu na ukupnu *Monilinia* spp. populaciju može smatrati najučestalijom *Monilinia* vrstom upravo u Splitsko-dalmatinskoj županiji s 95 %-tnom učestalošću. S druge strane, u sklopu ovog istraživanja *M. fructicola* nije bila zastupljena u Zadarskoj, Varaždinskoj, Sisačko-moslavačkoj, Virovitičko-podravskoj, Bjelovarsko-bilogorskoj, Koprivničko-križevačkoj, Osječko-baranjskoj i Brodsko-posavskoj županiji.

#### 4.4.3. Bioraznolikost populacija *Monilinia* vrsta prema godini istraživanja

Kako bi se odredila bioraznolikost istraživanih populacija *Monilinia* vrsta prema pojedinim godinama provođenja istraživanja, izračunat je udio (%) pojedinih *Monilinia* vrsta u odnosu na ukupnu populaciju *Monilinia* vrsta u istraživanju provedenom 2012., 2013. i 2016. godine. Broj pojedinih *Monilinia* vrsta te određivanje udjela (%) pojedine vrste u ukupnoj populaciji *Monilinia* vrsta u Hrvatskoj u 2012., 2013. i 2016. godini prikazan je u Tablici 24.

**Tablica 24.** Broj i udio (%) *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* u odnosu na ukupnu populaciju *Monilinia* vrsta u 2012., 2013. i 2016. godini

Godina	Br <sub>god</sub> (M <sub>spp.</sub> )	Br <sub>god</sub> (M <sub>laxa</sub> ) % (M <sub>laxa</sub> ) GOD	Br <sub>god</sub> (M <sub>fructigena</sub> ) % (M <sub>fructigena</sub> ) GOD	Br <sub>god</sub> (M <sub>fructicola</sub> ) % (M <sub>fructicola</sub> ) GOD
2012.	169	80 47,3 %	70 41,4 %	19 11,3 %
2013.	190	54 28,4%	55 29,0 %	81 42,6 %
2016.	2	0 0 %	0 0 %	2 100,0 %

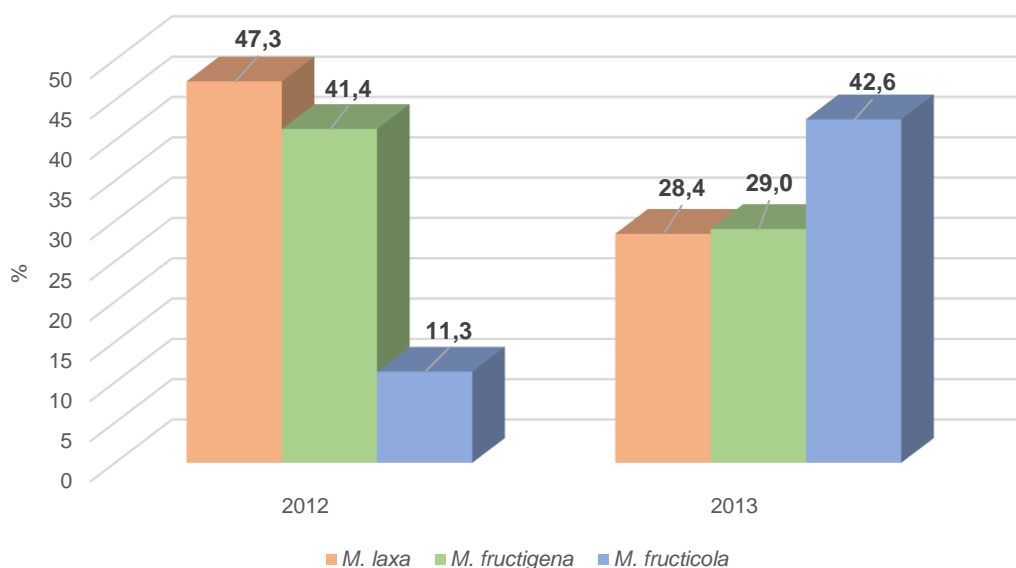
Br<sub>god</sub> (M<sub>spp.</sub>) – ukupna populacija *Monilinia* vrsta u pojedinoj godini

Br<sub>god</sub> (M<sub>laxa</sub>, M<sub>fructigena</sub>, M<sub>fructicola</sub>) – broj izolata identificiranih kao *M. laxa*, *M. fructigena* ili *M. fructicola* u pojedinoj godini

% (M<sub>laxa</sub>, M<sub>fructigena</sub>, M<sub>fructicola</sub>) GOD – udio *M. laxa*, *M. fructigena* ili *M. fructicola* u pojedinoj godini

Bioraznolikost populacija *Monilinia* spp. 2012. i 2013. godine prikazana je i u Grafikonu 4. Kako su 2016. godine prikupljena samo dva izolata (oba *M. fructicola*), bioraznolikost populacija za 2016. godinu nije prikazana grafički.

#### Bioraznolikost populacija *Monilinia* vrsta prema godini istraživanja



**Grafikon 4.** Bioraznolikost populacija *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* u istraživanju 2012. i 2013. godine.

#### 4.4.4. Bioraznolikost populacija *Monilinia* vrsta prema domaćinu

Bioraznolikost populacija *Monilinia* vrsta prema domaćinu s kojeg su izolirane određena je izračunom udjela (%) pojedinih *Monilinia* vrsta u odnosu na ukupnu populaciju *Monilinia* vrsta utvrđenu na breskvi, nektarini i šljivi. Rezultati određivanja udjela (%) te broj pojedinih *Monilinia* vrsta u ukupnoj populaciji *Monilinia* vrsta na breskvi, nektarini i šljivi prikazani su u Tablici 25.

**Tablica 25.** Broj i udio (%) *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* u odnosu na ukupnu populaciju *Monilinia* vrsta na breskvi, nektarini i šljivi

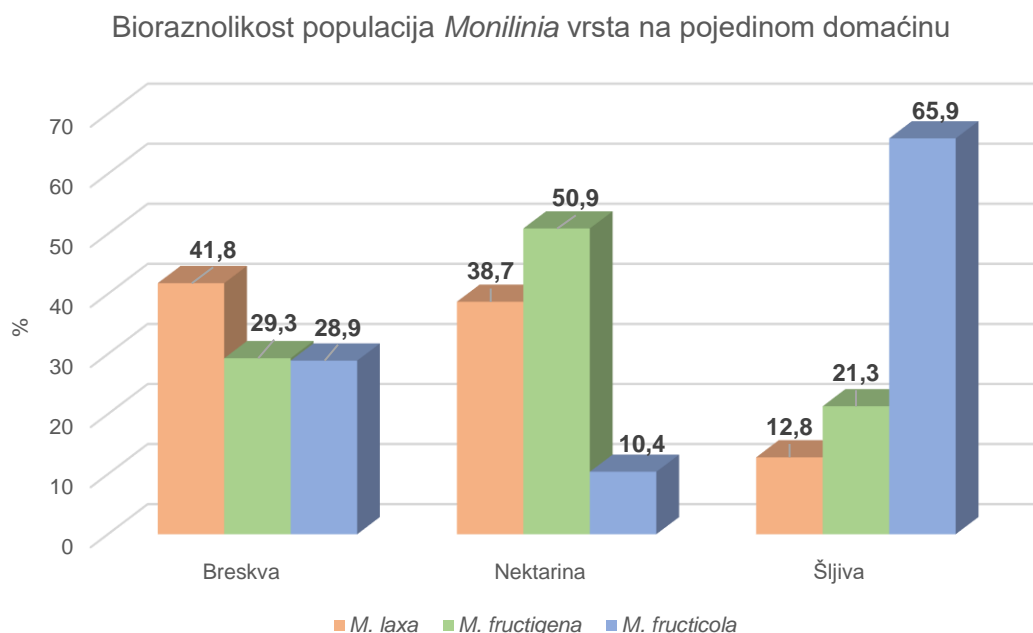
Domaćin	Br <sub>dom</sub> (M <sub>spp.</sub> )	Br <sub>dom</sub> (M <sub>laxa</sub> ) % (M <sub>laxa</sub> ) DOM	Br <sub>dom</sub> (M <sub>fructigena</sub> ) % (M <sub>fructigena</sub> ) DOM	Br <sub>dom</sub> (M <sub>fructicola</sub> ) % (M <sub>fructicola</sub> ) DOM
Breskva	208	87 41,8 %	61 29,3 %	60 28,9 %
Nektarina	106	41 38,7 %	54 50,9 %	11 10,4 %
Šljiva	47	6 12,8 %	10 21,3 %	31 65,9 %

Br<sub>dom</sub> (M<sub>spp.</sub>) – ukupna populacija *Monilinia* vrsta na pojedinom domaćinu

Br<sub>dom</sub> (M<sub>laxa</sub>, M<sub>fructigena</sub>, M<sub>fructicola</sub>) – broj izolata identificiranih kao *M. laxa*, *M. fructigena* ili *M. fructicola* na pojedinom domaćinu

% (M<sub>laxa</sub>, M<sub>fructigena</sub>, M<sub>fructicola</sub>) – udio *M. laxa*, *M. fructigena* ili *M. fructicola* na pojedinom domaćinu

Iz rezultata je vidljivo kako je na plodovima breskve najučestalija *Monilinia* vrsta bila *M. laxa* s 41,8 % zastupljenosti u odnosu na vrste *M. fructigena* i *M. fructicola*. *Monilinia fructigena* pokazala se kao najzastupljenija *Monilinia* vrsta na nektarini s 50,9 % zastupljenosti, dok je na šljivi najzastupljenija bila vrsta *M. fructicola* sa 65,9 %. Udio pojedine *Monilinia* vrste na breskvi, nektarini i šljivi prikazan je u Grafikonu 5.



**Grafikon 5.** Bioraznolikost populacija *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* na breskvi, nektarini i šljivi.

## 4.5. Fenotipska varijabilnost *Monilinia* vrsta u Hrvatskoj

### 4.5.1. Brzina rasta micelija na različitim temperaturama

Na temelju radijalnog porasta kolonije (mm/dan) svakog od 10 izolata *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola*, određena je brzina rasta micelija pri temperaturama od 7,5, 15, 20, 25, 30 i 35 °C. Brzina rasta *Monilinia* spp. izolata prikazana je u Tablici 26, dok je porast svake pojedine kolonije na zadanim temperaturama prikazan i grafički u Prilogu 2.



**Tablica 26.** Brzina rasta micelija izolata *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* (mm/dan) na VA na različitim temperaturama

<b>Izolat</b>	<b>7,5 °C</b>	<b>15 °C</b>	<b>20 °C</b>	<b>25 °C</b>	<b>30 °C</b>	<b>35 °C</b>
<b><i>M. laxa</i></b>						
ZD 139/12	0,110	1,083	2,318	3,597	1,833	0,000
ZD 143/12	0,106	2,422	2,077	0,269	0,599	0,000
ZD 145/12	0,089	0,589	2,758	4,438	0,484	0,000
ZD 149/12	0,067	1,219	3,195	4,367	1,542	0,000
ZD 152/12	0,000	1,068	1,705	1,543	0,521	0,000
ZD 153/12	0,383	1,891	2,375	2,847	1,151	0,000
ZD 155/12	0,306	1,938	3,854	5,201	1,635	0,000
ZG 29/13	0,024	1,156	2,604	4,237	1,260	0,000
VŽ 20/13	0,167	1,198	1,038	3,173	1,516	0,000
BA 27/13	0,126	1,063	3,711	4,649	0,563	0,000
<b>Prosjek po vrsti</b>	<b>0,138</b>	<b>1,363</b>	<b>2,564</b>	<b>3,432</b>	<b>1,110</b>	<b>0,000</b>
<b><i>M. fructigena</i></b>						
BR 71/12	0,000	2,635	3,310	4,282	0,396	0,000
VŽ 19/13	0,595	3,484	2,056	3,431	0,432	0,000
VŽ 21/13	0,549	2,203	3,386	3,709	0,490	0,000
VŽ 22/13	0,316	1,531	1,085	1,122	0,740	0,000
VŽ 23/13	0,292	0,375	1,513	4,059	0,474	0,000
VŽ 25/13	0,281	0,521	0,970	1,419	0,708	0,000
VŽ 26/13	1,437	2,118	3,470	5,653	2,271	0,000
VŽ 27/13	0,061	2,961	0,361	0,974	0,396	0,000
BA 17/13	0,215	0,781	3,206	0,252	0,219	0,000
BA 18/13	0,170	1,911	2,216	1,579	0,500	0,000
<b>Prosjek po vrsti</b>	<b>0,392</b>	<b>1,852</b>	<b>2,157</b>	<b>2,648</b>	<b>0,663</b>	<b>0,000</b>
<b><i>M. fructicola</i></b>						
PL 1/13	1,152	4,161	6,457	4,977	2,182	0,000
NS 30/13	0,476	3,438	5,716	7,205	3,760	0,000
VD 2/13	0,630	3,458	5,203	7,156	4,224	0,000
VD 4/13	0,624	2,771	5,175	6,477	3,776	0,000
ZG 26/13	0,923	3,490	5,505	7,225	1,807	0,000
VŽ 24/13	1,276	3,724	6,389	7,681	3,016	0,000
BA 28/13	0,566	3,021	4,201	4,550	3,698	0,000
PO 129/13	0,716	2,849	5,248	6,590	3,281	0,000
VRG 1/16	1,354	1,679	6,403	6,092	1,979	0,000
VRG 3/16	0,929	1,938	5,638	5,725	1,698	0,000
<b>Prosjek po vrsti</b>	<b>0,865</b>	<b>3,053</b>	<b>5,593</b>	<b>6,368</b>	<b>2,942</b>	<b>0,000</b>

Svi su *Monilinia* spp. izolati, osim jednog izolata *M. laxa* i jednog izolata *M. fructigena* (ZD 152/12 i BR 71/12) uspješno rasli na najnižoj testiranoj temperaturi od 7,5 °C. Nisu utvrđeni inhibitorni učinci na porast micelija svih *Monilinia* spp. izolata kod temperatura od 10, 15, 20, 25 i 30 °C, dok se temperatura od 35 °C pokazala kao inhibitorna za izolate sve tri *Monilinia* vrste. Najviši prosječan porast kolonije vrsta *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* zabilježen je pri temperaturi od 25 °C, dok je najniži prosječan porast kolonije kod sve tri vrste utvrđen kod temperature od 7,5 °C. Iako nije provedena statistička analiza, vidljivo je kako je vrsta *M. fructicola* na svim temperaturama imala najbrži rast, katkad i više nego dvostruko brži od vrsta *M. laxa* i *M. fructigena*. Rast vrsta *M. laxa* i *M. fructigena* na svim temperaturama bio je relativno sličan.

#### 4.5.2. Patogenost na plodovima breskve, nektarine i šljive

Na svim je plodovima breskve, nektarine i šljive došlo do pojave tipičnih simptoma smeđe truleži 2-14 dana nakon inokulacije s *Monilinia* spp. izolatima. Tkivo ploda omekšalo je oko mjesta inokulacije te su se pojavile vodene pjege. Širenjem pjege postali su vidljivi sporodohiji gljive uslijed pojave sporulacije, čime je dokazana patogenost vrsta *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* na plodovima breskve, nektarine i šljive. Na kontrolnim plodovima nije došlo do pojave simptoma smeđe truleži. Obzirom da su svi izolati sa zaraženih plodova breskve, nektarine i šljive uspješno reizolirani na KDA te da su njihova morfološka obilježja bila identična onima u čistoj kulturi, ispunjeni su Kochovi postulati.

Mjerenjem porasta lezije na svim zaraženim plodovima breskve, nektarine i šljive (Slika 23), dobivene su vrijednosti brzine rasta lezije kod izolata *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* (mm/dan).



**Slika 23.** Mjerenje radijalnog porasta lezije izolata VŽ 25/13 (*M. fructigena*) na plodovima breskve (lijevo), nektarine (u sredini) i šljive (desno).

Provedena statistička analiza omogućila je određivanje razlika u patogenosti između izolata unutar vrste *M. laxa*, unutar vrste *M. fructigena* i unutar vrste *M. fructicola* na breskvi, nektarini i šljivi te razlika u patogenosti između vrsta *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* na breskvi, nektarini i šljivi u odnosu na kontrolu.

#### 4.5.2.1. Patogenost na plodovima breskve

Na plodovima breskve nisu utvrđene statistički značajne razlike u patogenosti između izolata unutar vrsta *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* (Tablica 27). Usporedbom patogenosti između vrsta *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* na plodovima breskve utvrđeno je kako se vrsta *M. fructigena* pokazala statistički značajno virulentnijom od vrste *M. fructicola*. S druge strane, patogenost vrste *M. laxa* statistički se nije značajno razlikovala od vrsta *M. fructigena* i *M. fructicola* (Tablica 28).

**Tablica 27.** Prosječan porast lezije na plodovima breskve inokuliranim izolatima *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola*

Izolat	Porijeklo izolata	Prosjek (mm/dan)*
<b><i>M. laxa</i></b>		
ZD 139/12	Breskva	0,726 <sup>a</sup>
ZD 143/12	Breskva	0,777 <sup>a</sup>
ZD 145/12	Breskva	0,620 <sup>a</sup>
ZD 149/12	Breskva	0,754 <sup>a</sup>
ZD 152/12	Nektarina	0,682 <sup>a</sup>
ZD 153/12	Nektarina	0,697 <sup>a</sup>
ZD 155/12	Nektarina	0,613 <sup>a</sup>
ZG 29/13	Breskva	0,706 <sup>a</sup>
VŽ 20/13	Nektarina	0,786 <sup>a</sup>
BA 27/13	Breskva	0,543 <sup>a</sup>
<b><i>M. fructigena</i></b>		
VŽ 19/13	Nektarina	0,840 <sup>a</sup>
VŽ 21/13	Nektarina	0,421 <sup>a</sup>
VŽ 22/13	Nektarina	0,887 <sup>a</sup>
VŽ 23/13	Nektarina	0,809 <sup>a</sup>
VŽ 25/13	Nektarina	0,615 <sup>a</sup>
VŽ 26/13	Nektarina	0,894 <sup>a</sup>
VŽ 27/13	Nektarina	0,916 <sup>a</sup>
BA 17/13	Breskva	0,770 <sup>a</sup>
BA 18/13	Breskva	0,855 <sup>a</sup>
BR 71/12	Nektarina	0,879 <sup>a</sup>
<b><i>M. fructicola</i></b>		
PL 1/13	Breskva	0,580 <sup>a</sup>

Izolati	Porijeklo izolata	Prosjeak (mm/dan)*
NS 30/13	Šljiva	0,589 <sup>a</sup>
VD 2/13	Breskva	0,483 <sup>a</sup>
VD 4/13	Breskva	0,568 <sup>a</sup>
ZG 26/13	Breskva	0,477 <sup>a</sup>
VŽ 24/13	Nektarina	0,499 <sup>a</sup>
BA 28/13	Breskva	0,571 <sup>a</sup>
PO 129/13	Šljiva	0,621 <sup>a</sup>
VRG 1/16	Šljiva	0,912 <sup>a</sup>
VRG 3/16	Šljiva	0,918 <sup>a</sup>

\* transformirane vrijednosti označene istim slovom statistički se značajno ne razlikuju

**Tablica 28.** Prosječan porast lezije *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* na inokuliranim plodovima breskve

Vrsta	Prosjeak (mm/dan)*
<i>M. laxa</i>	0,690 <sup>ab</sup>
<i>M. fructigena</i>	0,789 <sup>b</sup>
<i>M. fructicola</i>	0,622 <sup>a</sup>

\* transformirane vrijednosti označene istim slovom statistički se značajno ne razlikuju

#### 4.5.2.2. Patogenost na plodovima nektarine

Statističkom analizom nisu utvrđene značajne razlike u patogenosti između izolata unutar vrsta *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* na plodovima nektarine (Tablica 29), a statistički značajne razlike nisu utvrđene niti između vrsta *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* (Tablica 30).

**Tablica 29.** Prosječan porast lezije na plodovima nektarine inokuliranim izolatima *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola*

Izolati	Porijeklo izolata	Prosjeak (mm/dan)*
<b><i>M. laxa</i></b>		
ZD 139/12	Breskva	0,809 <sup>a</sup>
ZD 143/12	Breskva	0,798 <sup>a</sup>
ZD 145/12	Breskva	0,693 <sup>a</sup>
ZD 149/12	Breskva	0,640 <sup>a</sup>
ZD 152/12	Nektarina	0,667 <sup>a</sup>
ZD 153/12	Nektarina	0,797 <sup>a</sup>
ZD 155/12	Nektarina	0,663 <sup>a</sup>
ZG 29/13	Breskva	0,789 <sup>a</sup>
VŽ 20/13	Nektarina	0,647 <sup>a</sup>
BA 27/13	Breskva	0,782 <sup>a</sup>

Izolati	Porijeklo izolata	Prosjeak (mm/dan)*
<b><i>M. fructigena</i></b>		
VŽ 19/13	Nektarina	0,902 <sup>a</sup>
VŽ 21/13	Nektarina	0,788 <sup>a</sup>
VŽ 22/13	Nektarina	0,601 <sup>a</sup>
VŽ 23/13	Nektarina	0,674 <sup>a</sup>
VŽ 25/13	Nektarina	0,330 <sup>a</sup>
VŽ 26/13	Nektarina	0,665 <sup>a</sup>
VŽ 27/13	Nektarina	0,727 <sup>a</sup>
BA 17/13	Breskva	0,638 <sup>a</sup>
BA 18/13	Breskva	0,902 <sup>a</sup>
BR 71/12	Nektarina	0,672 <sup>a</sup>
<b><i>M. fructicola</i></b>		
PL 1/13	Breskva	0,793 <sup>a</sup>
NS 30/13	Šljiva	0,762 <sup>a</sup>
VD 2/13	Breskva	0,607 <sup>a</sup>
VD 4/13	Breskva	0,435 <sup>a</sup>
ZG 26/13	Breskva	0,616 <sup>a</sup>
VŽ 24/13	Nektarina	0,429 <sup>a</sup>
BA 28/13	Breskva	0,689 <sup>a</sup>
PO 129/13	Šljiva	0,481 <sup>a</sup>
VRG 1/16	Šljiva	0,891 <sup>a</sup>
VRG 3/16	Šljiva	0,758 <sup>a</sup>

\* transformirane vrijednosti označene istim slovom statistički se značajno ne razlikuju

**Tablica 30.** Prosječan porast lezije *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* na inokuliranim plodovima nektarine

Vrsta	Prosjeak (mm/dan)*
<i>M. laxa</i>	0,729 <sup>a</sup>
<i>M. fructigena</i>	0,690 <sup>a</sup>
<i>M. fructicola</i>	0,646 <sup>a</sup>

\* transformirane vrijednosti označene istim slovom statistički se značajno ne razlikuju

#### 4.5.2.3. Patogenost na plodovima šljive

Između izolata unutar vrste *M. laxa* te između izolata unutar vrste *M. fructigena* utvrđene su statistički značajne razlike u patogenosti na plodovima šljive, dok statistički značajne razlike u patogenosti između izolata nisu utvrđene unutar vrste *M. fructicola* (Tablica 31). Statistički značajne razlike između vrsta *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* nisu utvrđene. (Tablica 32).

**Tablica 31.** Prosječan porast lezije na plodovima šljive inokuliranim izolatima *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola*

Izolat	Porijeklo izolata	Prosjek (mm/dan)*
<b><i>M. laxa</i></b>		
ZD 139/12	Breskva	0,881 <sup>bcd</sup>
ZD 143/12	Breskva	1,074 <sup>d</sup>
ZD 145/12	Breskva	0,745 <sup>bc</sup>
ZD 149/12	Breskva	0,994 <sup>cd</sup>
ZD 152/12	Nektarina	0,719 <sup>b</sup>
ZD 153/12	Nektarina	0,979 <sup>bcd</sup>
ZD 155/12	Nektarina	0,866 <sup>bcd</sup>
ZG 29/13	Breskva	0,962 <sup>bcd</sup>
VŽ 20/13	Nektarina	1,028 <sup>d</sup>
BA 27/13	Breskva	1,002 <sup>cd</sup>
<b><i>M. fructigena</i></b>		
VŽ 19/13	Nektarina	1,009 <sup>cd</sup>
VŽ 21/13	Nektarina	0,508 <sup>a</sup>
VŽ 22/13	Nektarina	0,998 <sup>cd</sup>
VŽ 23/13	Nektarina	0,927 <sup>bcd</sup>
VŽ 25/13	Nektarina	0,932 <sup>bcd</sup>
VŽ 26/13	Nektarina	1,029 <sup>d</sup>
VŽ 27/13	Nektarina	0,938 <sup>bcd</sup>
BA 17/13	Breskva	0,903 <sup>bcd</sup>
BA 18/13	Breskva	0,899 <sup>bcd</sup>
BR 71/12	Nektarina	0,968 <sup>bcd</sup>
<b><i>M. fructicola</i></b>		
PL 1/13	Breskva	0,916 <sup>bcd</sup>
NS 30/13	Šljiva	0,845 <sup>bcd</sup>
VD 2/13	Breskva	0,942 <sup>bcd</sup>
VD 4/13	Breskva	0,950 <sup>bcd</sup>
ZG 26/13	Breskva	0,953 <sup>bcd</sup>
VŽ 24/13	Nektarina	0,886 <sup>bcd</sup>
BA 28/13	Breskva	0,916 <sup>bcd</sup>
PO 129/13	Šljiva	0,901 <sup>bcd</sup>
VRG 1/16	Šljiva	1,027 <sup>d</sup>
VRG 3/16	Šljiva	0,981 <sup>bcd</sup>

\* transformirane vrijednosti označene istim slovom statistički se značajno ne razlikuju

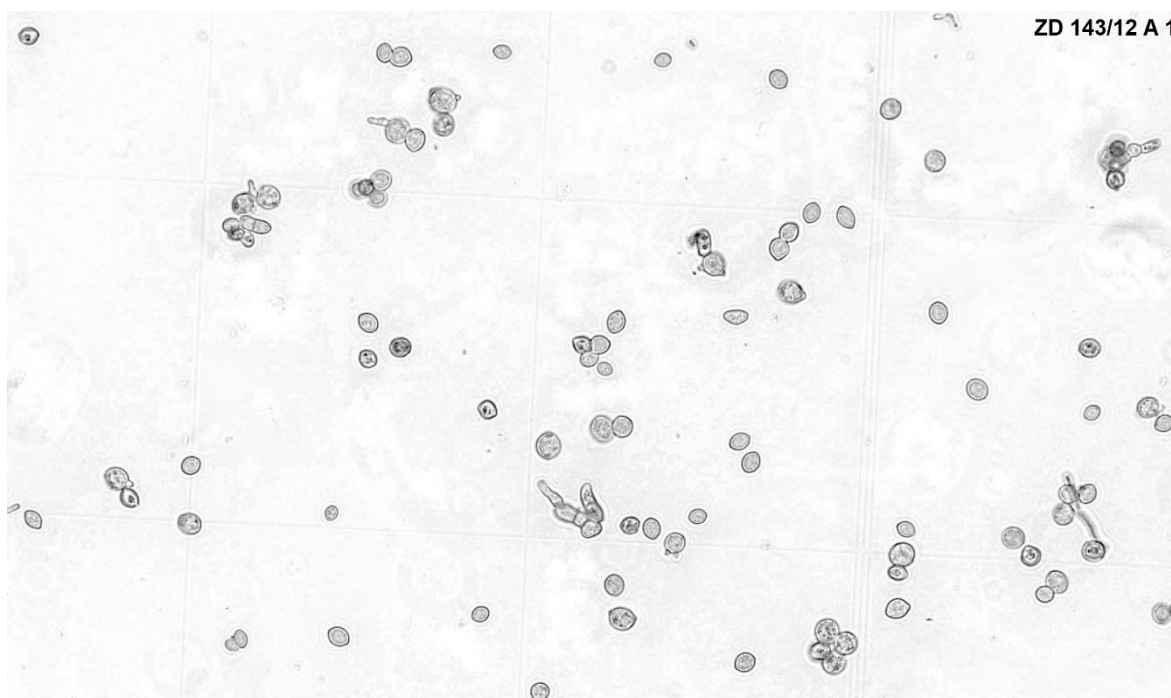
**Tablica 32.** Prosječan porast lezije *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* na inokuliranim plodovima šljive

Vrsta	Prosjek (mm/dan)*
<i>M. laxa</i>	0,925 <sup>a</sup>
<i>M. fructigena</i>	0,911 <sup>a</sup>
<i>M. fructicola</i>	0,932 <sup>a</sup>

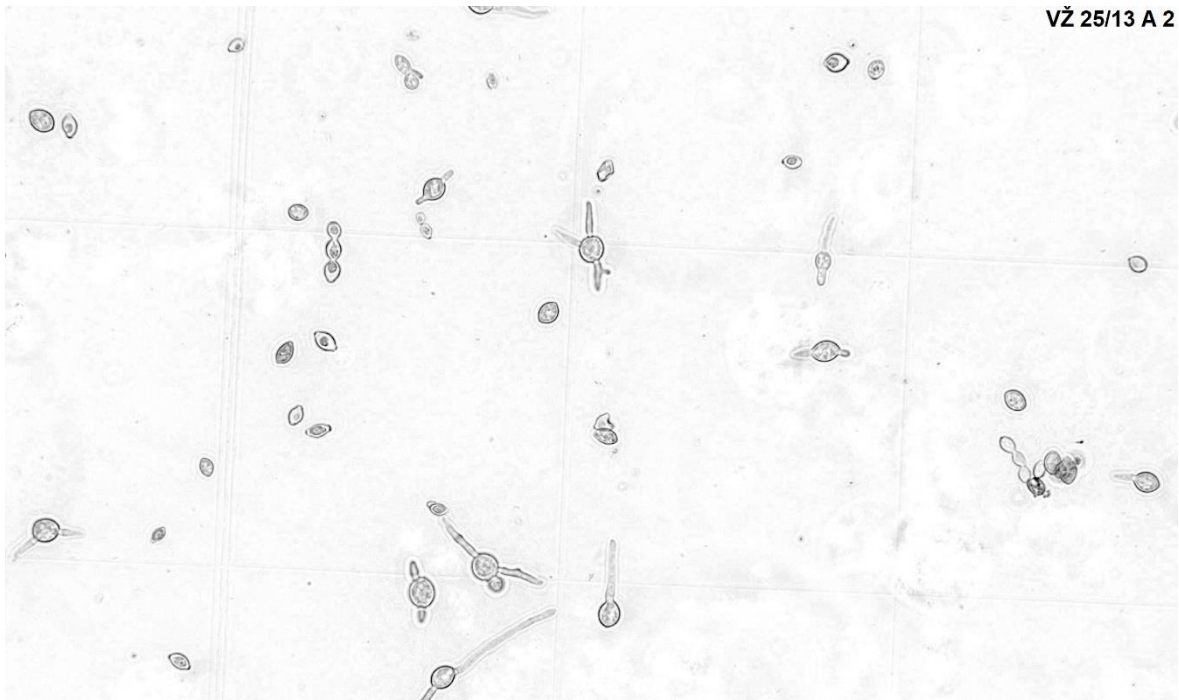
\* transformirane vrijednosti označene istim slovom statistički se značajno ne razlikuju

#### 4.5.3. Sporulacija na plodovima nektarine

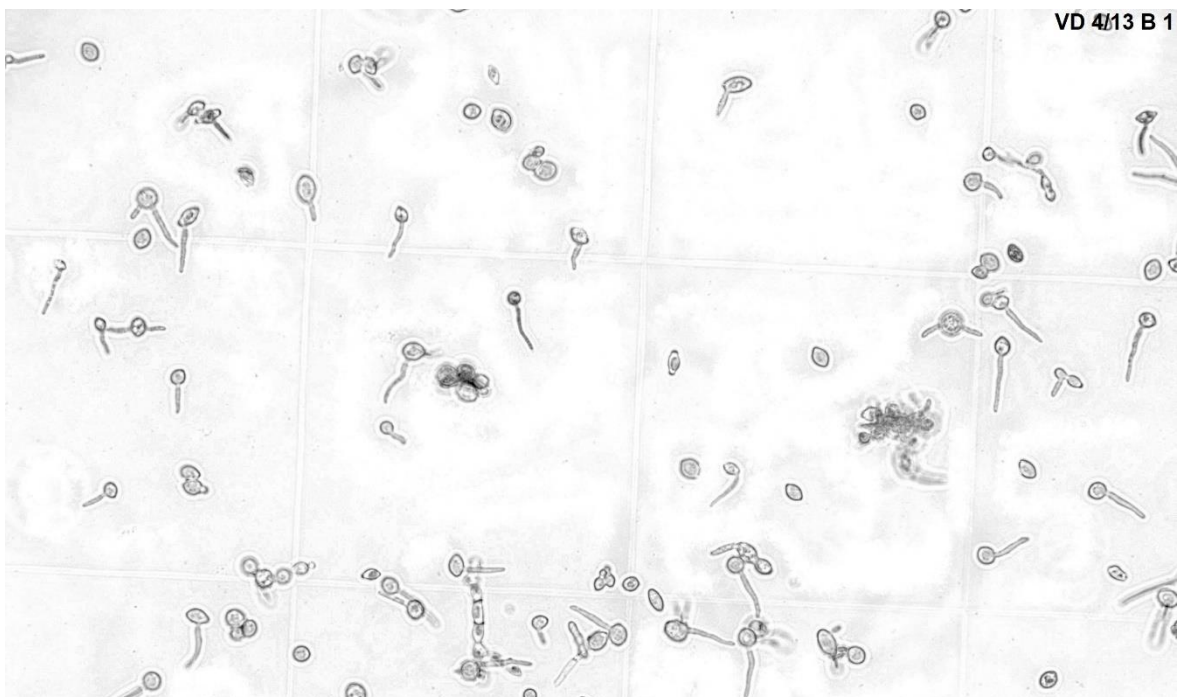
Mikroskopske slike spora izolata *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* na plodovima nektarine prikazane su na Slikama 24, 25 i 26.



**Slika 24.** Mikroskopski prikaz očitavanja broja spora izolata ZD 143/12 (*M. laxa*), prvo ponavljanje (A), prvi isječak (1) na hemocitometru, prilikom određivanja razlika u sporulaciji *Monilinia* vrsta.



**Slika 25.** Mikroskopski prikaz očitavanja broja spora izolata VŽ 25/13 (*M. fructigena*), prvo ponavljanje (A), drugi isječak (2) na hemocitometru, prilikom određivanja razlika u sporulaciji *Monilinia* vrsta.



**Slika 26.** Mikroskopski prikaz očitavanja broja spora izolata VD 4/13 (*M. fructicola*), drugo ponavljanje (B), prvi isječak (1) na hemocitometru, prilikom određivanja razlika u sporulaciji *Monilinia* vrsta.



Nakon izračuna broja spora po površini ploda (mm<sup>2</sup>), provedena statistička obrada podataka s logaritmiranim vrijednostima (log<sub>10</sub>x) (Tablica 33) pokazala je kako se prosječan broj spora po površini ploda između dva izolata unutar vrste *M. laxa* (ZD 143/12 i ZD 145/12) značajno razlikovao. Između izolata unutar vrsta *M. fructigena* i *M. fructicola* nisu utvrđene statistički značajne razlike u sporulaciji. Za vrstu *M. fructicola* utvrđen je najveći prosječni broj spora po površini ploda (mm<sup>2</sup>) te se statistički značajno razlikovao od prosječnog broja spora utvrđenih za vrste *M. laxa* i *M. fructigena* (Tablica 34).

**Tablica 33.** Prosječan broj spora na plodovima nektarine inokuliranim izolatima *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola*

Izolat	Porijeklo izolata	Prosjek (broj spora/mm <sup>2</sup> )*
<b><i>M. laxa</i></b>		
ZD 139/12	Breskva	4,700 <sup>ab</sup>
ZD 143/12	Breskva	6,195 <sup>b</sup>
ZD 145/12	Breskva	3,608 <sup>a</sup>
ZD 149/12	Breskva	5,347 <sup>ab</sup>
ZD 152/12	Nektarina	5,527 <sup>ab</sup>
ZD 153/12	Nektarina	5,007 <sup>ab</sup>
ZD 155/12	Nektarina	5,573 <sup>ab</sup>
ZG 29/13	Breskva	4,472 <sup>ab</sup>
VŽ 20/13	Nektarina	5,058 <sup>ab</sup>
BA 27/13	Breskva	5,128 <sup>ab</sup>
<b><i>M. fructigena</i></b>		
VŽ 19/13	Nektarina	5,022 <sup>ab</sup>
VŽ 21/13	Nektarina	4,055 <sup>ab</sup>
VŽ 22/13	Nektarina	4,989 <sup>ab</sup>
VŽ 23/13	Nektarina	5,252 <sup>ab</sup>
VŽ 25/13	Nektarina	3,980 <sup>ab</sup>
VŽ 26/13	Nektarina	5,185 <sup>ab</sup>
VŽ 27/13	Nektarina	5,346 <sup>ab</sup>
BA 17/13	Breskva	5,150 <sup>ab</sup>
BA 18/13	Breskva	5,448 <sup>ab</sup>
BR 71/12	Nektarina	3,564 <sup>a</sup>
<b><i>M. fructicola</i></b>		
PL 1/13	Breskva	5,505 <sup>ab</sup>
NS 30/13	Šljiva	6,263 <sup>b</sup>
VD 2/13	Breskva	5,695 <sup>ab</sup>
VD 4/13	Breskva	6,120 <sup>b</sup>
ZG 26/13	Breskva	5,359 <sup>ab</sup>
VŽ 24/13	Nektarina	5,560 <sup>ab</sup>
BA 28/13	Breskva	5,368 <sup>ab</sup>

Izolat	Porijeklo izolata	Prosjeak (broj spora/mm <sup>2</sup> )*
PO 129/13	Šljiva	5,771 <sup>ab</sup>
VRG 1/16	Šljiva	5,575 <sup>ab</sup>
VRG 3/16	Šljiva	5,989 <sup>ab</sup>

\* logaritmirane vrijednosti označene istim slovom statistički se značajno ne razlikuju

**Tablica 34.** Prosječan broj spora *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* na inokuliranim plodovima nektarine

Vrsta	Prosjeak (broj spora/mm <sup>2</sup> )*
<i>M. laxa</i>	5,061 <sup>a</sup>
<i>M. fructigena</i>	4,799 <sup>a</sup>
<i>M. fructicola</i>	5,720 <sup>b</sup>

\* logaritmirane vrijednosti označene istim slovom statistički se značajno ne razlikuju

#### 4.5.4. Vijabilnost konidija na plodovima nektarine

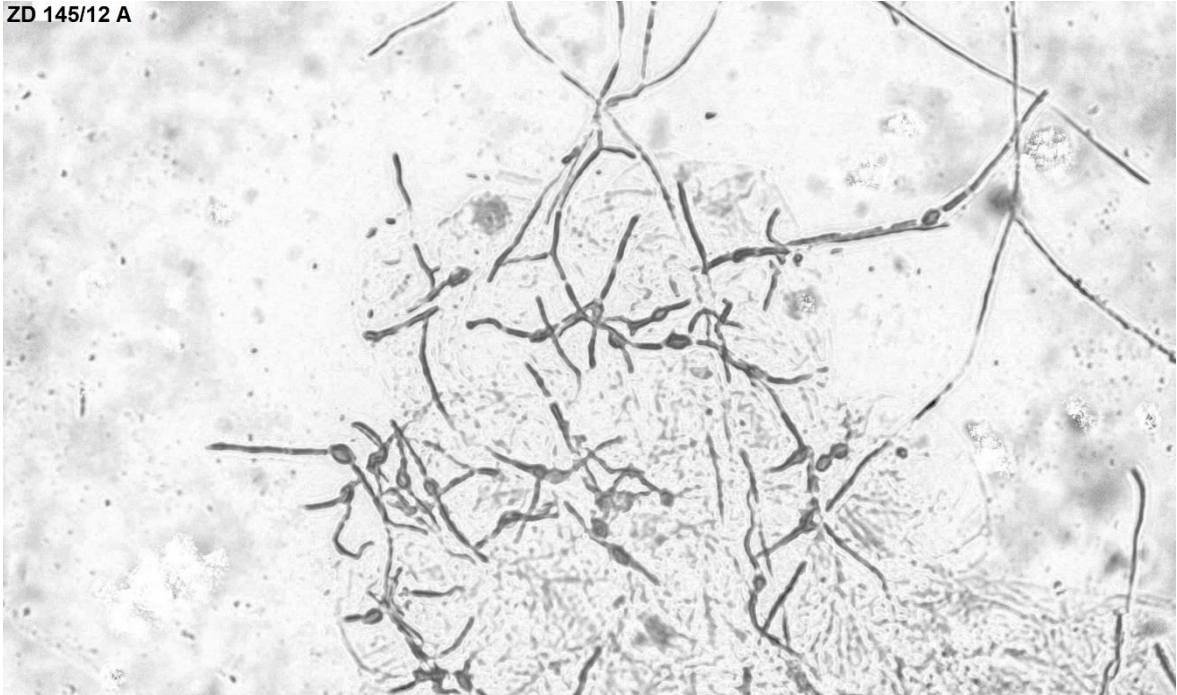
Svi su zaraženi plodovi nektarine nakon devetomjesečne izloženosti vanjskim uvjetima bili mumificirani s vidljivom razvijenom zreloom stromom na površini (Slika 27). Apotecije se nisu razvile na niti jednom mumificiranom plodu.



**Slika 27.** Mumificirani plodovi nektarine nakon devetomjesečne izloženosti vanjskim uvjetima u testu vijabilnosti konidija. S lijeva na desno: plodovi inokulirani s *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola*.

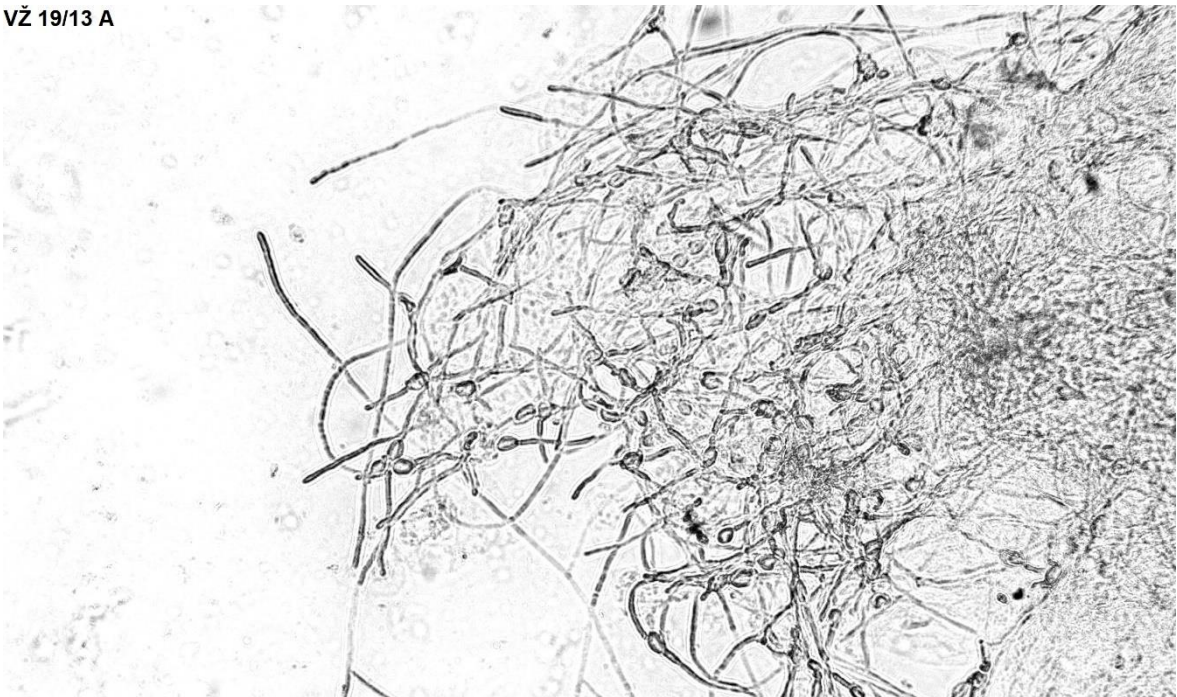
Mikroskopske slike očitavanja vijabilnih i nevijabilnih konidija na hemocitometru prikazane su na Slikama 28 (*M. laxa*), 29 (*M. fructigena*) i 30 (*M. fructicola*).

ZD 145/12 A



**Slika 28.** Mikroskopski prikaz očitavanja vijabilnih i nevijabilnih konidija izolata ZD 145/12 (*M. laxa*) s prezimjelog ploda nektarine, prvo ponavljanje (A).

VŽ 19/13 A



**Slika 29.** Mikroskopski prikaz očitavanja vijabilnih i nevijabilnih konidija izolata VŽ 19/13 (*M. fructigena*) s prezimjelog ploda nektarine, prvo ponavljanje (A).



**Slika 30.** Mikroskopski prikaz očitavanja vijabilnih i nevijabilnih konidija izolata VD 4/13 (*M. fructicola*) s prezimjelog ploda nektarine, drugo ponavljanje (B).

Pregledom suspenzije spora svih izolata na mikroskopu pomoću hemocitometra, vijabilne konidije zabilježene su kod svih izolata vrsta *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola*. Nakon određivanja prosječnog postotka vijabilnosti konidija *Monilinia* spp. izolata, statističkom je analizom utvrđeno kako nema značajnih razlika u vijabilnosti konidija između izolata unutar vrsta *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* (Tablica 35). Za vrstu *M. laxa* utvrđen je statistički značajno viši postotak vijabilnih konidija od vrste *M. fructicola*. S druge strane, postotak vijabilnih konidija vrste *M. fructigena* statistički se nije značajno razlikovao od postotka vijabilnih konidija vrsta *M. laxa* i *M. fructicola*. Prosječan postotak vijabilnih konidija vrsta *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* prikazan je u Tablici 36.

**Tablica 35.** Prosječan postotak vijabilnih konidija na prezimjelim plodovima nektarine inokuliranim izolatima *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola*

Izolat	Porijeklo izolata	Prosjek (%)*
<b><i>M. laxa</i></b>		
ZD 139/12	Breskva	95,350 <sup>a</sup>
ZD 143/12	Breskva	50,670 <sup>a</sup>
ZD 145/12	Breskva	80,000 <sup>a</sup>
ZD 149/12	Breskva	47,100 <sup>a</sup>
ZD 152/12	Nektarina	56,365 <sup>a</sup>
ZD 153/12	Nektarina	53,850 <sup>a</sup>
ZD 155/12	Nektarina	89,475 <sup>a</sup>
ZG 29/13	Breskva	56,985 <sup>a</sup>
VŽ 20/13	Nektarina	82,655 <sup>a</sup>
BA 27/13	Breskva	55,715 <sup>a</sup>
<b><i>M. fructigena</i></b>		
VŽ 19/13	Nektarina	95,455 <sup>a</sup>
VŽ 21/13	Nektarina	55,255 <sup>a</sup>
VŽ 22/13	Nektarina	40,675 <sup>a</sup>
VŽ 23/13	Nektarina	22,460 <sup>a</sup>
VŽ 25/13	Nektarina	52,020 <sup>a</sup>
VŽ 26/13	Nektarina	39,000 <sup>a</sup>
VŽ 27/13	Nektarina	60,940 <sup>a</sup>
BA 17/13	Breskva	33,165 <sup>a</sup>
BA 18/13	Breskva	75,555 <sup>a</sup>
BR 71/12	Nektarina	49,265 <sup>a</sup>
<b><i>M. fructicola</i></b>		
PL 1/13	Breskva	30,335 <sup>a</sup>
NS 30/13	Šljiva	27,690 <sup>a</sup>
VD 2/13	Breskva	46,385 <sup>a</sup>
VD 4/13	Breskva	57,145 <sup>a</sup>
ZG 26/13	Breskva	7,690 <sup>a</sup>
VŽ 24/13	Nektarina	17,885 <sup>a</sup>
BA 28/13	Breskva	26,785 <sup>a</sup>
PO 129/13	Šljiva	23,510 <sup>a</sup>
VRG 1/16	Šljiva	75,000 <sup>a</sup>
VRG 3/16	Šljiva	53,765 <sup>a</sup>

\* vrijednosti označene istim slovom statistički se značajno ne razlikuju

**Tablica 36.** Prosječan postotak vijabilnih konidija *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* na prezimjelim plodovima nektarine

Vrsta	Prosjek (%)*
<i>M. laxa</i>	66,817 <sup>b</sup>
<i>M. fructigena</i>	52,379 <sup>ab</sup>
<i>M. fructicola</i>	36,619 <sup>a</sup>

\* vrijednosti označene istim slovom statistički se značajno ne razlikuju

#### 4.5.5. Osjetljivost na fungicide

##### 4.5.5.1. *In vitro* test rasta micelija na fungicidima

U *in vitro* testu rasta micelija na boskalidu utvrđen je raspon EC<sub>50</sub> vrijednosti *Monilinia* vrsta koji se kretao od 0,008 do 0,430 µg/ml. Kao najosjetljiviji izolat vrste *M. laxa* na boskalid pokazao se izolat ZD 155/12 (EC<sub>50</sub> = 0,028 µg/ml), a kao najmanje osjetljiv izolat ZD 149/12 (EC<sub>50</sub> = 0,145 µg/ml). Izolat vrste *M. fructigena* najosjetljiviji na boskalid bio je izolat BA 17/13 (EC<sub>50</sub> = 0,031 µg/ml), a najmanje osjetljiv izolat VŽ 22/13 (EC<sub>50</sub> = 0,316 µg/ml). Kod vrste *M. fructicola* najosjetljivijim se izolatom pokazao izolat VRG 1/16 (EC<sub>50</sub> = 0,008 µg/ml), a najmanje osjetljivim izolat VD 4/13 (EC<sub>50</sub> = 0,430 µg/ml). Izračunom prosječne EC<sub>50</sub> vrijednosti inhibicije rasta micelija za sve tri *Monilinia* vrste, utvrđeno je kako je vrsta *M. laxa* najosjetljivija na boskalid (EC<sub>50</sub> = 0,060 µg/ml). *Monilinia fructigena* pokazala se kao manje osjetljiva od *M. laxa* (EC<sub>50</sub> = 0,115 µg/ml), dok se najmanje osjetljivom pokazala *M. fructicola*, s prosječnom EC<sub>50</sub> vrijednosti od 0,165 µg/ml.

U testu rasta micelija na fluopiramu, raspon EC<sub>50</sub> vrijednosti *Monilinia* vrsta iznosio je od 0,046 do 0,372 µg/ml. Najosjetljiviji izolat vrste *M. laxa* na fluopiram bio je izolat ZD 145/12 (EC<sub>50</sub> = 0,048 µg/ml), dok su se izolati iste vrste ZD 153/12 i VŽ 20/13 pokazali kao najmanje osjetljivi (EC<sub>50</sub> = 0,126 µg/ml). Najosjetljiviji izolat vrste *M. fructigena* na fluopiram bio je izolat BR 71/12 s EC<sub>50</sub> = 0,046 µg/ml, dok je najmanje osjetljiv izolat iste vrste bio BA 18/13 s EC<sub>50</sub> = 0,186 µg/ml. Izolat *M. fructicola* najosjetljiviji na fluopiram bio je PL 1/13 (EC<sub>50</sub> = 0,162 µg/ml), a najmanje osjetljiv izolat VD 4/13 (EC<sub>50</sub> = 0,372 µg/ml), kao i na boskalidu. Gledajući prosječnu EC<sub>50</sub> vrijednost inhibicije rasta micelija pojedine *Monilinia* vrste, kao i kod boskalida, najosjetljivijom se pokazala vrsta *M. laxa* (EC<sub>50</sub> = 0,085 µg/ml) te je slijede vrsta *M. fructigena* s EC<sub>50</sub> = 0,106 µg/ml i *M. fructicola* s EC<sub>50</sub> = 0,234 µg/ml.

Prosječna EC<sub>50</sub> vrijednost izolata vrste *M. laxa* na fenbukonazol iznosila je 0,006 µg/ml, a vrsta *M. fructigena* i *M. fructicola* 0,005 µg/ml. Raspon EC<sub>50</sub> vrijednosti *Monilinia* vrsta na fenbukonazolu kretao se između 0,001 i 0,020 µg/ml. Gledajući izolate unutar vrste, izolat *M. laxa* ZD 145/12 pokazao se najosjetljivijim na fenbukonazol (EC<sub>50</sub> = 0,002 µg/ml), a izolat

ZD 155/12 kao najmanje osjetljiv ( $EC_{50} = 0,013 \mu\text{g/ml}$ ). Kod vrste *M. fructigena* najosjetljivijima su se pokazali izolati VŽ 19/13 i VŽ 26/13 ( $EC_{50} = 0,001 \mu\text{g/ml}$ ), dok je najmanje osjetljiv izolat iste vrste bio izolat VŽ 27/13 ( $EC_{50} = 0,012 \mu\text{g/ml}$ ). Kod vrste *M. fructicola* čak je pet izolata pokazalo istu reakciju na fenbukonazol s  $EC_{50} = 0,001 \mu\text{g/ml}$  (NS 30/13, ZG 26/13, BA 28/13, VRG 1/16 i VRG 3/16). Najmanje osjetljivim izolatom vrste *M. fructicola* pokazao se izolat VD 4/13 s  $EC_{50} = 0,020 \mu\text{g/ml}$ .

Na difenkonazolu, raspon  $EC_{50}$  vrijednosti *Monilinia* vrsta kretao se između 0,001 i 0,023  $\mu\text{g/ml}$ . Prosječne  $EC_{50}$  vrijednosti za vrstu iznosile su 0,004  $\mu\text{g/ml}$  za *M. laxa*, 0,010  $\mu\text{g/ml}$  za *M. fructigena* i 0,009  $\mu\text{g/ml}$  za *M. fructicola*. Izolat vrste *M. laxa* najosjetljiviji na difenkonazol bio je izolat ZD 145/12 ( $EC_{50} = 0,001 \mu\text{g/ml}$ ), jednako kao i na fenbukonazol, dok su se najmanje osjetljivim izolatima vrste *M. laxa* pokazali izolati ZD 149/12, ZD 153/12 i VŽ 20/13 s  $EC_{50} = 0,006 \mu\text{g/ml}$ . Kod vrste *M. fructigena* najosjetljiviji na difenkonazol bio je izolat BR 71/12 ( $EC_{50} = 0,003 \mu\text{g/ml}$ ), dok se najmanje osjetljivim izolatom iste vrste pokazao izolat VŽ 22/13 ( $EC_{50} = 0,023 \mu\text{g/ml}$ ). Izolat BA 28/13 bio je najosjetljiviji na difenkonazol kod vrste *M. fructicola* ( $EC_{50} = 0,002 \mu\text{g/ml}$ ), dok je najmanje osjetljiv izolat iste vrste bio izolat PL 1/13 ( $EC_{50} = 0,021 \mu\text{g/ml}$ ).

Vrijednosti  $EC_{50}$  za sve testirane izolate *Monilinia* vrsta na tebukonazolu bile su u rasponu od 0,001 do 0,019  $\mu\text{g/ml}$ . Prosječne  $EC_{50}$  vrijednosti iznosile su 0,007  $\mu\text{g/ml}$  za vrstu *M. laxa* i 0,008  $\mu\text{g/ml}$  za vrste *M. fructigena* i *M. fructicola*. Kod vrste *M. laxa*, tebukonazol je pokazao najveće inhibitorno djelovanje na izolat ZG 29/13 ( $EC_{50} = 0,005 \mu\text{g/ml}$ ), a najmanje na izolat VŽ 20/13 s  $EC_{50} = 0,009 \mu\text{g/ml}$ . Izolat VŽ 22/13 bio je najosjetljiviji na tebukonazol ( $EC_{50} = 0,001 \mu\text{g/ml}$ ) unutar populacije vrste *M. fructigena*, a izolat BA 17/13 najmanje osjetljiv ( $EC_{50} = 0,019 \mu\text{g/ml}$ ). Kod vrste *M. fructicola*, najosjetljivijim se pokazao izolat PO 129/13 s  $EC_{50}$  vrijednosti od 0,002  $\mu\text{g/ml}$ , dok je najmanje osjetljiv bio izolat VŽ 24/13, s  $EC_{50}$  vrijednosti od 0,015  $\mu\text{g/ml}$ .

U sklopu istraživanja osjetljivosti *Monilinia* vrsta na fungicide, najveći raspon  $EC_{50}$  vrijednosti *Monilinia* vrsta utvrđen je za tiofanat-metil. Raspon je iznosio od 0,013 do 5,754  $\mu\text{g/ml}$ , a utvrđene su i najveće razlike u osjetljivosti pojedinih *Monilinia* vrsta. Dobivene prosječne  $EC_{50}$  vrijednosti za tiofanat-metil iznosile su 0,164  $\mu\text{g/ml}$  za vrstu *M. laxa* i 0,214  $\mu\text{g/ml}$  za vrstu *M. fructigena*. Prosječna  $EC_{50}$  vrijednost za vrstu *M. fructicola* iznosila je 1,806  $\mu\text{g/ml}$ . Najosjetljiviji izolati vrsta *M. laxa* i *M. fructigena* bili su izolati ZD 152/12 ( $EC_{50} = 0,016 \mu\text{g/ml}$ ) i VŽ 27/13 ( $EC_{50} = 0,013 \mu\text{g/ml}$ ), a najmanje osjetljivi izolati ZD 149/12 ( $EC_{50} = 0,457 \mu\text{g/ml}$ ) i VŽ 19/13 ( $EC_{50} = 0,427 \mu\text{g/ml}$ ). Kod vrste *M. fructicola*, izolat VRG 3/16 pokazao se kao najosjetljiviji na tiofanat-metil ( $EC_{50} = 0,229 \mu\text{g/ml}$ ), dok je najmanju osjetljivost pokazao izolat NS 30/13 s  $EC_{50}$  vrijednosti od čak 5,754  $\mu\text{g/ml}$ .

Raspon  $EC_{50}$  vrijednosti *Monilinia* vrsta na fenheksamid kretao se između 0,013 i 0,631  $\mu\text{g/ml}$ . Prosječna  $EC_{50}$  vrijednost za vrstu *M. laxa* iznosila je 0,229  $\mu\text{g/ml}$ , za vrstu *M. fructigena* 0,391  $\mu\text{g/ml}$ , a za vrstu *M. fructicola* 0,256  $\mu\text{g/ml}$ . Unutar svake pojedine vrste, fenheksamid je pokazao najveći inhibitorni učinak na rast micelija izolata ZD 139/12 ( $EC_{50} = 0,081 \mu\text{g/ml}$ ) kod vrste *M. laxa*, izolata VŽ 23/13 ( $EC_{50} = 0,195 \mu\text{g/ml}$ ) kod vrste *M. fructigena* te izolata VRG 3/16 ( $EC_{50} = 0,013 \mu\text{g/ml}$ ) kod vrste *M. fructicola*. Fenheksamid je unutar svake vrste najslabiji učinak pokazao na izolate vrste *M. laxa* ZG 29/13 ( $EC_{50} = 0,380 \mu\text{g/ml}$ ), vrste *M. fructigena* VŽ 19/13 ( $EC_{50} = 0,631 \mu\text{g/ml}$ ) i vrste *M. fructicola* PO 129/13 ( $EC_{50} = 0,468 \mu\text{g/ml}$ ).

Sve utvrđene srednje učinkovite koncentracije ( $EC_{50}$ ) *Monilinia* vrsta u *in vitro* testu rasta micelija prikazane su u Tablici 37.



**Tablica 37.** Srednje učinkovite koncentracije (EC<sub>50</sub>) *Monilinia* vrsta u *in vitro* testu rasta micelija na fungicidima (µg/ml)

Izolat	Boskalid	Fluopiram	Fenbukonazol	Difenkonazol	Tebukonazol	Tiofanat-metil	Fenheksamid
<i>M. laxa</i>							
ZD 139/12	0,055	0,091	0,005	0,002	0,008	0,209	0,081
ZD 143/12	0,046	0,102	0,009	0,005	0,007	0,030	0,209
ZD 145/12	0,046	0,048	0,002	0,001	0,008	0,148	0,191
ZD 149/12	0,145	0,053	0,003	0,006	0,007	0,457	0,282
ZD 152/12	0,031	0,076	0,011	0,003	0,008	0,016	0,257
ZD 153/12	0,036	0,126	0,003	0,006	0,008	0,245	0,138
ZD 155/12	0,028	0,069	0,013	0,002	0,006	0,132	0,234
ZG 29/13	0,079	0,107	0,005	0,002	0,005	0,112	0,380
VŽ 20/13	0,096	0,126	0,003	0,006	0,009	0,129	0,240
BA 27/13	0,042	0,050	0,010	0,003	0,007	0,166	0,275
<b>Prosjeck po vrsti</b>	<b>0,060</b>	<b>0,085</b>	<b>0,006</b>	<b>0,004</b>	<b>0,007</b>	<b>0,164</b>	<b>0,229</b>
<i>M. fructigena</i>							
VŽ 19/13	0,069	0,071	0,001	0,006	0,005	0,427	0,631
VŽ 21/13	0,126	0,079	0,003	0,004	0,014	0,028	0,355
VŽ 22/13	0,316	0,063	0,005	0,023	0,001	0,372	0,263
VŽ 23/13	0,219	0,145	0,003	0,009	0,009	0,363	0,195
VŽ 25/13	0,074	0,138	0,007	0,011	0,009	0,219	0,275
VŽ 26/13	0,049	0,062	0,001	0,008	0,002	0,015	0,339
VŽ 27/13	0,041	0,170	0,012	0,016	0,004	0,013	0,347
BA 17/13	0,031	0,096	0,006	0,014	0,019	0,046	0,575
BA 18/13	0,166	0,186	0,010	0,004	0,008	0,316	0,513
BR 71/12	0,063	0,046	0,002	0,003	0,005	0,339	0,417
<b>Prosjeck po vrsti</b>	<b>0,115</b>	<b>0,106</b>	<b>0,005</b>	<b>0,010</b>	<b>0,008</b>	<b>0,214</b>	<b>0,391</b>
<i>M. fructicola</i>							
PL 1/13	0,107	0,162	0,010	0,021	0,005	0,417	0,288
NS 30/13	0,331	0,246	0,001	0,005	0,009	5,754	0,186
VD 2/13	0,078	0,269	0,010	0,006	0,009	1,349	0,309
VD 4/13	0,430	0,372	0,020	0,014	0,008	2,570	0,347
ZG 26/13	0,049	0,324	0,001	0,005	0,007	3,631	0,282
VŽ 24/13	0,166	0,195	0,008	0,019	0,015	0,646	0,302
BA 28/13	0,240	0,240	0,001	0,002	0,007	0,759	0,191
PO 129/13	0,224	0,178	0,002	0,005	0,002	2,399	0,468
VRG 1/16	0,008	0,170	0,001	0,010	0,009	0,302	0,174
VRG 3/16	0,017	0,182	0,001	0,003	0,005	0,229	0,013
<b>Prosjeck po vrsti</b>	<b>0,165</b>	<b>0,234</b>	<b>0,005</b>	<b>0,009</b>	<b>0,008</b>	<b>1,806</b>	<b>0,256</b>

#### 4.5.5.2. *In vitro* test rasta kličnih cijevi na fungicidima

Raspon  $EC_{50}$  vrijednosti *Monilinia* vrsta na boskalidu iznosio je od 0,0003 do 0,162  $\mu\text{g/ml}$ . Najosjetljiviji izolat vrste *M. laxa* bio je izolat VŽ 20/13 s  $EC_{50} = 0,0003 \mu\text{g/ml}$ , dok se kao najmanje osjetljiv izolat iste vrste pokazao izolat ZD 153/12 s  $EC_{50} = 0,091 \mu\text{g/ml}$ . Kod vrste *M. fructigena*, za izolat VŽ 21/13 utvrđena je najniža  $EC_{50}$  vrijednost (0,002  $\mu\text{g/ml}$ ), a za izolat BA 17/13 najviša (0,162  $\mu\text{g/ml}$ ). Kod vrste *M. fructicola*, najosjetljivijim se pokazao izolat PL 1/13 s  $EC_{50} = 0,0003 \mu\text{g/ml}$ , dok je izolat NS 30/13 pokazao najmanju osjetljivost ( $EC_{50} = 0,004 \mu\text{g/ml}$ ). Za tri izolata vrste *M. laxa* (ZD 139/12, ZD 143/12 i ZD 152/12), jedan izolat vrste *M. fructigena* (VŽ 19/13) i pet izolata vrste *M. fructicola* nije bilo moguće utvrditi točnu  $EC_{50}$  vrijednost jer je najniži postotak inhibicije rasta kličnih cijevi iznosio  $> 80 \%$ . Iz tog je razloga određena  $EC_{50}$  vrijednost niža od najniže testirane koncentracije, odnosno  $< 0,030 \mu\text{g/ml}$ . Prema tome je određena prosječna  $EC_{50}$  vrijednost za pojedinu *Monilinia* vrstu koja je iznosila  $< 0,023 \mu\text{g/ml}$  za vrstu *M. laxa*,  $< 0,040 \mu\text{g/ml}$  za vrstu *M. fructigena* i  $< 0,016 \mu\text{g/ml}$  za vrstu *M. fructicola*.

Na fluopiramu, raspon  $EC_{50}$  vrijednosti *Monilinia* vrsta kretao se od 0,0002 do 0,933  $\mu\text{g/ml}$ . Za vrstu *M. fructigena* utvrđena je prosječna  $EC_{50}$  vrijednost od 0,292  $\mu\text{g/ml}$ . Obzirom da je kod jednog izolata vrste *M. laxa* (ZD 155/12) i jednog izolata vrste *M. fructicola* (NS 30/13) najniži postotak inhibicije rasta kličnih cijevi iznosio  $> 80 \%$ , nije bilo moguće utvrditi točnu  $EC_{50}$  vrijednost, već samo  $EC_{50}$  vrijednost nižu od najniže testirane koncentracije ( $< 0,100 \mu\text{g/ml}$ ). Iz tog su razloga prosječne  $EC_{50}$  vrijednosti iznosile  $< 0,092 \mu\text{g/ml}$  za vrstu *M. laxa* te  $< 0,045 \mu\text{g/ml}$  za vrstu *M. fructicola*. Izolat vrste *M. laxa* najosjetljiviji na fluopiram bio je izolat BA 27/13 ( $EC_{50} = 0,018 \mu\text{g/ml}$ ), dok je najmanje osjetljiv izolat iste vrste bio ZD 153/12 ( $EC_{50} = 0,479 \mu\text{g/ml}$ ). Kod vrste *M. fructigena*, izolat VŽ 19/13 pokazao se kao najosjetljiviji ( $EC_{50} = 0,0004 \mu\text{g/ml}$ ), a izolat BA 17/13 kao najmanje osjetljiv ( $EC_{50} = 0,933 \mu\text{g/ml}$ ). Kod vrste *M. fructicola*, najosjetljiviji izolat bio je VD 2/13 ( $EC_{50} = 0,0002 \mu\text{g/ml}$ ), a najmanje osjetljiv izolat VRG 3/16 ( $EC_{50} = 0,105 \mu\text{g/ml}$ ).

Na fludioksonilu također nije bilo moguće utvrditi točnu  $EC_{50}$  vrijednost za jedan izolat vrste *M. laxa* (ZD 139/12) i jedan izolat vrste *M. fructicola* (VŽ 24/13) jer je najniži postotak inhibicije rasta kličnih cijevi iznosio  $> 80 \%$ . Određena je  $EC_{50}$  vrijednost kao niža od 0,003  $\mu\text{g/ml}$ . Tako je prosječna  $EC_{50}$  vrijednost za vrstu *M. laxa* iznosila  $< 0,004 \mu\text{g/ml}$ , a za vrstu *M. fructicola*  $< 0,002 \mu\text{g/ml}$ . Prosječna  $EC_{50}$  vrijednost za vrstu *M. fructigena* iznosila je 0,009  $\mu\text{g/ml}$ . Utvrđen je raspon  $EC_{50}$  vrijednosti *Monilinia* vrsta od 0,00001 do 0,027  $\mu\text{g/ml}$ . S  $EC_{50}$  vrijednosti od 0,00001  $\mu\text{g/ml}$ , izolat vrste *M. laxa* ZD 152/12 pokazao se kao najosjetljiviji, dok je za izolat *M. laxa* ZG 29/13 zabilježena najmanja osjetljivost ( $EC_{50} = 0,027 \mu\text{g/ml}$ ). Izolati vrste *M. fructigena* VŽ 25/13, VŽ 27/13 i BR 71/12 pokazali su se kao

najosjetljiviji ( $EC_{50} = 0,001 \mu\text{g/ml}$ ), a izolat BA 17/13 kao najmanje osjetljiv ( $EC_{50} = 0,021 \mu\text{g/ml}$ ). Kod vrste *M. fructicola*, za izolat BA 28/13 utvrđeno je da je najosjetljiviji ( $EC_{50} = 0,0001 \mu\text{g/ml}$ ), a za ZG 26/13 da je najmanje osjetljiv ( $EC_{50} = 0,005 \mu\text{g/ml}$ ).

Raspon  $EC_{50}$  vrijednosti *Monilinia* vrsta na trifloksistrobinu kretao se od 0,00004 do 0,031  $\mu\text{g/ml}$ . Prosječna  $EC_{50}$  vrijednost za vrstu *M. laxa* iznosila je 0,001  $\mu\text{g/ml}$ , dok je kod vrste *M. fructigena* ona bila deset puta viša (0,01  $\mu\text{g/ml}$ ). Kako je kod jednog izolata vrste *M. fructicola* (BA 28/13) najniži postotak inhibicije rasta kličnih cijevi iznosio > 80 %, nije bilo moguće utvrditi točnu  $EC_{50}$  vrijednost, već je ona izražena kao niža od 0,0001  $\mu\text{g/ml}$ , uslijed čega je i prosječna  $EC_{50}$  vrijednost za *M. fructicola* iznosila < 0,003  $\mu\text{g/ml}$ . Promatrajući izolate unutar iste *Monilinia* vrste, utvrđeno je kako je kod vrste *M. laxa* najosjetljiviji bio izolat ZD 143/12 ( $EC_{50} = 0,00004 \mu\text{g/ml}$ ), a najmanje osjetljiv izolat ZD 153/12 ( $EC_{50} = 0,005 \mu\text{g/ml}$ ). Kod vrste *M. fructigena*, najosjetljivijim se pokazao izolat VŽ 25/13 ( $EC_{50} = 0,0002 \mu\text{g/ml}$ ), dok je izolat VŽ 26/13 bio najmanje osjetljiv ( $EC_{50} = 0,031 \mu\text{g/ml}$ ). S  $EC_{50}$  vrijednosti od 0,00006  $\mu\text{g/ml}$ , izolat vrste *M. fructicola* VD 4/13 bio je najosjetljiviji, a izolat VRG 3/16 najmanje osjetljiv (0,013  $\mu\text{g/ml}$ ) unutar te vrste.

Na piraklostrobinu je raspon  $EC_{50}$  vrijednosti *Monilinia* vrsta iznosio od 0,000004 do 0,027  $\mu\text{g/ml}$ . Spomenuta najniža  $EC_{50}$  vrijednost utvrđena je kod izolata vrste *M. laxa* ZD 143/12, dok je najviša  $EC_{50}$  vrijednost kod iste vrste iznosila 0,003  $\mu\text{g/ml}$  za izolat ZD 153/12. Kod vrsta *M. fructigena* i *M. fructicola* najosjetljiviji izolati bili su VŽ 25/12 i VŽ 24/13 ( $EC_{50} = 0,0002 \mu\text{g/ml}$ ), a najmanje osjetljivi izolati VŽ 22/13 ( $EC_{50} = 0,027 \mu\text{g/ml}$ ) i PL 1/13 ( $EC_{50} = 0,005 \mu\text{g/ml}$ ). Prosječne  $EC_{50}$  vrijednosti za vrste *M. laxa* i *M. fructicola* iznosile su 0,001  $\mu\text{g/ml}$ , a za vrstu *M. fructigena* 0,004  $\mu\text{g/ml}$ .

Sve utvrđene srednje učinkovite koncentracije ( $EC_{50}$ ) i 90 % učinkovite koncentracije ( $EC_{90}$ ) *Monilinia* vrsta u *in vitro* testu rasta kličnih cijevi prikazane su u Tablici 38.

**Tablica 38.** Srednje (EC<sub>50</sub>) i 90 % učinkovite (EC<sub>90</sub>) koncentracije *Monilinia* vrsta u *in vitro* testu rasta kličnih cijevi na fungicidima (µg/ml)

Izolat	Boskalid	Fluopiram	Fludioksonil	Trifloksistrobin	Piraklostrobin
<b><i>M. laxa</i></b>					
ZD 139/12	< 0,030 (0,051)*	0,118	< 0,003 (0,008)*	0,0008	0,0005
ZD 143/12	< 0,030 (0,003)*	0,047	0,00007	0,00004	0,000004
ZD 145/12	0,030	0,022	0,0002	0,0006	0,0014
ZD 149/12	0,007	0,021	0,0002	0,00006	0,00001
ZD 152/12	< 0,030 (0,027)*	0,037	0,00001	0,0001	0,0004
ZD 153/12	0,091	0,479	0,005	0,005	0,003
ZD 155/12	0,002	< 0,100 (0,023)*	0,0001	0,0003	0,0006
ZG 29/13	0,006	0,052	0,027	0,0006	0,0011
VŽ 20/13	0,0003	0,024	0,0006	0,0004	0,002
BA 27/13	0,0004	0,018	0,0007	0,00005	0,0007
<b>Prosjeck po vrsti</b>	<b>&lt; 0,023</b>	<b>&lt; 0,092</b>	<b>&lt; 0,004</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>
<b><i>M. fructigena</i></b>					
VŽ 19/13	< 0,030 (0,069)*	0,0004	0,010	0,011	0,002
VŽ 21/13	0,002	0,001	0,010	0,024	0,0005
VŽ 22/13	0,013	0,363	0,016	0,003	0,027
VŽ 23/13	0,020	0,603	0,019	0,006	0,0004
VŽ 25/13	0,043	0,015	0,001	0,0002	0,0002
VŽ 26/13	0,068	0,646	0,010	0,031	0,0004
VŽ 27/13	0,050	0,045	0,001	0,007	0,003
BA 17/13	0,162	0,933	0,021	0,003	0,002
BA 18/13	0,004	0,195	0,002	0,008	0,004
BR 71/12	0,011	0,120	0,001	0,006	0,001
<b>Prosjeck po vrsti</b>	<b>&lt; 0,040</b>	<b>0,292</b>	<b>0,009</b>	<b>0,010</b>	<b>0,004</b>
<b><i>M. fructicola</i></b>					
PL 1/13	0,0003	0,031	0,002	0,002	0,005
NS 30/13	0,004	< 0,100 (0,813)*	0,001	0,003	0,002
VD 2/13	< 0,030 (0,056)*	0,0002	0,004	0,003	0,0003
VD 4/13	< 0,030 (0,066)*	0,087	0,001	0,00006	0,002
ZG 26/13	0,002	0,016	0,005	0,0009	0,0009
VŽ 24/13	< 0,030 (0,126)*	0,011	< 0,003 (0,009)*	0,0003	0,0002
BA 28/13	< 0,030 (0,062)*	0,001	0,0001	< 0,0001 (0,005)*	0,0007
PO 129/13	0,001	0,018	0,002	0,002	0,0005
VRG 1/16	< 0,030 (0,191)*	0,085	0,002	0,0007	0,002
VRG 3/16	0,002	0,105	0,004	0,013	0,001
<b>Prosjeck po vrsti</b>	<b>&lt; 0,016</b>	<b>&lt; 0,045</b>	<b>&lt; 0,002</b>	<b>&lt; 0,003</b>	<b>0,001</b>

## 5. RASPRAVA

### 5.1. Identifikacija *Monilinia* vrsta i nalaz vrste *M. fructicola* u Hrvatskoj

U sklopu ovog je istraživanja po prvi puta utvrđena prisutnost vrste *M. fructicola* na koštičavom voću u Hrvatskoj. Identificirana je na zaraženim plodovima breskve i nektarine sakupljenima 2012. godine, dok je 2013. nađena i na šljivi. Potvrda prisutnosti vrste *M. fructicola* u Hrvatskoj nije neočekivana, obzirom da je prije ovog nalaza utvrđena i u mnogim drugim europskim zemljama (EPPO, 2002; Bosshard i sur., 2006; Petróczy i Palkovics, 2006; De Cal i sur., 2009a; Pellegrino i sur., 2009; EPPO, 2010; Munda i Viršček Marn, 2010). Iako je do 2014. godine *M. fructicola* imala status karantenskog štetnog organizma (Europska unija, 2000), očito je kako administrativne mjere zaštite nisu bile dovoljno učinkovite kako bi spriječile njen prodor u Europu. Kako je posljednjih dvadesetak godina Republika Hrvatska pod sve većim utjecajem globalnog tržišta biljem i biljnim materijalom, moguće je pretpostaviti kako je *M. fructicola* u Europu i Hrvatsku ušla zaraženim sadnim materijalom ili zaraženim plodovima. Sadni materijal i svježe plodove voćnih vrsta, osjetljive na zarazu s *M. fructicola*, EFSA identificira kao najvjerojatnije puteve ulaska i širenja ovog patogena u Europi (EFSA, 2011). Još prije prvog nalaska *M. fructicola* u EU, Van Leeuwen i sur. (2001) ističu kako će upravo zaraženi sadni materijal biti najizglednije sredstvo ulaska tog patogena u Europu, obzirom na mogućnost njenog parazitiranja u izbojcima bez vidljivih simptoma. Tako se istraživanjima genetske varijabilnosti unutar populacija vrste *M. fructicola* nastoji utvrditi je li ona u Europu introducirana relativno nedavno ili je na europskom kontinentu prisutna već duže razdoblje, ali bez da je na vrijeme identificirana. Rezultati takvih istraživanja poprilično se razlikuju od zemlje do zemlje te ovise o lokaciji, ali i o samoj populaciji *Monilinia* vrsta na određenom području. Tako Villarino i sur. (2012b) nalaze kako je između izolata *M. fructicola* iz Francuske i Španjolske utvrđena manja genetska različitost u usporedbi s izolatima iz Kalifornije, Urugvaja i Novog Zelanda, zemljama u kojima je ona već udomaćena vrsta. Takvi rezultati ukazuju kako od ulaska patogena u te europske zemlje do prvih službenih nalaza (EPPO, 2002; De Cal i sur., 2009a) nije prošlo mnogo vremena. Naime, pretpostavlja se kako bi genetska varijabilnost vrsta koje su na nekom području dugo prisutne i već udomaćene trebala biti veća u usporedbi s varijabilnošću novih vrsta (Villarino i sur., 2012b). Međutim, nekoliko godina kasnije, De Cal i sur. (2014) opažaju veću genetsku varijabilnost unutar populacije *M. fructicola* u Španjolskoj, a slične rezultate navode Jänsch i sur. (2012) u Švicarskoj te Papavasileiou i sur. (2015b) u Grčkoj. Upravo zbog visoke genetske različitosti utvrđene unutar vrste *M. fructicola*, navedena istraživanja ukazuju kako je *M. fructicola* u Europi ipak prisutna duže nego se prvotno smatralo ukazuje, iako je u usporedbi s populacijama iz SAD-

a genetska različitost europskih populacija *M. fructicola* niska (Jänsch i sur., 2012). Isti autori unutar europskih populacija *M. fructicola* nalaze 12 različitih haplotipova, od čega dva identična haplotipu s istočne obale SAD-a, a jedan sa zapadne (Jänsch i sur., 2012). Takav iznenađujuće visok broj različitih haplotipova *M. fructicola* u Europi koincidira s pretpostavkom kako je ona u Europi bila prisutna i prije prvog službenog nalaza u Francuskoj (EPPO, 2002). Jednako tako, moguće je kako je *M. fructicola* i u Hrvatskoj prisutna već duži niz godina, ali se sa sustavnim istraživanjem njene prisutnosti krenulo tek 2012. godine kada je započeo službeni nadzor.

U sklopu ovog je istraživanja utvrđeno kako je od ukupno 361 izolata identificiranog kao *Monilinia* spp., čak 38 % prema nekom od obilježja sinoptičkog ključa (Lane, 2002) bilo atipično. Varijabilnost morfologije u kulturama uzgajanima *in vitro* općenito je poznata kod gljiva, pri čemu *Monilinia* vrste nisu izuzetak (Byrde i Willetts, 1977; Lane, 2002). Ovako visoki broj atipičnih izolata potvrdio je kako identifikacija *Monilinia* vrsta na temelju morfoloških obilježja u čistoj kulturi nije pouzdana metoda determinacije do razine vrste, o čemu govore i mnogi drugi autori (Penrose i sur., 1976; Byrde i Willetts, 1977; Harada, 1977; Batra, 1979; Wilcox, 1989; Ma i Michailides, 2007; Petróczy i sur., 2012; Hrustić i sur., 2015). Morfološka obilježja tipična za vrste *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* vrlo često izostanu kod jedne vrste, dok kod druge mogu biti prisutna, što je potvrđeno i ovim istraživanjem. Na temelju analize morfologije *Monilinia* vrsta u Hrvatskoj, najmanja morfološka varijabilnost u odnosu na sinoptički ključ (Lane, 2002) utvrđena je kod izolata vrste *M. fructicola*. Visoka zastupljenost izolata *M. fructicola* koji su prema svim morfološkim obilježjima odgovarali sinoptičkom ključu (Lane, 2002) ukazuje na mogućnost relativno pouzdane identifikacije hrvatskih izolata sukladno morfologiji. Promatranjem morfoloških obilježja *Monilinia* izolata iz Hrvatske, najveća odstupanja od sinoptičkog ključa (Lane, 2002) zabilježena su kod vrste *M. laxa*. Naime, najčešći morfološki profil utvrđen kod vrsta *M. fructigena* i *M. fructicola* (Gena-HR i Cola-HR) u potpunosti odgovara tipičnim morfološkim obilježjima identifikacijskog ključa (Lane, 2002). Međutim, kod velikog broja izolata vrste *M. laxa* iz Hrvatske nije utvrđena pojava crnih ili smeđih režnjeva na kolonijama (svojstvo Q). Izostanak tog svojstva predstavlja sastavni dio najčešćeg morfološkog profila vrste *M. laxa* u Hrvatskoj (Laxa-HR), koji se upravo prema tom morfološkom obilježju razlikuje od onog tipičnog prema identifikacijskom ključu (Lane, 2002). Potrebno je naglasiti kako je sinoptički ključ za identifikaciju *M. laxa* (Lane, 2002) izrađen na temelju samo šest izolata porijeklom iz Italije, Španjolske, SAD-a, Australije, Južnoafričke Republike i Japana, a dodatno su analizirana tri izolata iz Australije te jedan iz Francuske. Ukupno 10 izolata vrste *M. laxa* ne može se smatrati reprezentativnom populacijom za određivanje „tipičnih“ morfoloških svojstava određene vrste, posebno kada se radi o organizmima kojima je

svojstvena morfološka heterogenost. Kako su u sklopu ovog istraživanja analizirana morfološka obilježja 134 izolata vrste *M. laxa*, koji potječu iz različitih hrvatskih županija, morfološki profil *Laxa*-HR može se smatrati reprezentativnijim za Hrvatsku od tipičnih profila koji navodi Lane (2002). Sinoptički ključ za identifikaciju *M. fructigena* određen je analizom morfoloških obilježja samo šest izolata iz Španjolske, Ujedinjenog Kraljevstva (UK), Portugala, Poljske, Nizozemske i Francuske, a *M. fructicola* samo devet izolata porijeklom iz Japana, Novog Zelanda, SAD-a i Australije (Lane, 2002). Kao i kod vrste *M. laxa*, relativno malen broj izolata vrsta *M. fructigena* i *M. fructicola* ne može obuhvaćati njihovu prirodnu varijabilnost. Ipak, unatoč malom broju izolata na temelju kojih Lane (2002) određuje sinoptički ključ za njihovu identifikaciju, rezultati ovog istraživanja ukazuju kako se populacije *M. fructigena* i *M. fructicola* odlikuju morfološki homogenijim obilježjima unutar samih vrsta.

Obzirom na ograničenost metoda identifikacije prema morfološkim obilježjima, molekularne su metode u suvremenim fitopatološkim istraživanjima danas svojevrsni standard, bez kojih često nije moguće provesti sveobuhvatno istraživanje identifikacije vrsta gljiva ili pseudogljiva. Tako i PCR metoda predstavlja nezaobilazno sredstvo pri detekciji i identifikaciji biljnih patogena u suvremenim dijagnostičkim protokolima (Gell i sur., 2007).

Rezultati ispitivanja različitih PCR protokola pokazali su kako se metoda koju navode Côté i sur. (2004a) može smatrati pouzdanom za identifikaciju vrsta *M. laxa* i *M. fructigena* u Hrvatskoj. Naime, kod navedenih je vrsta korištenjem specifičnih parova početnica došlo do umnažanja ciljanog dijela genoma. Međutim, istom metodom, s parom početnica specifičnim za vrstu *M. fructicola*, kao i 'multiplex' PCR metodom, dobiveni su lažno negativni rezultati, odnosno nije došlo do umnažanja očekivanog produkta kod svih ispitivanih izolata *M. fructicola* iz Hrvatske. Slične rezultate navode i Hu i sur. (2011) iz čijeg je istraživanja vidljivo kako, osim za *M. fructicola*, pozitivan signal nije dobiven i kod jednog izolata *M. laxa*. S druge strane, Hrutić i sur. (2015) provode istu 'multiplex' PCR metodu (Côté i sur., 2004a) prilikom koje dolazi do umnažanja očekivanog produkta DNK i uspješne identifikacije sve tri *Monilinia* vrste. Hrutić i sur. (2015) zaključuju kako je metoda prema Côtéu i sur. (2004a) točna, brza i pouzdana, što nije bio slučaj u ovom te nekim drugim istraživanjima u svijetu (Hu i sur., 2011). Poznato je kako na točnost, pouzdanost i ponovljivost PCR reakcije mogu utjecati brojni čimbenici, od proizvođača kemikalija do metode ekstrakcije nukleinske kiseline. Optimizacija molekularnih dijagnostičkih metoda može biti relativno zahtjevna i danas se u mnogim dijagnostičkim laboratorijima provjerava među-laboratorijskim usporedbama i 'ring-testovima'. Manji broj izolata pojedine vrste koji se koriste pri razvoju PCR dijagnostičkih protokola specifičnih za vrstu ne može obuhvatiti

svu prirodnu genotipsku varijabilnost pojedine vrste gljive. Uzevši u obzir navedeno, nije neočekivano da se kod provedbe molekularnih tehnika u svrhu identifikacije vrste jave „lažno pozitivni“ ili „lažno negativni“ rezultati, bez obzira o kojoj je vrsti patogena riječ. U slučaju karantenskih štetnih organizama, optimizacija dijagnostičkih metoda od velike je važnosti. Identifikacija svih *M. fructicola* izolata iz Hrvatske uspješno je provedena PCR protokolom koji navode loos i Frey (2000) te se pokazala pouzdanijom za identifikaciju hrvatskih izolata vrste *M. fructicola* od metode koju navode Côté i sur. (2004a). Ovi rezultati ukazuju kako bi se upravo ta PCR metoda trebala koristiti u budućim istraživanjima *M. fructicola* u Hrvatskoj, a preporuča se i u sklopu EPPO dijagnostičkog protokola za *M. fructicola* (EPPO, 2009). Ipak, podrazumijeva se kako uvođenje ili korištenje pojedine dijagnostičke metode zahtijeva stalnu provjeru njene pouzdanosti i točnosti.

Obzirom da je filogenetska analiza sekvenci dijela ITS regije za 13 *Monilinia* spp. izolata odgovarala identifikaciji pomoću PCR metoda korištenih u ovom istraživanju (loos i Frey, 2000; Côté i sur., 2004a), dodatno je potvrđeno kako su navedene PCR metode dovoljno pouzdane i točne u identificiranju vrsta *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* u Hrvatskoj.

Posljednjih se dvadesetak godina u sklopu mikoloških istraživanja opisuju nove *Monilinia* vrste. Tako Van Leeuwen i sur. (2002) opisuju vrstu *M. polystroma*, Harada i sur. (2004) vrstu *M. mumeicola*, a Hu i sur. (2011) vrstu *M. yunnanensis*. Kako su kod nekih hrvatskih *Monilinia* spp. izolata primijećena morfološka obilježja nalik na ona koja opisuju Hu i sur. (2011), uslijedila je molekularna analiza. Pozitivni rezultati identifikacije svih sedam izolata s početnicama specifičnim za vrste *M. mumeicola* i *M. yunnanensis* (Hu i sur., 2011) ukazivali su kako su ove dvije kineske *Monilinia* vrste prisutne i u Hrvatskoj, unatoč tome što su isti izolati PCR-om (Côté i sur., 2004a) prethodno identificirani kao *M. laxa* ili *M. fructigena*. Hu i sur. (2011) navode kako je vrstu *M. mumeicola* moguće pogrešno identificirati kao *M. laxa*, a vrstu *M. yunnanensis* kao *M. fructigena*. Međutim, u sklopu ovog istraživanja dobiveni su drugačiji rezultati. Na *M. yunnanensis* pozitivna su bila tri izolata koja su PCR protokolom prema Côté i sur. (2004a) identificirana kao *M. fructigena*, ali i dva izolata istim protokolom identificirana kao *M. laxa*. Na *M. mumeicola*, pozitivnim su se pokazali jedan izolat prethodno identificiran PCR-om kao *M. laxa*, ali i jedan prethodno identificiran kao *M. fructigena* (Côté i sur., 2004a). Kod tri izolata koji su PCR metodom (loos i Frey, 2000; Côté i sur., 2004a) identificirani kao *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola*, a kod kojih nisu zabilježena morfološka obilježja koja opisuju Hu i sur. (2011), nije došlo do umnažanja ciljanog dijela genoma. Takvi rezultati ukazuju kako početnice specifične za *M. mumeicola* i *M. yunnanensis* (Hu i sur., 2011) ne umnažaju fragmente svih *Monilinia* spp. izolata. Zbog ovih nedosljednosti u dobivenim rezultatima, provedene su dvije zasebne



PCR reakcije s početnicama za direktno sekvenciranje fragmenata gena G3PDH i TUB2 (Hu i sur., 2011). Filogenetska analiza fragmenata gena TUB2 za četiri *Monilinia* spp. izolata pokazala je kako pripadaju vrstama koje su identificirane PCR metodom koju navode Côté i sur. (2004a). Rezultati ovog istraživanja dovode u pitanje tvrdnje koje navode Hu i sur. (2011), za što postoje dva moguća objašnjenja. Prvo, rezultati istraživanja *Monilinia* vrsta u Hrvatskoj pokazuju kako početnice za koje Hu i sur. (2011) navode da su specifične za *M. yunnanensis* i *M. mumeicola* nisu dovoljno specifične, radi čega je moguće dobiti pozitivan signal čak i kod drugih *Monilinia* vrsta. U ovom je slučaju pozitivan signal dobiven kod vrsta *M. laxa* i *M. fructigena*, za koje je i filogenetskom analizom sekvenci potvrđeno da pripadaju upravo tim vrstama. Moguće je i kako su izolati na temelju kojih Hu i sur. (2011) razvijaju svoje početnice obuhvaćali preširok genetski „potpis“ unutar roda *Monilinia*, što je rezultiralo razvojem nedovoljno specifičnih početnica i radi čega se njihovim korištenjem umnažaju i fragmenti *Monilinia* vrsta koje su genetski vrlo slične. S druge strane, gledajući iz šire perspektive, u pitanje se može dovesti i identifikacija vrsta *M. yunnanensis* i *M. mumeicola* kao zasebnih vrsta. U suvremenim se mikološkim istraživanjima vrste najčešće opisuju na temelju vrlo uskog koncepta „vrste“ kao taksonomske jedinice. Usmjeravajući se na jedan gen i prilagodljivo generirana filogenetska stabla, vrste se odvajaju bez šire analize većeg broja genskih regija, simulacije evolucije ili detaljne analize bioloških obilježja. Mikolozi se u takvim široko prihvaćenim postupcima danas često usmjeravaju na manje razlike u manjem broju genskih regija, prema nestandardiziranoj metodologiji i nerijetko uz zanemarivanje šire morfološke varijabilnosti gljiva. Takav opis novih vrsta gljiva općenito je prihvaćen, no uvelike ovisi o perspektivi i pristupu taksonomiji. Analizirajući opis vrsta *M. mumeicola* (Harada i sur., 2004) i *M. yunnanensis* (Hu i sur., 2011), kao i vrste *M. polystroma* (Van Leeuwen i sur., 2002), vidljivo je kako su sve tri vrste opisane na temelju vrlo ograničenog broja izolata, na temelju relativno male genetske varijabilnosti te na temelju različite metodologije filogenetskih analiza. Iz perspektive drugačije od autora (Van Leeuwen i sur., 2002; Harada i sur., 2004; Hu i sur., 2011), moguće je postaviti pitanje radi li se uopće o različitim, odnosno „novim“ vrstama, ili je riječ o fenotipovima i genotipovima *M. laxa* ili *M. fructigena* koji se donekle razlikuju u različitim dijelovima svijeta te na različitim domaćinima. U svrhu precizne identifikacije biljnih patogena, sve „uži“ koncept vrste u suvremenoj mikologiji može predstavljati problem, naročito ako metode „specifične“ za vrstu nisu dovoljno optimizirane ili istražene na većem broju izolata koji bi reprezentativnije predstavljali prirodnu varijabilnost vrste.

Ako se prihvati koncept vrsta *M. yunnanensis* (Hu i sur., 2011) i *M. mumeicola* (Harada i sur., 2004), rezultati analize sekvenci dijela ITS regije i fragmenata gena TUB2 ukazuju kako vrste *M. mumeicola* i *M. yunnanensis* nisu prisutne u Republici Hrvatskoj. Također

ukazuju kako početnice za identifikaciju vrsta *M. mumeicola* i *M. yunnanensis* (Hu i sur., 2011) nisu dovoljno specifične, već umnažaju i dijelove DNK drugih *Monilinia* vrsta.

## 5.2. Raširenost *Monilinia* vrsta na koštičavom voću u Hrvatskoj

Ovim istraživanjem dobiveni su prvi podaci o raširenosti *Monilinia* vrsta u nasadima koštičavog voća u Hrvatskoj. *Monilinia laxa* i *M. fructigena* očekivano su nađene u svih 14 županija u kojima je istraživana raširenost *Monilinia* vrsta, što potvrđuje navode kako su te vrste prisutne na svim područjima s intenzivnom proizvodnjom koštičavog voća u Republici Hrvatskoj (Cvjetković, 2010). Takvi su rezultati očekivani, obzirom na činjenicu da su *M. laxa* i *M. fructigena* „udomaćene“, „izvorne“ ili „europske“ *Monilinia* vrste, za koje je poznato da se u Europi i Hrvatskoj javljaju na koštičavom voću (Cvjetković, 2010; EFSA, 2011). Za razliku od *M. laxa* i *M. fructigena*, utvrđeno je kako je raširenost vrste *M. fructicola* u Hrvatskoj još uvijek ograničena samo na neka područja i lokalitete unutar Dubrovačko-neretvanske, Splitsko-dalmatinske, Istarske, Međimurske, Zagrebačke i Vukovarsko-srijemske županije. Takvi rezultati upućuju na njenu relativno nedavnu introdukciju. Distribucija stranih invazivnih vrsta posljedica je puteva unosa i njihovog daljnjeg širenja. Primjer raširenosti vrste *M. fructicola* utvrđen u ovom istraživanju, oslikava raširenost invazivne strane vrste nakon vremenski relativno nedavne introdukcije. Vrsta je 2012. nađena samo u Splitsko-dalmatinskoj županiji, dok je sljedeće godine utvrđena u još pet hrvatskih županija. Rezultati upućuju kako je njena raširenost u Hrvatskoj još uvijek ograničena u odnosu na *M. laxa* i *M. fructigena*. Uzimajući u obzir njeno daljnje prirodno i antropohorno širenje, može se pretpostaviti kako će se raširenost *M. fructicola* u hrvatskim nasadima koštičavog voća u narednim godinama povećavati.

## 5.3. Bioraznolikost populacija *Monilinia* vrsta na koštičavom voću u Hrvatskoj

Utvrđivanjem bioraznolikosti populacija *Monilinia* vrsta prvi su puta dobiveni podaci o učestalosti identificiranih vrsta na koštičavom voću u Hrvatskoj. Iako je na razini cjelokupnog istraživanja učestalost vrste *M. laxa* bila najveća (37,1 %), ona se ne može smatrati dominantnom u odnosu na vrste *M. fructigena* (34,6 %) i *M. fructicola* (28,3 %). Ipak, rezultati pokazuju kako u Hrvatskoj *M. laxa* i *M. fructigena* uzrokuju smeđu trulež plodova breskve, nektarine i šljive sa sličnom učestalošću (Cvjetković, 2010). Iako u svim istraživanim županijama nije uzet isti broj simptomatičnih plodova koštičavog voća, određena bioraznolikost populacija *Monilinia* vrsta prema županijama informativnog je

karaktera te je provedena u svrhu dobivanja prvog uvida u situaciju u pojedinim nasadima, u odnosu na geografske i klimatološke posebnosti kontinentalnih i obalnih županija.

U istraživanju provedenom u Srbiji (Hrustić i sur., 2015), kao najučestalija vrsta na breskvi, nektarini, marelici, šljivi, trešnji i višnji pokazala se *M. laxa* s 89 % zastupljenosti. *Monilinia laxa* je i u istraživanju u Grčkoj bila najzastupljenija *Monilinia* vrsta s 59 % unutar ukupne populacije s breskve, marelice, šljive i trešnje (Papavasileiou i sur., 2015a). Kako se *M. laxa* smatra najčešćim uzročnikom sušenja izbojaka koštičavog voća (Byrde i Willetts, 1977), tako se i njena visoka zastupljenost u Srbiji i Grčkoj može objasniti činjenicom da su u sklopu tih istraživanja sakupljani i izbojci sa simptomima paleži, dok je ovo istraživanje obuhvaćalo samo simptomatične plodove. S druge strane, Poniatowska i sur. (2013) na breskvi, marelici, šljivi, trešnji i višnji u Poljskoj utvrđuju vrlo sličnu zastupljenost vrste *M. laxa* kao u Hrvatskoj (36,6 %), dok je u južnoj Italiji zastupljenost *M. laxa* na plodovima šljive, breskve, marelice i trešnje iznosila 22,7 % (Abate i sur., 2018). U Španjolskoj, Villarino i sur. (2012a) također sa simptomatičnih plodova breskve najčešće izoliraju vrstu *M. laxa*, dok je u Kini na plodovima identificirana u samo 2 % od ukupne *Monilinia* populacije (Zhu i sur., 2011). Vidljivo je kako odabir biljnog materijala za analizu bioraznolikosti može utjecati na rezultate istraživanja populacija *Monilinia* vrsta, posebice kada se promatra vrsta *M. laxa*. Uzorkovanje simptomatičnih cvjetova, izbojaka i plodova, u usporedbi s uzorkovanjem samo simptomatičnih plodova, pokazuje tendenciju češće identifikacije vrste *M. laxa* u ukupnoj populaciji. Međutim, obzirom na zastupljenost vrste *M. laxa* na plodovima koštičavog voća u Hrvatskoj (37,1 %), Poljskoj (36,6 %) te na jugu Italije (22,7 %), ne može se tvrditi kako je ona patogen koji zarazu vrši primarno na cvjetovima ili izbojcima (Calavan i Keitt, 1948). U usporedbi s drugim *Monilinia* vrstama, *M. laxa* najčešće se izolira iz osušenih cvjetova i grančica te se uključivanjem tih biljnih dijelova u istraživanje bioraznolikosti populacija potencijalno povećava i utvrđena učestalost vrste *M. laxa* u nasadu. Iz tog je razloga moguće pretpostaviti kako bi udio *M. laxa* u ukupnoj bioraznolikosti populacija u Hrvatskoj bio viši od trenutno utvrđenog, da su u sklopu ovog istraživanja uzorkovani cvjetovi i mladice sa simptomima paleži, kao što je slučaj u Grčkoj i Srbiji (Hrustić i sur., 2015; Papavasileiou i sur., 2015a).

Kada promatramo učestalost vrste *M. laxa* prema županijama, u odnosu na *M. fructigena* i *M. fructicola*, najzastupljenijom se pokazala u Osječko-baranjskoj (78,6 %), Zagrebačkoj (65,5 %), Zadarskoj (65,3 %), Koprivničko-križevačkoj (53,3 %) i Vukovarsko-srijemskoj (45 %) županiji. U Brodsko-posavskoj županiji je, uz *M. fructigena*, sačinjavala 50 % od ukupne populacije *Monilinia* vrsta. Vidljivo je kako su sve županije u kojima se *M. laxa* pokazala kao najzastupljenija upravo kontinentalne županije, izuzev Zadarske. Za kontinentalno su

područje Republike Hrvatske karakteristične niže srednje temperature, za razliku od mediteranskog dijela Hrvatske. Byrde i Willetts (1977) navode kako upravo veća sposobnost klijanja spora na znatno nižim temperaturama predstavlja fitopatološku značajku vrste *M. laxa* u odnosu na *M. fructicola*, a o većoj otpornosti vrste *M. laxa* na hladnije vremenske uvjete kasnije govore i brojni drugi autori (Tamm i Fluckiger, 1993; Tian i Bertolini, 1999; Papavasileiou i sur., 2015a; Papavasileiou i sur., 2015b). Međutim, u kontekstu donošenja pretpostavki o većoj prikladnosti kontinentalne klime za vrstu *M. laxa*, u vidu je potrebno imati ograničen broj uzoraka sakupljen na pojedinim lokalitetima. U Osječko-baranjskoj, Koprivničko-križevačkoj i Brodsko-posavskoj županiji sakupljeno je manje od 20 zaraženih plodova, što predstavlja vrlo malen uzorak koji se ne može smatrati reprezentativnim te ne obuhvaća stvarnu populaciju unutar tih županija. Velik broj nasada koštičavog voća, kao i velik broj biljaka domaćina *Monilinia* vrsta u svim područjima Hrvatske, ograničavajući su čimbenici istraživanja populacije *Monilinia* vrsta. Takva je ograničenja potrebno imati u vidu prilikom donošenja zaključaka o prikladnosti određenog klimata ili područja za raširenost pojedine *Monilinia* vrste u Hrvatskoj.

Kako se navodi u literaturi, vrsta *M. fructigena* najčešće je povezana sa smeđom truleži na plodovima, dok se rjeđe navodi kao uzročnik paleži cvijeta i izbojaka (Jones, 1990; Cvjetković, 2010). Iz tog se razloga upravo odabir biljnog materijala prilikom uzorkovanja može dovesti u vezu s rezultatima koji ukazuju na njenu nisku učestalost u Srbiji (3 %) (Hrustić i sur., 2015). Takva je pretpostavka u skladu i s rezultatima istraživanja u Poljskoj (Poniatowska i sur., 2013) gdje se *M. fructigena* pokazala kao najučestalija (59,7 %), a istraživanje je, kao i u Hrvatskoj, obuhvaćalo samo izolate s plodova. S druge strane, Villarino i sur. (2012a) u Španjolskoj te Abate i sur. (2018) u južnoj Italiji na plodovima koštičavog voća gotovo i ne nalaze vrstu *M. fructigena*, a rezultati istraživanja bioraznolikosti populacija u grčkim nasadima koštičavog voća pokazuju potpuni izostanak vrste *M. fructigena* na plodovima breskve, marelice, trešnje i šljive (Papavasileiou i sur., 2015a). Osim u Europi, neka istraživanja pokazuju kako se *M. fructigena* rijetko nalazi i u nasadima koštičavog voća u Aziji (Hu i sur., 2011; Zhu i sur., 2011). Iako niska učestalost vrste *M. fructigena* u nekim područjima općenito može ukazivati na tendenciju smanjenja njenog gospodarskog značaja na koštičavom voću, ovo istraživanje, kao i ono provedeno u Poljskoj (Poniatowska i sur., 2013) potvrđuju kako ona na pojedinim lokacijama još uvijek predstavlja značajan sastavni dio populacije *Monilinia* vrsta na plodovima breskve, nektarine i šljive.

Prema rezultatima istraživanja zastupljenosti vrste *M. fructigena* u pojedinim hrvatskim županijama, najučestalijom se pokazala u Virovitičko-podravskoj (90,9 %), Međimurskoj

(81,8 %), Bjelovarsko-bilogorskoj (80,0 %), Varaždinskoj (72,7 %), Istarskoj (63,1 %) i Sisačko-moslavačkoj (60 %) županiji, dok u Brodsko-posavskoj, uz *M. laxa*, čini 50 % ukupne populacije *Monilinia* vrsta. Kao i u slučaju *M. laxa*, potrebno je napomenuti kako je u svim tim županijama, osim u Istarskoj, sakupljeno manje od 20 simptomatičnih plodova. Bez obzira na to, rezultati ukazuju kako *M. fructigena* u nekim nasadima može biti dominantan uzročnik pojave smeđe truleži plodova breskve i nektarine, što se razlikuje od podataka koje prikazuje Cvjetković (2010).

Uz prvi nalaz vrste *M. fructicola* u Hrvatskoj, utvrđeno je kako je ona u ukupnoj populaciji zastupljena s 28,3 %. U istraživanjima provedenima u Srbiji (Hrustić i sur., 2015) i Poljskoj (Poniatowska i sur., 2013), učestalost *M. fructicola* bila je manja te je iznosila 8 % i 0,9 %. Istraživanje učestalosti *M. fructicola* u hrvatskim županijama pokazalo je kako je ona najučestalija *Monilinia* vrsta u Dubrovačko-neretvanskoj (63,6 %) i Splitsko-dalmatinskoj (95 %) županiji. Klimatski uvjeti u južnoj Europi, u koju svakako možemo svrstati i Dubrovačko-neretvansku i Splitsko-dalmatinsku županiju, usporedivi su s uvjetima u Kaliforniji (SAD), u kojoj je *M. fructicola* široko rasprostranjena (EFSA, 2011). S druge strane, uvjeti u te dvije županije nisu usporedivi s uvjetima u Poljskoj i Srbiji, zemljama u kojima je utvrđena mala učestalost *M. fructicola*. Naime, Poljska, Srbija te kontinentalni dio Hrvatske područja su umjerene kontinentalne klime, dok je obalni dio Hrvatske, uključujući Dubrovačko-neretvansku i Splitsko-dalmatinsku županiju, područje sredozemne klime. Veća učestalost vrste *M. fructicola* na koštičavom voću utvrđena je i u nekim drugim mediteranskim zemljama. Villarino i sur. (2012a) navode kako je na plodovima breskve u nekim španjolskim voćnjacima *M. fructicola* bila najzastupljenija *Monilinia* vrsta. U Grčkoj je na plodovima koštičavog voća njena učestalost iznosila 89 % (Papavasileiou i sur., 2015a), što je usporedivo s njenom učestalošću u Splitsko-dalmatinskoj županiji (95 %). Na jugu Italije, *M. fructicola* sačinjavala je 74,8 % od ukupne populacije *Monilinia* vrsta (Abate i sur., 2018). Spomenuti rezultati drugih autora, kao i rezultati ovog istraživanja, upućuju na pretpostavku kako je *M. fructicola* vrsta koje je prilagođena toplijem, sredozemnom tipu klime. Nastavno na to, moguće je pretpostaviti kako spomenuta vrsta predstavlja veći rizik za proizvodnju koštičavog voća u priobalnom dijelu Hrvatske u odnosu na kontinentalni dio zemlje.

Petróczy i sur. (2012) istražuju bioraznolikost populacija *Monilinia* vrsta u Mađarskoj, gdje se *M. laxa* pokazala kao najzastupljenija vrsta s 55,7 % zastupljenosti. *Monilinia fructigena* bila je zastupljena s 40,2 %, *M. fructicola* s 3,1 %, a *M. polystroma* s 1 %. Ipak, *M. fructicola* u Mađarskoj nije nađena u nasadu, već samo na kupovnim te uvoznim plodovima iz Italije i Španjolske, a izolati potječu i s roda *Chaenomeles*, *Rosa*, *Malus*, *Cotoneaster*, *Pyrus*,

*Cydonia* i *Vitis*. Iz tog razloga rezultati istraživanja bioraznolikosti populacija u Mađarskoj nisu u potpunosti usporedivi s rezultatima ovog istraživanja. Ipak, ovakvi navodi također ukazuju na visoku zastupljenost vrste *M. laxa* u Mađarskoj koja, prema svom geografskom položaju, ne pripada zemljama s mediteranskom klimom.

Utvrđena bioraznolikost populacija *Monilinia* vrsta u Hrvatskoj može se analizirati i prema godini u kojoj je istraživanje provedeno, iako vrlo ograničeno zbog različitih nasada u kojima je provedeno uzorkovanje te relativno malog broja uzoraka za takav tip istraživanja. Tako je u 2012. godini najčešće identificirana vrsta bila *M. laxa* (47,3 %). Slično učestalom pokazala se i *M. fructigena* s 41,4 %, dok je udio vrste *M. fructicola* iznosio 11,3 %. Međutim, u odnosu na *M. laxa* (28,4 %) i *M. fructigena* (29 %), u 2013. godini utvrđena je znatno veća učestalost vrste *M. fructicola* (42,6 %). Vidljivo je kako je i u 2013. godini udio *M. laxa* i *M. fructigena* bio gotovo izjednačen. Od 81 izolata identificiranog kao *M. fructicola* u 2013. godini, njih čak 69 potječe iz Dubrovačko-neretvanske ili Splitsko-dalmatinske županije. Iako je ovo istraživanje obuhvaćalo različite nasade te nije bilo moguće pratiti eventualne promjene u populaciji *Monilinia* vrsta, rezultati upućuju na mogućnost učinka klimatskih čimbenika tijekom godine na zastupljenost pojedine *Monilinia* vrste na koštičavom voću.

Određivanje bioraznolikosti populacija *Monilinia* vrsta u odnosu na domaćina s kojeg su izolirane omogućilo je utvrđivanje najzastupljenijih *Monilinia* vrsta na plodovima breskve, nektarine i šljive u Hrvatskoj. Istraživanjem je utvrđeno kako je kod sva tri domaćina kao najzastupljenija utvrđena različita *Monilinia* vrsta. Tako je breskvu u najvećoj mjeri parazitirala *M. laxa* (41,8 %), dok je udio *M. fructigena* i *M. fructicola* na breskvi bio vrlo sličan (29,3 % i 29,9 %). Unatoč tome što ovi rezultati i navodi iz domaće literature (Cvjetković, 2010) ukazuju kako je *M. laxa* uobičajen patogen plodova breskve, vidljivo je kako se ona u prošlosti često nije dovodila u vezu s pojavom te bolesti na tom domaćinu (Zehr, 1982). Iako Cvjetković (2010) navodi kako *M. fructigena* na breskvi i nektarini rijetko uzrokuje trulež ploda te kako napad najčešće nije jak, ona se upravo na nektarini pokazala kao najzastupljenija *Monilinia* vrsta s 50,9 % učestalosti, a ne može se smatrati niti zanemarivim uzročnikom smeđe truleži breskve (29,3 %). *Monilinia laxa* utvrđena je na 38,7 % plodova nektarine, dok je *M. fructicola* bila prisutna na samo 11 plodova nektarine sa simptomima smeđe truleži (10,4 %). Na šljivi je *M. fructicola* bila najučestalija *Monilinia* vrsta, s čak 65,9 % zastupljenosti, dok su *M. laxa* i *M. fructigena* utvrđene s manjom učestalošću (12,8 % i 21,3 %). *Monilinia fructicola* novi je uzročnik smeđe truleži koštičavog voća u Hrvatskoj te u domaćoj stručnoj i znanstvenoj literaturi prije ovog istraživanja nisu bili dostupni točni podaci o njenom značaju. Za razliku od *M. fructicola*, poznato je kako su udomaćene *M. laxa* i *M. fructigena* uzročnici smeđe truleži ploda šljive, o čemu govori i

Cvjetković (2010). Ipak, rezultati istraživanja bioraznolikosti populacija *Monilinia* vrsta na šljivi ukazuju kako bi zaraza plodova šljive s *M. fructicola*, u usporedbi s *M. laxa* i *M. fructigena*, potencijalno mogla predstavljati veći izazov proizvođačima te voćne vrste u Hrvatskoj.

Predviđanja koja navodi Villarino (2010), kako će u Europi na koštičavom voću *M. fructicola* jednim dijelom potisnuti vrstu *M. laxa*, djelomično su u skladu s utvrđenom bioraznolikošću populacija *Monilinia* vrsta u Hrvatskoj. Podatak kako je *M. laxa* u ukupnoj populaciji identificirana kao najzastupljenija *Monilinia* vrsta, ukazuje da u Hrvatskoj još nije došlo do takve pojave. Ipak, općenito uspoređujući 2012. i 2013. godinu, vidljivo je kako su promjene u bioraznolikosti populacija *Monilinia* vrsta moguće te kako *M. fructicola* u budućnosti ima potencijal postati zastupljenija u odnosu na *M. laxa* i *M. fructigena*. S druge strane, niti u 2012. te 2013. godini nije utvrđeno kako je vrsta *M. fructigena* znatno manje zastupljena u odnosu na *M. laxa* i *M. fructicola*. Takvi su podaci u suprotnosti s navodima kako će u Europi na koštičavom voću *M. laxa* i *M. fructicola* gotovo u potpunosti potisnuti vrstu *M. fructigena* (Villarino, 2010), kao što je to slučaj u nekim nasadima u Španjolskoj, Grčkoj i Italiji (Villarino i sur., 2012a; Papavasileiou i sur., 2015a; Abate i sur., 2018). Naravno, kod takve je tvrdnje potrebno uzeti u obzir brojne čimbenike koji mogu utjecati na širenje pojedinog patogena, među kojima najvažniji mogu biti oni klimatološki. Španjolska, Grčka i Italija zemlje su u kojima dominira sredozemna klima. Bez obzira na osjetljivost sorte, mjere zaštite, način prezimljenja ili druge vanjske čimbenike koji utječu na bioraznolikost populacija *Monilinia* vrsta, moguće je kako sredozemni tip klime najviše odgovara upravo vrsti *M. fructicola*, radi čega može doći do „potiskivanja“ udomaćenih *M. laxa* i *M. fructigena*. Najveći postotak nalaza *M. fructicola* u dvije južne županije (Splitsko-dalmatinska i Dubrovačko-neretvanska) tijekom 2013. godine može podržavati takvu pretpostavku. Izostanak prijašnjih podataka o bioraznolikosti populacija *Monilinia* vrsta na *Prunus* vrstama u Hrvatskoj onemogućava komparativnu raspravu o promjenama koje su mogle nastupiti ulaskom vrste *M. fructicola* u Republiku Hrvatsku i njenim širenjem. Iako točni podaci o prijašnjoj bioraznolikosti populacija *Monilinia* vrsta u Hrvatskoj ne postoje, očito je kako je novoutvrđena prisutnost vrste *M. fructicola* u nekim nasadima koštičavog voća u Hrvatskoj promijenila ukupnu bioraznolikost populacija. To se posebice odnosi na Splitsko-dalmatinsku i Dubrovačko-neretvansku županiju u kojima se pokazala kao najučestalija. Osim toga, utvrđeno je i da je *M. fructicola* bila najzastupljenija *Monilinia* vrsta na plodovima šljive, što ukazuje i na značajne promjene u bioraznolikosti populacija u tim nasadima.

## 5.4. Fenotipska varijabilnost *Monilinia* vrsta u Hrvatskoj

### 5.4.1. Brzina rasta micelija na različitim temperaturama

Potpuni inhibitorni učinak na rast micelija svih *Monilinia* spp. izolata utvrđen je kod najviše testirane temperature od 35 °C, što je u skladu s rezultatima koje navode Papavasileiou i sur. (2015a) za izolate vrsta *M. laxa* i *M. fructicola* u Grčkoj. Abate i sur. (2018) također utvrđuju najmanji porast *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* na najvišoj testiranoj temperaturi od 32 °C, ali ne utvrđuju potpuni izostanak rasta micelija. Uzimajući u obzir rezultate navedenih istraživanja, vidljiv je djelomičan ili potpuni inhibitorni učinak na porast micelija *Monilinia* vrsta pri izloženosti temperaturama višim od 30 °C.

U ovom je istraživanju utvrđeno i kako je 28 od ukupno 30 *Monilinia* spp. izolata uspješno raslo na najnižoj testiranoj temperaturi od 7,5 °C. Uspoređujući porast micelija vrsta *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* pri temperaturi od 7,5 °C, vidljivo je kako je kod vrste *M. laxa* on bio najniži, a kod vrste *M. fructicola* najviši. Ujedno su i svi izolati *M. fructicola* uspješno rasli na toj temperaturi, što nije bio slučaj kod *M. laxa* i *M. fructigena*. Papavasileiou i sur. (2015a) u Grčkoj te Hrutić i sur. (2018) u Srbiji navode drugačije rezultate istraživanja. Grčko je istraživanje pokazalo kako je svih pet izolata *M. laxa* pokazalo tendenciju rasta na najnižoj testiranoj temperaturi od 5 °C, dok kod vrste *M. fructicola* to nije bio slučaj (Papavasileiou i sur., 2015a). Hrutić i sur. (2018) utvrđuju statistički značajne razlike u rastu micelija *M. laxa* i *M. fructicola* na temperaturama od 5, 24 i 30 °C. Kod temperature od 5 °C utvrđen je veći porast micelija vrste *M. laxa*, dok je kod temperatura od 24 i 30 °C veći porast micelija pokazala *M. fructicola*. Prema rezultatima spomenutih istraživanja moglo bi se zaključiti kako je *M. laxa* bolje prilagođena rastu na nižim temperaturama, dok je *M. fructicola* termofilnija. U ovom istraživanju nije utvrđeno kako *M. laxa* bolje raste na nižim temperaturama. Ipak, pri tumačenju rezultata dinamike rasta na nižim temperaturama, u obzir je potrebno uzeti razlike između izolata vrste *M. laxa* u odnosu na domaćina, biljni materijal ili geografsko porijeklo, ali i prirodnu varijabilnost *Monilinia* vrsta općenito.

Promatrajući temperaturni optimum pri kojem određena *Monilinia* vrsta pokazuje najviši porast kolonije u mm/danu, vidljivo je kako su sve tri vrste najbrže rasle na temperaturi od 25 °C. Slične rezultate navode i drugi autori koji proučavaju porast micelija *Monilinia* vrsta na različitim temperaturama (Papavasileiou i sur., 2015a; Hrutić i sur., 2018). Abate i sur. (2018) utvrđuju kako se u istraživanju provedenom u južnoj Italiji temperatura od 20 °C pokazala optimalnom za porast micelija vrste *M. fructigena*, 23 °C vrste *M. laxa* i 26 °C vrste *M. fructicola*. Iako se u ovom istraživanju porast micelija sve tri *Monilinia* vrste pokazao optimalnim na temperaturi od 25 °C, uspoređujući ih međusobno, najveći porast kolonije na



25 °C utvrđen je kod vrste *M. fructicola*, a najniži kod vrste *M. fructigena*. Pri tome je porast kolonije različitih izolata *M. laxa* i *M. fructigena* varirao od < 0,5 do > 5 mm/danu, dok su kod vrste *M. fructicola* te razlike bile nešto manje, s prosječnim dnevnim porastom od > 4 do > 7 mm. Takvi rezultati upućuju na pretpostavke o pogodnosti blaže i toplije klime za razvoj *M. fructicola*, a o termofilnosti svojstvenoj za *M. fructicola* govore i drugi autori (Abate i sur., 2018). *Monilinia fructicola* mogla bi se bolje razvijati u područjima s toplijim proljećem i ljetom te bi se mogla smatrati termofilnijom vrstom u odnosu na *M. laxa* i *M. fructigena*.

Uspoređujući porast micelija sve tri *Monilinia* vrste na svim testiranim temperaturama, za vrstu *M. fructicola* utvrđen je najveći prosječan porast kolonije, osim kod temperature od 35 °C koja je inhibitorno djelovala na svih 30 *Monilinia* spp. izolata. Sposobnost bržeg rasta vrste *M. fructicola*, u odnosu na druge *Monilinia* vrste, navode i drugi autori (Byrde i Willetts, 1977; Ogawa i sur., 1995; Lane, 2002; Hu i sur., 2011). Takva bi fitopatološka osobina vrste *M. fructicola* u nasadu mogla utjecati na brzinu njenog razvoja na plodovima te bržu kolonizaciju istih. Zbog svoje sposobnosti bržeg rasta na širokom temperaturnom rasponu, *M. fructicola* bi posljedično mogla i brže zahvaćati plodove, više sporulirati te tako intenzivnije nagomilavati inokul u usporedbi s *M. laxa* ili *M. fructigena*. U praktičnom smislu, brža i veća proizvodnja konidija te brži rast na zaraženim plodovima može dovesti i do težeg suzbijanja vrste *M. fructicola* u samom nasadu.

Veliki broj istraživanja učinaka različitih temperatura na *Monilinia* vrste u svijetu temelji se na učincima na klijavost konidija, a ne na porast micelija. Tako mnogi autori govore o sposobnosti klijanja spora *Monilinia* vrsta pri niskim temperaturama (Tamm i Fluckiger, 1993; Xu i sur., 2001; Casals i sur., 2010), dok se za *M. laxa* navodi kako konidije mogu proklijati i pri temperaturi od -4 °C (Tian i Bertolini, 1999). Abate i sur. (2018) utvrđuju kako je sporulacija *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* bila najintenzivnija pri izloženosti temperaturi od 17 °C, dok je kod *M. fructicola* bila najobilnija. Istraživanje učinaka različitih temperatura na porast micelija *Monilinia* vrsta može se smatrati informativnijim u odnosu na istraživanje učinaka na klijanje konidija. Naime, Papavasileiou i sur. (2015a) uspoređuju navedene učinke te utvrđuju kako izloženost različitim temperaturama značajnije utječe na porast micelija, u usporedbi s učincima na klijanje konidija kod vrsta *M. laxa* i *M. fructicola*.

Utvrđeno je kako su izolati koji potječu iz različitih dijelova Hrvatske u mogućnosti aktivno rasti i pri nižim temperaturama, koje su u hrvatskim nasadima karakteristične za razdoblje cvatnje u proljeće. Iako je poznato kako *Monilinia* vrste uzrokuju simptome paleži upravo u tom vegetacijskom razdoblju (Byrde i Willetts, 1977), prvi je puta u Hrvatskoj potvrđeno kako vrsta *M. fructicola*, jednako kao udomaćene *M. laxa* i *M. fructigena*, uspješno raste i razvija se tijekom izloženosti testiranim temperaturama do 30 °C. To bi značilo da i *M.*

*fructicola* može biti uzročnik paleži cvijeta i grančica. Kako izolati u ovom istraživanju nisu sakupljeni sa cvjetova, ta pretpostavka za sada nije provjerena.

Iako nije provedena statistička analiza, vidljivo je kako i unutar same vrste postoje razlike u porastu micelija pri različitim temperaturama između izolata *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola*. Ti podaci očekivano ukazuju na fenotipsku varijabilnost hrvatskih izolata unutar iste *Monilinia* vrste. Razlike u reakciji na različite temperature vidljive su i uspoređujući vrste *M. laxa* i *M. fructicola* koji potječu iz Hrvatske i Grčke (Papavasileiou i sur., 2015a), što može upućivati na prilagodbu populacija patogena agroekološkim uvjetima u pojedinom području.

#### 5.4.2. Patogenost na plodovima breskve, nektarine i šljive

Ispunjenje Kochovih postulata u testu patogenosti *Monilinia* vrsta na plodovima breskve, nektarine i šljive (Hu i sur., 2011), u skladu je s rezultatima istraživanja patogenosti *Monilinia* vrsta u svijetu (Hong i sur., 1998; Hu i sur., 2011; Zhu i sur., 2011; Petróczy i sur., 2012; Hrustić i sur., 2015; Papavasileiou i sur., 2015a; Abate i sur., 2018).

U istraživanju patogenosti *Monilinia* vrsta na plodovima nektarine u Hrvatskoj nisu utvrđene statistički značajne razlike između vrsta *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola*, kao niti između izolata unutar vrsta *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola*. Slične rezultate istraživanja patogenosti *Monilinia* vrsta na nektarini u Kini navode i Zhu i sur. (2011). Iako značajne razlike u patogenosti nisu utvrđene, najveći prosječan porast lezije na plodovima nektarine utvrđen je za vrstu *M. laxa*. Upravo Cvjetković (2010) navodi kako su plodovi nektarine osobito osjetljivi na zarazu s *M. laxa*. U istraživanju provedenom u Srbiji (Hrustić i sur., 2015), utvrđeno je kako je na plodovima nektarine najvirulentnija bila *M. fructigena*. Takve razlike mogu se pripisati izolatima, ali i eksperimentalnoj sorti na kojoj su umjetne zaraze provedene.

Statistički značajne razlike u patogenosti između vrsta *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* u Hrvatskoj nisu utvrđene niti na plodovima šljive. Najveći prosječan porast lezije na plodovima šljive utvrđen je za vrstu *M. fructicola*, dok se u Srbiji na šljivi najvirulentnijom pokazala *M. laxa* (Hrustić i sur., 2015). U Grčkoj je na plodovima šljive *M. fructicola* identificirana kao značajno virulentnija od *M. laxa* (Papavasileiou i sur., 2015a). Kao i u prethodnom slučaju, rezultati takvih pokusa najčešće variraju te ovise o samim izolatima, broju izolata, statističkoj analizi i odabiru eksperimentalne sorte. Iako na plodovima šljive nije bilo statistički značajnih razlika u patogenosti između vrsta *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola*, na samu varijabilnost ukazuju i utvrđene značajne razlike u patogenosti između izolata unutar vrsta *M. laxa* i *M. fructigena* na plodovima šljive. Bez obzira na to, ovo

istraživanje pokazuje kako se sve tri *Monilinia* vrste mogu relativno jednako dobro razvijati na plodovima šljive te uzrokovati pojavu simptoma u sličnom intenzitetu.

Za razliku od nektarine i šljive, na plodovima breskve jest utvrđena statistički značajna razlika u patogenosti između *Monilinia* vrsta. Tako se vrsta *M. fructigena* pokazala statistički značajno virulentnijom od vrste *M. fructicola*, dok se patogenost vrste *M. laxa* statistički nije značajno razlikovala od vrsta *M. fructigena* i *M. fructicola*. Byrde i Willetts (1977) navode kako je na koštičavom voću *M. fructigena* manje patogena od *M. fructicola*, ali su rezultati ovog istraživanja pokazali kako je patogenost vrste *M. fructigena* na breskvi u Hrvatskoj bila značajno viša u odnosu na *M. fructicola*. *Monilinia fructigena* bila je i najvirulentnija *Monilinia* vrsta na breskvi u Srbiji (Hrustić i sur., 2015), dok je u Kini utvrđeno kako je na breskvi najvirulentnija *M. laxa* (Hu i sur., 2011). Papavasileiou i sur. (2015a) navode vrstu *M. fructicola* kao značajno virulentniju od *M. laxa* na plodovima breskve u Grčkoj, dok Abate i sur. (2018) u južnoj Italiji ne utvrđuju značajne razlike u patogenosti između *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* na plodovima breskve. Rezultati ovog i spomenutih istraživanja različiti su i ne omogućavaju donošenje jedinstvenog zaključka. Ipak, vidljivo je kako sve tri vrste mogu imati sličnu sposobnost razvoja na plodovima breskve i uzrokovati slične simptome smeđe truleži, a manje se razlike i u ovom slučaju mogu pripisati metodologiji i analizi podataka.

Promatrajući patogenost pojedinog izolata *Monilinia* vrsta na breskvi, nektarini i šljivi te porijeklo tog istog izolata, vidljivo je kako su različiti izolati vrsta *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* sposobni uzrokovati jake simptome smeđe truleži bez obzira na domaćina s kojeg su izolirane. Slično utvrđuju i Hrutić i sur. (2015). Takvi rezultati ukazuju kako u mješovitim nasadima, primjerice u onima gdje se uzgajaju breskva i nektarina, *Monilinia* vrste mogu zaraziti oba domaćina, neovisno o tome na kojoj se vrsti plodova razvijaju. Nadalje, u područjima gdje se na manjem prostoru uzgajaju sve tri voćne vrste, inokul može potjecati s bilo koje. Specifičnost ili specijalizacija u odnosu na domaćina u slučaju *Monilinia* vrsta breskve, nektarine i šljive ne postoji.

#### 5.4.3. Sporulacija na plodovima nektarine

Kada promatramo broj spora po površini ploda za izolate unutar vrsta *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola*, vidljivo je kako su se dva izolata (ZD 143/12 i ZD 145/12) unutar vrste *M. laxa* statistički značajno razlikovala. Obzirom da oba izolata pripadaju istoj vrsti, potječu s lokacije Kašić u Zadarskoj županiji te su izolirani s breskve iste godine, rezultati ukazuju na visoku fenotipsku varijabilnost između izolata unutar iste vrste, o čemu još u prošlom stoljeću govore i mnogi drugi autori (Penrose i sur., 1976; Byrde i Willetts, 1977; Harada,

1977; Batra, 1979; Wilcox, 1989). Za razliku od izolata unutar vrste *M. laxa*, unutar populacije izolata *M. fructigena* i izolata populacije *M. fructicola* nisu utvrđene statistički značajne razlike u sporulaciji.

Određujući razlike u sporulaciji između vrsta *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola*, utvrđeno je kako je vrsta *M. fructicola*, u usporedbi s *M. laxa* i *M. fructigena*, proizvela statistički značajno veći broj spora po površini ploda nektarine, a slične rezultate o sporulaciji vrste *M. fructicola* na plodovima breskve u Kini navode i Hu i sur. (2011). Nadalje, u oba istraživanja nisu utvrđene statistički značajne razlike u prosječnom broju spora po površini ploda između vrsta *M. laxa* i *M. fructigena*. Upravo je obilna sporulacija vrste *M. fructicola* jedno od morfoloških obilježja za diferencijaciju od *M. laxa* i *M. fructigena* (Lane, 2002), a o obilnoj sporulaciji vrste *M. fructicola* govore i drugi autori (Byrde i Willetts, 1977; Ogawa i sur., 1995). Obzirom da veći broj konidija na zaraženom plodu rezultira većom količinom sekundarnog inokula u nasadu, ovaj podatak može se dovesti u vezu s promjenama u bioraznolikosti populacija *Monilinia* vrsta u Hrvatskoj, pri čemu je od 2012. do 2013. godine zapaženo povećanje učestalosti vrste *M. fructicola*. Naime, sekundarni inokul ima značajan učinak na pojavnost i jačinu razvoja bolesti (Byrde i Willetts, 1977; Hong i sur., 1997), a pomoću podataka o dinamici i količini sekundarnog inokula moguće je predvidjeti pojavu smeđe truleži u nasadu (Fry, 1982; Villarino i sur., 2012a). Veća sporulacija vrste *M. fructicola* fitopatološka je značajka kojom se razlikuje od vrsta *M. laxa* i *M. fructigena*. Promjene u populaciji *Monilinia* vrsta na koštičavom voću nakon ulaska i širenja vrste *M. fructicola* u nekim europskim zemljama (Petróczy i sur., 2012; Poniatowska i sur., 2013; Hrustić i sur., 2015; Abate i sur., 2018) dijelom mogu biti i posljedica takvih fitopatoloških osobina vrste *M. fructicola*. Iz pozicije prakse, suzbijanje smeđe truleži u nasadima gdje je prisutna ili gdje dominira *M. fructicola* može biti teže, a razvoj bolesti može biti intenzivniji.

#### 5.4.4. Vijabilnost konidija na plodovima nektarine

U ovom su istraživanju plodovi nektarine, inokulirani micelijem izolata *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola*, bili izloženi vanjskim uvjetima od kolovoza 2016. do travnja 2017. godine. Takvom metodologijom nastojali su se oponašati uvjeti kojima su u nasadu izloženi zaraženi plodovi zaostali nakon berbe. Razdoblje izloženosti zaraženih plodova uključivalo je kraj ljeta i početak jeseni, cijeli zimski period te početak proljeća. Očitavanjem broja vijabilnih i nevijabilnih konidija na mumificiranim plodovima utvrđeno je kako su izolati sve tri *Monilinia* vrste zadržali sposobnost vijabilnosti konidija, a statistički značajne razlike između izolata unutar vrsta *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* nisu utvrđene. Sukladno tome, moguće je pretpostaviti kako je mogućnost prezimljenja za sve tri *Monilinia* vrste u Hrvatskoj slična.

Također, može se smatrati dokazanim kako strana invazivna te u Hrvatskoj relativno „nova“ vrsta *M. fructicola* načelno ima slične mogućnosti prezimljenja, kao i udomaćene *M. laxa* i *M. fructigena*.

Ipak, uspoređujući prosječnu vijabilnost konidija između vrsta *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* u Hrvatskoj, statistička je analiza podataka pokazala kako je prosječna vijabilnost konidija *M. laxa* nakon prezimljenja bila značajno veća u usporedbi s prosječnom vijabilnosti konidija *M. fructicola*. Upravo Byrde i Willetts (1977) navode kako *M. laxa* ima veću sposobnost klijanja konidija na znatno nižim temperaturama, u odnosu na vrstu *M. fructicola*.

Poznato je kako prezimljujući mumificirani plodovi koštičavog voća mogu predstavljati jedan od glavnih izvora primarnih zaraza u proljeće (Byrde i Willetts, 1977; Landgraf i Zehr, 1982; Biggs i Northover, 1985). Međutim, značajno veća vijabilnost konidija *M. laxa* nakon devetomjesečne izloženosti, u usporedbi s vijabilnosti konidija *M. fructicola*, ukazuje kako konidije *M. laxa* imaju potencijalno veću sposobnost prezimljenja te kako su potencijalno otpornije na niske temperature. Iz tog je razloga moguće pretpostaviti kako konidije *M. laxa* imaju sposobnost proklijati ranije u proljeće od *M. fructicola*, kada su noćne temperature u Hrvatskoj još uvijek relativno niske. Takva pojava mogla bi rezultirati primarnim zarazama s *M. laxa* ranije u sezoni, čime bi se povećala i količina primarnog inokula *M. laxa* u nasadu. To može biti jedan od razloga što se palež cvijeta češće veže uz vrstu *M. laxa* (Cvjetković, 2010). Međutim, na preživljavanje, latentnost i reprodukciju konidija, osim temperature zraka, utječu i drugi faktori, kao što su relativna vlažnost zraka te količina oborina (Corbin i sur., 1968; Bannon i sur., 2009). Imajući to u vidu, temperatura ne predstavlja jedini čimbenik koji će uvjetovati uspješnost prezimljenja pojedine fitopatogene vrste gljive.

U povoljnim se uvjetima na mumificiranim plodovima proraslim stromom gljive mogu razviti apotecije s askusima, u kojima se stvaraju askospore (Roberts i Dunegan, 1924; Terui i Harada, 1966; Willetts i Harada, 1984; Batra, 1991). Nastanak apotecija pojava je karakteristična za vrstu *M. fructicola* (Cvjetković, 2010), posebice u Sjevernoj Americi gdje askospore predstavljaju jedan od glavnih izvora primarnih zaraza koštičavog voća (Hewitt i Leach, 1939; Landgraf i Zehr, 1982; Biggs i Northover, 1985; Hong i sur., 1996). Iako test vijabilnosti konidija nije postavljen u svrhu eventualnog praćenja razvoja apotecija kod vrste *M. fructicola*, do njihove pojave na mumificiranim plodovima nektarine nije došlo. Apotecije se razvijaju samo pri određenim vremenskim uvjetima te samo u određeno vrijeme u godini (Willetts i Harada, 1984; Holtz i sur., 1998), dok do njihovog razvoja ne dolazi na plodovima koji nisu u doticaju s tlom (Holtz i sur., 1998). Pri utvrđivanju izvora primarnog inokula *Monilinia* vrsta, Gell i sur. (2009) te Villarino i sur. (2010) ne bilježe pojavu apotecija u

španjolskim voćnjacima breskve. Iste rezultate kasnije navode i De Cal i sur. (2014), ali su apotecije *M. fructicola* uspjeli proizvesti u laboratorijskim uvjetima. Općenito, u sklopu ovog istraživanja u Hrvatskoj nije utvrđen savršeni stadij fitopatogenih gljiva iz roda *Monilinia*. Ti su nalazi u skladu s navodima kako savršeni stadij nema značajnu ulogu u epidemiologiji smeđe truleži u Hrvatskoj (Cvjetković, 2010). Sukladno tome, takav način prezimljenja vrste *M. fructicola* u Hrvatskoj i u Europi još nema praktični značaj. Ipak, za provjeru te tvrdnje bilo bi potrebno istražiti eventualnu pojavu apotecija na otpalim plodovima u samom nasadu ili inkubirati plodove preko zime u različitim uvjetima i sezonama.

#### 5.4.5. Osjetljivost na fungicide

Provođenje *in vitro* testa rasta micelija na fungicidima podrazumijevalo je određene izmjene u odnosu na referentnu metodologiju. Zbog preciznosti, radijalni porast kolonije mjereno je u četiri smjera, umjesto u dva, a prema iskustvu, metilni alkohol učinkovitije je otapalo referentnih materijala aktivnih tvari. Kako je poznato da hranjivima bogatije podloge mogu omogućiti rast gljiva čak i kod izloženosti višim koncentracijama fungicida (Spiegel i Stammler, 2006), korišten je VA. Promjene i razlike u metodologiji važno je istaknuti i imati u vidu kada se rezultati ovog istraživanja uspoređuju s rezultatima drugih autora.

Metodologija *in vitro* testa rasta kličnih cijevi na fungicidima također je obuhvaćala određene izmjene u odnosu na referentnu. Tako je radi uniformnosti kao hranjiva podloga korišten samo KDA. Iako u svojoj metodologiji Amiri i sur. (2010) te Weber i Hahn (2011) navode kako je postotak prokljalih spora određen nakon 12-16 sati inkubacije na malt agaru (MA) ili na KDA, klične cijevi izolata ispitivanih u ovom istraživanju u tom su razdoblju već prorasle u micelij te nije bilo moguće izmjeriti njihovu duljinu. Četiri sata inkubacije u uvjetima opisanim u poglavlju 3.8.5.3. *In vitro test rasta kličnih cijevi na fungicidima* pokazalo se optimalnim za mjerenje duljine kličnih cijevi, pri čemu su pojedinačne klične cijevi konidija bile jasno vidljive. Osim toga, Amiri i sur. (2010) navode kako se konidija smatrala prokljalom kada je duljina klične cijevi bila dvostruko veća od same konidije. Takva metodologija podrazumijeva istovremeno mjerenje i kličnih cijevi i samih konidija, čime je otežan ionako zahtjevan postupak mjerenja kličnih cijevi. Kako takav pristup posljedično isključuje klične cijevi manje duljine te za koje se ne može tvrditi da nisu prokljale, on se ujedno može smatrati i pristranim. Iz tih su razloga u ovom istraživanju klične cijevi mjerene nasumično, bez obzira na njihovu duljinu u odnosu na samu konidiju. Kako nije bilo naznaka pojave alternativne respiracije kod izloženosti vanjskim inhibitorima kvinona, u hranjivu podlogu nije dodavan SHAM.

U Republici Hrvatskoj je na osnovi fenbukonazola, difenkonazola i tebukonazola za suzbijanje paleži i smeđe truleži koštičavog voća registrirano pet sredstava za zaštitu bilja, samostalno ili u kombinaciji s drugim fungicidima (Ministarstvo poljoprivrede, 2019). Kako i FRAC (2020) navodi da je kod istih patogena moguća pojava unakrsne rezistentnosti unutar ove skupine fungicida, osjetljivost *Monilinia* vrsta na ova tri fungicida promatrana je pojedinačno, ali i u cjelini. U *in vitro* testu rasta micelija (May-De Mio i sur., 2011) određene su EC<sub>50</sub> vrijednosti svih izolata *Monilinia* vrsta na fenbukonazol, difenkonazol i tebukonazol. Tako su EC<sub>50</sub> vrijednosti populacije *Monilinia* vrsta na triazole bile vrlo slične, a kretale su se u rasponu od 0,001 do 0,020 µg/ml za fenbukonazol, od 0,001 do 0,023 µg/ml za difenkonazol te od 0,001 do 0,019 µg/ml za tebukonazol. Cox i sur. (2007) te May-De Mio i sur. (2011) navode kako se EC<sub>50</sub> vrijednost za *M. fructicola* ≥ 0,3 µg propikonazola/ml može smatrati graničnom dozom između osjetljivih i rezistentnih izolata. Iz rezultata je vidljivo kako za niti jedan hrvatski *Monilinia* spp. izolat nije utvrđena EC<sub>50</sub> vrijednost ≥ 0,3 µg/ml. S druge strane, koristeći istu diskriminatornu metodu, May-De Mio i sur. (2011) utvrđuju kako je 15,8 % izolata *M. fructicola* iz Brazila bilo rezistentno na tebukonazol. Pri tome se raspon EC<sub>50</sub> vrijednosti kretao od 0,01 do 10,2 µg/ml, dok nekoliko godina ranije u Brazilu nisu utvrđeni rezistentni izolati. Ipak, potrebno je napomenuti kako se tebukonazol u brazilskim nasadima koštičavog voća za suzbijanje fitopatogenih gljiva roda *Monilinia* koristi već četvrt stoljeća, od 1995. godine (May-De Mio i sur., 2011). Osim raspona EC<sub>50</sub> vrijednosti *Monilinia* spp. na određeni fungicid iz skupine triazole, u sklopu ovog je istraživanja određena i prosječna EC<sub>50</sub> vrijednost pojedine *Monilinia* vrste. Za *M. laxa*, prosječne EC<sub>50</sub> vrijednosti na fenbukonazol, difenkonazol i tebukonazol iznosile su 0,006, 0,004 i 0,007 µg/ml, za *M. fructigena* 0,005, 0,010 i 0,008 µg/ml te za *M. fructicola* 0,005, 0,009 i 0,008 µg/ml. Hrustić i sur. (2018) u Srbiji određuju raspon EC<sub>50</sub> vrijednosti za *M. laxa* i *M. fructicola* na tebukonazol. Utvrđuju kako su se EC<sub>50</sub> vrijednosti za *M. laxa* kretale od 0,01 do 0,02 µg/ml, dok su EC<sub>50</sub> vrijednosti hrvatskih izolata *M. laxa* bile u rasponu od 0,005 do 0,009 µg/ml. U ovom je istraživanju utvrđen raspon EC<sub>50</sub> vrijednosti za *M. fructicola* na tebukonazol od 0,002 do 0,015 µg/ml, dok su izolati iz Srbije bili 10 puta manje osjetljivi s rasponom od 0,02 do 0,15 µg/ml (Hrustić i sur., 2018). Schnabel i sur. (2004) nalaze kako su se EC<sub>50</sub> vrijednosti za *M. fructicola* na propikonazol u SAD-u kretale od 0,001 do 0,950 µg/ml, dok su u ovom istraživanju EC<sub>50</sub> vrijednosti *M. fructicola* bile niže te su se kretale u rasponu od 0,001 do 0,020 µg/ml za fenbukonazol, od 0,02 do 0,021 µg/ml za difenkonazol te od 0,002 do 0,015 za tebukonazol. Iako su istraživanjem osjetljivosti *M. fructicola* na fenbukonazol u SAD-u određene EC<sub>50</sub> vrijednosti u rasponu od 0,003 do 0,129 µg/ml, za jedan je izolat utvrđeno da je rezistentan (Janisiewicz i sur., 2013). Iz rezultata je vidljivo kako u Hrvatskoj nije utvrđena smanjena osjetljivost vrsta *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* na fungicide

iz skupine triazola, a rezistentnost nije utvrđena ni prema metodologiji kod koje se izolati smatraju rezistentnima na propikonazol kada je prosječan rast micelija  $\geq 20\%$  na diskriminatornoj dozi od  $0,3\ \mu\text{g/ml}$  (Chen i sur., 2013b). Ipak, kako bi se utvrdio stupanj osjetljivosti hrvatskih izolata, dobivene je  $EC_{50}$  vrijednosti moguće usporediti s dostupnim  $EC_{50}$  vrijednostima izolata koji nikada nisu bili izloženi fungicidima iz skupine triazola te predstavljaju populacije osnovne osjetljivosti (eng. *baseline sensitivity population*). Vrijednosti  $EC_{50}$  svih hrvatskih *Monilinia* spp. izolata na triazole bile su u rasponu od  $0,001$  do  $0,023\ \mu\text{g/ml}$ , unutar čega je raspon  $EC_{50}$  vrijednosti vrste *M. fructicola* na triazole iznosio od  $0,001$  do  $0,021\ \mu\text{g/ml}$ . Vrijednosti  $EC_{50}$  za *M. fructicola* osnovne osjetljivosti iz SAD-a kretale su se u rasponu od  $0,02$  do  $0,15\ \mu\text{g/ml}$  (Zehr i sur., 1999), od  $0,012$  do  $0,054\ \mu\text{g/ml}$  (Schnabel i sur., 2004) te od  $0,001$  do  $0,061\ \mu\text{g/ml}$  (Yoshimura i sur., 2004). Holb i Schnabel (2007) za jedan izolat *M. fructicola* osnovne osjetljivosti navode  $EC_{50}$  vrijednosti od  $0,023\ \mu\text{g/ml}$  za propikonazol,  $0,018\ \mu\text{g/ml}$  za tebukonazol i  $0,019\ \mu\text{g/ml}$  za fenbukonazol. Vidljivo je kako je osjetljivost hrvatskih izolata sve tri *Monilinia* vrste na fungicide iz skupine triazola usporediva s izolatima osnovne osjetljivosti, unatoč činjenici da su u ovom istraživanju izolati potjecali iz komercijalnih nasada koji se nalaze u sustavu konvencionalne ili integrirane zaštite bilja.

Za suzbijanje *Monilinia* vrsta na koštičavom voću, u Hrvatskoj je registrirano jedno sredstvo za zaštitu bilja na osnovi aktivne tvari tiofanat-metil (Ministarstvo poljoprivrede, 2019). Tiofanat-metil pripada skupini metil benzimidazol karbamata, fungicida s jednostrukim djelovanjem u metabolizmu gljiva, kod koje postoji visoki rizik od razvoja rezistentnosti (FRAC, 2020) te je unutar skupine gotovo uvijek prisutna i pojava unakrsne rezistentnosti (Brent i Hollomon, 2007). Prvi zabilježeni slučajevi pojave rezistentnosti u svijetu kod vrste *M. fructicola* na fungicid iz skupine metil benzimidazol karbamata, benomil, datiraju još od sedamdesetih godina prošlog stoljeća (Jones i Ehret, 1976; Whan, 1976). Istraživanje prosječne osjetljivosti hrvatskih populacija vrsta *M. laxa* ( $EC_{50} = 0,164\ \mu\text{g/ml}$ ) i *M. fructigena* ( $EC_{50} = 0,214\ \mu\text{g/ml}$ ) pokazalo je kako je njihova osjetljivost na tiofanat-metil bila gotovo izjednačena. May-De Mio i sur. (2011) navode kako su izolati iz Brazila smatrani visoko rezistentnima kod  $EC_{50} > 162\ \mu\text{g/ml}$ , nisko rezistentnima kod  $EC_{50}$  između  $1,99$  i  $12,5\ \mu\text{g/ml}$  te osjetljivima kod  $EC_{50} < 1\ \mu\text{g/ml}$ , dok se općenito svi izolati s  $EC_{50}$  između  $1$  i  $2\ \mu\text{g/ml}$  mogu smatrati manje osjetljivima. Slijedeći takvu podjelu, svi bi se hrvatski *M. laxa* i *M. fructigena* izolati mogli svrstati u osjetljive na tiofanat-metil. Za razliku od Hrvatske, izolati *M. laxa* smanjene osjetljivosti na metil benzimidazol karbamate identificirani su u SAD-u (Ma i sur., 2005), Grčkoj (Malandrakis i sur., 2012) i Španjolskoj (Egüen i sur., 2016). Raspon  $EC_{50}$  vrijednosti hrvatske populacije vrste *M. fructicola* kretao se od  $0,229$  do  $5,754\ \mu\text{g/ml}$ , dok je prosječna  $EC_{50}$  vrijednost iznosila  $1,806\ \mu\text{g/ml}$ . Od ukupno 10 izolata vrste *M.*



*fructicola*, kod polovice je utvrđena EC<sub>50</sub> vrijednost < 1 µg/ml te se mogu smatrati osjetljivima. Međutim, kod druge je polovice izolata utvrđena EC<sub>50</sub> vrijednost > 1 µg/ml, što ih prema podjeli koju navode May-De Mio i sur. (2011) čini neosjetljivima. Kod četiri je izolata EC<sub>50</sub> vrijednost bila > 1,99 µg/ml te je iznosila 5,754 µg/ml (NS 30/13), 3,631 µg/ml (ZG 26/13), 2,570 µg/ml (VD 4/13) i 2,399 µg/ml (PO 129/13). Prema May-De Mio i sur. (2011), ti se *M. fructicola* izolati mogu smatrati nisko rezistentnima, jednako kao i prema podjeli koju navode Amiri i sur. (2008). Dva su moguća scenarija koja su mogla dovesti do pojave rezistentnih izolata vrste *M. fructicola* na tiofanat-metil u Hrvatskoj. Iako je *M. fructicola* prvi puta u Hrvatskoj identificirana na plodovima breskve i nektarine 2012. godine, zbog nedostatka podataka o bioraznojkosti populacija *Monilinia* vrsta prije te godine, ne može se isključiti mogućnost kako je ona na ovom području ipak prisutna duže razdoblje. Obzirom da na temelju biologije i simptoma smeđe truleži na plodovima u nasadu nije moguće utvrditi o kojoj se *Monilinia* vrsti radi (Van Leeuwen, 2000; Hrustić i sur., 2015), prisutnost vrste *M. fructicola* mogla je proći neopaženo kod proizvođača, ali i kod stručnjaka zaštite bilja. Ako pretpostavimo kako se ona u Hrvatskoj udomačila puno prije prvog nalaza, u nasadima s konvencionalnim sustavima zaštite bilja moglo je doći do pojave jedinki koje su razvile mehanizme rezistentnosti na tiofanat-metil. Strategiju sprječavanja pojave rezistentnosti potrebno je prilagoditi genetskoj predispoziciji patogena, ali i sklonosti fungicida da potakne pojavu rezistentnosti u patogenu. Poznato je kako upravo vrsta *M. fructicola*, u usporedbi s drugim *Monilinia* vrstama, pokazuje najveću sposobnost prilagodbe na izloženost fungicidima (Schnabel i Dai, 2004; Luo i Schnabel, 2008), a FRAC (2020) navodi kako postoji visoki rizik od razvoja rezistentnosti patogena na skupinu metil benzimidazol karbamata. Kod vrste *M. fructicola*, dokazana je i višestruka rezistentnost na metil benzimidazol karbamate i triazole u SAD-u (Chen i sur., 2013a), što u praksi još više otežava suzbijanje ovog patogena te onemogućava provedbu učinkovite strategije sprječavanja pojave rezistentnosti. Osim primjene sredstava za zaštitu bilja različitog mehanizma djelovanja, antirezistentna strategija podrazumijeva i poštivanje propisanih uvjeta primjena, u vidu količine sredstva za zaštitu bilja ili broja primjena u vegetacijskoj sezoni. Poštivanje propisanih uvjeta primjene u praksi često izostane, što može dovesti do pojave smanjene osjetljivosti ili rezistentnosti patogena. U Hrvatskoj se fungicidi iz skupine metil benzimidazol karbamata, za suzbijanje *Monilinia* vrsta na koštičavom voću, primjenjuju još od polovice sedamdesetih godina prošlog stoljeća (Kišpatić i sur., 1976). Uzevši u obzir da je rezistentnost vrste *M. fructicola* na benzimidazole stabilna i dugotrajna (Jones i Ehret, 1976; Whan, 1976; Michailides i sur., 1987; Penrose, 1990; Zehr i sur., 1991; Sanoamuang i Gaunt, 1995; Ma i sur., 2003b; Yoshimura i sur., 2004; Luo i Schnabel, 2008; May-De Mio i sur., 2011; Weger i sur., 2011; Chen i sur., 2013a; Egüen i sur., 2015), bilo je

za očekivati da će i u populaciji vrsta *M. fructigena* i *M. laxa* biti nađeni izolati smanjene osjetljivosti ili rezistentnosti na tu skupinu fungicida. Kako to nije utvrđeno, postavlja se pitanje kako je rezistentnost ili smanjena osjetljivost na tiofanat-metil zabilježena kod invazivne i u Hrvatskoj relativno „nove“ vrste *M. fructicola*. Ne može se isključiti mogućnost kako su na ove prostore ušle jedinice vrste *M. fructicola* koje su već razvile mehanizme rezistentnosti na metil benzimidazol karbamate. *Monilinia fructicola* udomaćena je vrsta i gospodarski najznačajnija *Monilinia* vrsta u zemljama „Novog svijeta“ (Corbin, 1963; Byrde i Willetts, 1977; Landgraf i Zehr, 1982; Biggs i Northover, 1985; Biggs i Northover, 1988; Cruickshank i Wade, 1992; Ogawa i sur., 1995; Zhu i sur., 2011). Danas je poznato kako je *M. fructicola* u Europu ušla upravo iz SAD-a (Jänsch i sur., 2012), gdje su nalazi njene rezistentnosti na fungicide iz skupine metil benzimidazol karbamata brojni (Jones i Ehret, 1976; Michailides i sur., 1987; Zehr i sur., 1991; Ma i sur., 2003b; Yoshimura i sur., 2004; Amiri i sur., 2008; Luo i Schnabel, 2008; Chen i sur., 2013a). Rezistentnost *M. fructicola* na benzimidazole prisutna je i u drugim zemljama „Novog svijeta“, kao što su Australija (Whan, 1976; Penrose, 1990), Brazil (May-De Mio i sur., 2011) i Novi Zeland (Sanoamuang i Gaunt, 1995). Rezistentne populacije vrste *M. fructicola* utvrđene su i u drugim europskim zemljama (Weger i sur., 2011; Egüen i sur., 2015), desetak godina nakon prvog nalaska u Francuskoj (EPPO, 2002). Takvi nalazi mogu upućivati na sposobnost bržeg razvoja rezistentnosti kod vrste *M. fructicola*, u odnosu na vrste *M. laxa* i *M. fructigena*. Relativno česti nalazi rezistentnosti vrste *M. fructicola* na benzimidazole širom svijeta (Jones i Ehret, 1976; Whan, 1976; Michailides i sur., 1987; Penrose, 1990; Zehr i sur., 1991; Sanoamuang i Gaunt, 1995; Ma i sur., 2003b; Yoshimura i sur., 2004; Luo i Schnabel, 2008; May-De Mio i sur., 2011; Weger i sur., 2011; Chen i sur., 2013a; Egüen i sur., 2015) mogu ići u prilog toj tvrdnji. U Hrvatskoj je već dokazana smanjena učinkovitost fungicida iz skupine metil benzimidazol karbamata na vrstu *Cercospora beticola* Sacc. (Cvjetković i sur., 1987; Tomić, 1993) te rezistentnost vrste *B. cinerea in vitro* (Miličević, 2005). Obzirom na ove nalaze u Hrvatskoj i svijetu te vidljivom povećanju učestalosti vrste *M. fructicola* u hrvatskim nasadima koštičavog voća, u praksi je potrebno obratiti posebnu pozornost na učinkovitost sredstava za zaštitu bilja iz skupine metil benzimidazol karbamata na gljive roda *Monilinia*.

Za suzbijanje *Monilinia* vrsta na koštičavom voću, u Hrvatskoj je registrirano jedno sredstvo za zaštitu bilja na osnovi fenheksamida (Ministarstvo poljoprivrede, 2019). Prema EC<sub>50</sub> vrijednostima, svi su testirani izolati *Monilinia* spp. bili osjetljivi na fenheksamid. Na temelju raspona srednjih učinkovitih koncentracija, određena je i prosječna EC<sub>50</sub> vrijednost za pojedinu *Monilinia* vrstu. Malandrakis i sur. (2013) u Grčkoj utvrđuju raspon EC<sub>50</sub> vrijednosti za *M. laxa* od 0,02 do 1,00 µg/ml, s prosječnom EC<sub>50</sub> vrijednosti od 0,1 µg/ml, a Abate i sur. (2018) u južnoj Italiji raspon od 0,1 do 0,3 µg/ml. U Hrvatskoj je za *M. laxa* utvrđen raspon

od 0,081 do 0,380  $\mu\text{g/ml}$ , s prosječnom  $\text{EC}_{50}$  vrijednosti od 0,229  $\mu\text{g/ml}$ . Za usporedbu, raspon srednjih učinkovitih koncentracija *M. fructigena* iz Hrvatske iznosio je od 0,195 do 0,631  $\mu\text{g/ml}$ , s prosječnom  $\text{EC}_{50}$  vrijednosti od 0,391  $\mu\text{g/ml}$ , a za *M. fructicola* od 0,013 do 0,468  $\mu\text{g/ml}$  (prosječna  $\text{EC}_{50}$  vrijednost 0,256  $\mu\text{g/ml}$ ). Vrste *M. fructigena* i *M. fructicola* iz južne Italije pokazale su se manje osjetljivima od onih iz Hrvatske, s rasponom  $\text{EC}_{50}$  vrijednosti između 0,3 i 1  $\mu\text{g/ml}$  (Abate i sur., 2018). U Kaliforniji, Förster i sur. (2007) utvrđuju raspon  $\text{EC}_{50}$  vrijednosti za *M. fructicola* od 0,009 do 0,021  $\mu\text{g/ml}$ , s prosječnom vrijednošću od 0,015  $\mu\text{g/ml}$ . Gledajući prosječne vrijednosti, sve su se tri *Monilinia* vrste u Hrvatskoj pokazale manje osjetljivima na fenheksamid od *M. laxa* u Grčkoj. Međutim, najveća utvrđena  $\text{EC}_{50}$  vrijednost za *M. laxa* u Hrvatskoj (0,380  $\mu\text{g/ml}$ ), bila je niža od one utvrđene u Grčkoj (1,00  $\mu\text{g/ml}$ ), jednako kao i za *M. fructigena* (0,631  $\mu\text{g/ml}$ ) i *M. fructicola* (0,468  $\mu\text{g/ml}$ ), ali podjednaka najvećoj  $\text{EC}_{50}$  vrijednosti za *M. laxa* u južnoj Italiji (Abate i sur., 2018). Izolati vrste *M. fructicola* iz Kalifornije pokazali su se osjetljivijim od izolata *M. fructicola* iz Hrvatske, ali su se  $\text{EC}_{50}$  vrijednosti kretale unutar manjeg raspona. Očito je kako je reakcija hrvatskih izolata *M. fructicola* na fenheksamid bila manje homogena, a isto je moguće ustvrditi i za hrvatske izolate *M. laxa* i *M. fructigena*. Razlike u osjetljivosti izolata iz Hrvatske i SAD-a mogle bi biti posljedica primjene različite metodologije u *in vitro* testu rasta micelija. Naime, Förster i sur. (2007) koriste SGD metodu (eng. *spiral gradient dilution* – SGD) u kojoj u istoj Petrijevoj zdjelici raste dva do četiri različita izolata (Förster i sur., 2004). Ipak, općenito gledajući, fenheksamid je pokazao zadovoljavajuću razinu učinkovitosti na *Monilinia* vrste iz Hrvatske, pri čemu nisu identificirani izolati sa smanjenom osjetljivošću. Iako u svijetu još nije utvrđena rezistentnost *Monilinia* vrsta na fenheksamid, smanjena osjetljivost srodne vrste *B. cinerea* na fenheksamid zabilježena je za izolate porijeklom iz Grčke (Myresiotis i sur., 2007), Francuske (Fillinger i sur., 2008), Njemačke (Fillinger i sur., 2008; Weber, 2010), Čilea (Esterio i sur., 2011) i SAD-a (Moorman i sur., 2012), ali ne na koštičavom voću. Bez obzira na nalaze rezistentnosti fitopatogenih vrsta gljiva, fenheksamid se smatra fungicidom niskog do srednje niskog rizika od razvoja rezistentnosti (FRAC, 2020).

Za suzbijanje *Monilinia* vrsta na koštičavom voću, u Republici Hrvatskoj je, u kombinaciji s aktivnom tvari piraklostrobin, registrirano jedno sredstvo za zaštitu bilja na osnovi aktivne tvari boskalid (Ministarstvo poljoprivrede, 2019). Kako je poznato inhibitorno djelovanje boskalida na klijanje spora (Bartlett i sur., 2002), ali i na druge razvojne stadije fitopatogenih vrsta gljiva (Stammler i sur., 2007; Myresiotis i sur., 2008), u sklopu ovog je istraživanja proveden *in vitro* test rasta micelija (May-De Mio i sur., 2011) te *in vitro* test rasta kličnih cijevi (Amiri i sur., 2010) na boskalidu. Primjena različitih metodologija pri utvrđivanju srednjih učinkovitih koncentracija omogućila je usporedbu inhibitornih učinaka boskalida na

rast micelija i klijanje spora *Monilinia* vrsta. Utvrđene EC<sub>50</sub> vrijednosti kod vrste *M. laxa* u testu rasta micelija kretale su se u rasponu od 0,028 do 0,145 µg/ml, dok je prosječna EC<sub>50</sub> vrijednost iznosila 0,060 µg/ml. Kod vrste *M. fructigena*, raspon EC<sub>50</sub> vrijednosti iznosio je od 0,031 do 0,316 µg/ml, s prosječnom vrijednosti od 0,115 µg/ml. Najmanje inhibitorno djelovanje boskalida utvrđeno je kod vrste *M. fructicola*, pri čemu je prosječna EC<sub>50</sub> vrijednost iznosila 0,165 µg/ml, dok se raspon utvrđenih vrijednosti kretao od 0,008 do 0,430 µg/ml. Hrustić i sur. (2018) u Srbiji navode slične rezultate usporedbe osjetljivosti te također nalaze kako se *M. laxa* pokazala osjetljivijom na boskalid od *M. fructicola*. Utvrđuju raspon EC<sub>50</sub> vrijednosti od 0,04 do 0,07 µg/ml za *M. laxa* te od 39,29 do 1419,31 µg/ml za *M. fructicola*, s prosječnom vrijednošću od čak 400,73 µg/ml. Takvi rezultati upućuju na pojavu rezistentnosti nekih izolata vrste *M. fructicola* u Srbiji, no posljedice rezistentnosti u poljskim uvjetima za sada nisu zabilježene (Hrustić i sur., 2018). Amiri i sur. (2010) navode kako su se EC<sub>50</sub> vrijednosti za izolate vrste *M. fructicola* osnovne osjetljivosti iz SAD-a kretale u rasponu od 0,82 do 2,85 µg/ml, s prosječnom EC<sub>50</sub> vrijednosti od 2,23 ± 0,76 µg/ml. Amiri i sur. (2010) navode i podatke o prosječnoj osjetljivosti populacije *M. fructicola* koja je bila izložena fungicidima iz Južne Karoline (10,7 ± 4,7 µg/ml) i Georgije (8,91 ± 4,8 µg/ml). Vidljivo je kako su se hrvatski izolati *Monilinia* vrsta pokazali osjetljivijima čak i od izolata iz SAD-a koji nikada nisu bili izloženi boskalidu. Kako je kod tri izolata *M. laxa*, jednog izolata *M. fructigena* i pet izolata *M. fructicola* najniži postotak inhibicije rasta kličnih cijevi iznosio > 80 %, određena je EC<sub>50</sub> vrijednost niža od najniže testirane. Za razliku od testa rasta micelija, u *in vitro* testu rasta kličnih cijevi najosjetljivijom se vrstom pokazala *M. fructicola*. Vrijednosti EC<sub>50</sub> izolata vrste *M. fructicola* osnovne osjetljivosti iz SAD-a iznosile su od 0,91 do 3,17 µg/ml, s prosječnom vrijednosti od 1,97 ± 0,77 µg/ml (Amiri i sur., 2010). Isti autori navode i prosječne EC<sub>50</sub> vrijednosti izolata vrste *M. fructicola* koji su bili izloženi fungicidima; 6,4 ± 3,1 µg/ml za izolate iz Južne Karoline te 4,63 ± 2,9 µg/ml za izolate iz Georgije. U testu rasta kličnih cijevi, boskalid je također pokazao veće inhibitorno djelovanje na hrvatske izolate *Monilinia* vrsta u usporedbi s izolatima vrste *M. fructicola* osnovne osjetljivosti iz SAD-a (Amiri i sur., 2010). U usporedbi s inhibicijom rasta micelija, boskalid je pokazao veće inhibitorno djelovanje na klijanje spora kod sve tri *Monilinia* vrste. Takvi su rezultati u skladu s rezultatima koje navode Amiri i sur. (2010), ali i rezultatima istraživanja drugih fitopatogenih vrsta gljiva iz porodice Sclerotiniaceae (Zhang i sur., 2007; Myresiotis i sur., 2008; Weber i Hahn, 2011). Međutim, Spiegel i Stammler (2006) nalaze kako je boskalid kod izolata vrsta *M. laxa* i *M. fructigena* različitog podrijetla u većoj mjeri inhibirao rast micelija, dok je inhibicija klijanja spora bila manja. Prema metodologiji koju opisuju Chen i sur. (2013b), izolati *M. fructicola* s EC<sub>50</sub> vrijednosti ≤ 0,72 µg/ml mogu se smatrati osjetljivima na boskalid. Slijedeći takav pristup, svi su se *M. fructicola*, ali i *M. laxa* i *M.*

*fructigena* izolati u oba testa u ovom istraživanju pokazali osjetljivima na boskalid. Izolati *M. fructicola* rezistentni na boskalid identificirani su na breskvi u SAD-u, čak i kod jedinki iz populacije osnovne osjetljivosti (Chen i sur., 2013b). Amiri i sur. (2010) u SAD-u zapažaju kako su se prosječne EC<sub>50</sub> vrijednosti na boskalid kod vrste *M. fructicola* značajno povećale tijekom godina. Kako bi se utvrdilo da li i u Hrvatskoj dolazi do promjene u osjetljivosti populacija *Monilinia* vrsta na boskalid, istraživanje osjetljivosti potrebno je provesti i za nekoliko godina. U prilog tome idu i nalazi rezistentnih populacija srodne vrste *B. cinerea* u svijetu (Kim i Xiao, 2010; Leroch i sur., 2011; Weber i Hahn, 2011; Fernández-Ortuño i sur., 2016a).

Fluopiram je relativno nova aktivna tvar, koja je u Hrvatskoj za suzbijanje *Monilinia* vrsta na koštičavom voću registrirana u kombinaciji s aktivnom tvari tebukonazol, a na tržištu se nalazi od 2015. godine (Ministarstvo poljoprivrede, 2019). Kao i kod boskalida, u sklopu ovog je istraživanja ispitivana osjetljivost *Monilinia* vrsta na fluopiram u *in vitro* testu rasta micelija (May-De Mio i sur., 2011) te u *in vitro* testu rasta kličnih cijevi (Amiri i sur., 2010). Srednje učinkovite koncentracije kod vrste *M. laxa* u *in vitro* testu rasta micelija kretale su se u rasponu od 0,048 do 0,126 µg/ml, s prosječnom EC<sub>50</sub> vrijednosti od 0,085 µg/ml. U istraživanju u Srbiji utvrđen je raspon od 0,11 do 2,99 µg/ml, s prosječnom EC<sub>50</sub> vrijednosti od 0,87 µg/ml (Hrustić i sur., 2018), ukazujući na manju osjetljivost u odnosu na izolate *M. laxa* iz Hrvatske. Hrvatski izolati vrste *M. fructicola* također su se pokazali osjetljivijim od onih iz Srbije (Hrustić i sur., 2018). Tako je raspon EC<sub>50</sub> vrijednosti u testu rasta micelija hrvatskih izolata iznosio od 0,162 do 0,327 µg/ml, s prosječnom vrijednošću od 0,234 µg/ml za *M. fructicola*, dok je prosječna EC<sub>50</sub> vrijednost srbijanskih izolata *M. fructicola* iznosila čak 63,97 µg/ml, s rasponom od 1,22 do 386,56 µg/ml (Hrustić i sur., 2018). Oba su istraživanja rasta micelija na fluopiramu pokazala kako je *M. laxa* osjetljivija na fluopiram od *M. fructicola*. Ipak, dok su u Srbiji identificirani izolati *M. fructicola* umjereno rezistentni na fluopiram, rezultati ovog istraživanja pokazuju kako to nije bio slučaj kod hrvatskih izolata. Osjetljivost hrvatskih izolata vrste *M. fructigena* bila je u rasponu EC<sub>50</sub> vrijednosti od 0,046 do 0,186 µg/ml, s prosječnom vrijednošću od 0,106 µg/ml, što je čini manje osjetljivom od *M. laxa*. Slične rezultate navode Abate i sur. (2018) koji nalaze kako se u južnoj Italiji *M. fructigena* pokazala manje osjetljivom na fluopiram od *M. laxa*. *In vitro* test rasta kličnih cijevi na fluopiramu pokazao je drugačiji odnos osjetljivosti *Monilinia* vrsta iz Hrvatske. *Monilinia fructicola* pokazala se kao najmanje osjetljiva *Monilinia* vrsta u *in vitro* testu rasta micelija na fluopiramu, dok rezultati *in vitro* testa rasta kličnih cijevi pokazuju drugačije rezultate. Naime, tu se *M. fructicola* pokazala kao najosjetljivija vrsta s prosječnom EC<sub>50</sub> vrijednosti od < 0,045 µg/ml i rasponom osjetljivosti od 0,0002 do 0,105 µg/ml. *Monilinia laxa* bila je druga najosjetljivija *Monilinia* vrsta te su se EC<sub>50</sub> vrijednosti kretale u rasponu od 0,018 do

0,479 µg/ml, s prosječnom vrijednošću od < 0,092 µg/ml. Najmanje osjetljivom pokazala se vrsta *M. fructigena*, s prosječnom EC<sub>50</sub> vrijednosti od 0,292 µg/ml i rasponom od 0,0004 do 0,933 µg/ml. Zanimljivo je kako su se na istom fungicidu neki izolati u jednom tipu testa pokazali kao najosjetljiviji, a istovremeno kao najmanje osjetljivi u drugom. Ipak, fluopiram je u oba testa uspješno inhibirao rast micelija i klijanje spora svih izolata *Monilinia* vrsta. Iako Fernández-Ortuño i sur. (2017) ne nalaze rezistentne izolate *B. cinerea* na jagodi u Španjolskoj, Amiri i sur. (2017) u SAD-u na jabuci utvrđuju rezistentnost *B. cinerea* na fluopiram, pri čemu je učestalost rezistentnih izolata iznosila 2,1 %.

Fludioksonil je na hrvatskom tržištu za suzbijanje *Monilinia* vrsta na koštičavom voću registriran u kombinaciji s aktivnom tvari ciprodinil (Ministarstvo poljoprivrede, 2019). Općenito, svi istraživani izolati pokazali su se osjetljivima na taj fungicid. U usporedbi s *M. laxa* i *M. fructigena*, vrsta *M. fructicola* bila je najosjetljivija na fludioksonil s prosječnom EC<sub>50</sub> vrijednosti < 0,002 µg/ml, obzirom na raspon od 0,0001 do 0,005 µg/ml. Förster i sur. (2007) utvrđuju prosječnu EC<sub>50</sub> vrijednost od 0,01 µg/ml na kalifornijskim izolatima *M. fructicola*, koje su se kretale u rasponu od 0,005 do 0,021 µg/ml. Abate i sur. (2018) navode kako je fludioksonil imao vrlo učinkovito djelovanje na južnotalijanske izolate *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola*, s rasponom EC<sub>50</sub> vrijednosti od 0,01 do 0,03 µg/ml. Vidljivo je kako su se *Monilinia* spp. izolati u ovom te u druga dva istraživanja (Förster i sur., 2007; Abate i sur., 2018) pokazali osjetljivima na fludioksonil, iako se metodologija razlikovala. Naime, Förster i sur. (2007) primjenjuju već spomenutu SGD metodu *in vitro* rasta micelija na fungicidu (Förster i sur., 2004), a Abate i sur. (2018) uobičajenu metodu rasta micelija. U ovom je istraživanju metodologija podrazumijevala utvrđivanje inhibicije rasta kličnih cijevi (Weber i Hahn, 2011). Iako fludioksonil djeluje na način da inhibira rast micelija i klijanje spora (Hilber, 1992; Leroux i Descotes, 1996; Zhao i sur., 2010), neki autori navode kako djelovanje fludioksonila na klijanje spora nije toliko učinkovito kao djelovanje na rast micelija (Förster i sur., 2004; Förster i sur., 2007). Međutim, kada usporedimo rezultate osjetljivosti, vidljivo je kako su EC<sub>50</sub> vrijednosti za vrstu *M. fructicola* utvrđene u ovom istraživanju testom rasta kličnih cijevi, bile niže od onih utvrđenih u Kaliforniji testom rasta micelija. Hrvatski *Monilinia* spp. izolati pokazali su i nešto veću osjetljivost od izolata iz južne Italije. Ipak, u svrhu adekvatne usporedbe, ova je dva testa potrebno provesti na istim *Monilinia* spp. izolatima. Iako u svijetu još nije zabilježena pojava rezistentnosti gljiva roda *Monilinia* na fludioksonil, rezistentnost je zabilježena na vrsti *B. cinerea* (Leroch i sur., 2011; Fernández-Ortuño i sur., 2016b; Ren i sur., 2016), ali ne za izolate koji potječu s koštičavog voća.

Piraklostrobin i trifloksistrobin fungicidi su koji su u Republici Hrvatskoj registrirani za suzbijanje *Monilinia* vrsta na koštičavom voću u kombinaciji s drugim fungicidima. Tako je

piraklostrobin formuliran s boskalidom, dok se trifloksistrobin na tržištu može naći u kombinaciji s tebukonazolom (Ministarstvo poljoprivrede, 2019). U sklopu ovog je istraživanja ispitivana osjetljivost *Monilinia* vrsta u *in vitro* testu rasta kličnih cijevi na piraklostrobinu i trifloksistrobinu (Amiri i sur., 2010). Utvrđene srednje učinkovite koncentracije za *M. laxa* kretale su se u rasponu od 0,000004 do 0,003 µg/ml za piraklostrobin te od 0,00004 do 0,005 µg/ml za trifloksistrobin. U Srbiji, Hrustić i sur. (2018) istražuju osjetljivost vrste *M. laxa* na azoksistrobin, aktivnu tvar iz iste skupine fungicida. Nalaze kako su se EC<sub>50</sub> vrijednosti kretale u rasponu od 0,51 do 3,35 µg/ml, pri čemu je izolat s najvišom EC<sub>50</sub> vrijednosti klasificiran kao umjereno rezistentan, dok su se ostali pokazali osjetljivima. Abate i sur. (2018) u južnoj Italiji istražuju osjetljivost *Monilinia* vrsta na piraklostrobin te aktivnu tvar iz iste skupine, mandestrobin. Autori utvrđuju kako se upravo *M. laxa* pokazala kao najosjetljivija *Monilinia* vrsta na piraklostrobin i mandestrobin, s prosječnim EC<sub>50</sub> vrijednostima od 0,1 i 0,03 µg/ml, dok su prosječne EC<sub>50</sub> vrijednosti hrvatskih izolata *M. laxa* iznosile 0,001 µg/ml za piraklostrobin i trifloksistrobin. Raspon EC<sub>50</sub> vrijednosti hrvatskih izolata vrsta *M. fructigena* kretao se od 0,0002 do 0,031 µg/ml za trifloksistrobin te od 0,0002 do 0,027 µg/ml za piraklostrobin, dok su prosječne EC<sub>50</sub> vrijednosti za vrstu iznosile 0,01 i 0,004 µg/ml. Prosječna EC<sub>50</sub> vrijednost vrste *M. fructicola* za trifloksistrobin iznosila je < 0,003 µg/ml, a za piraklostrobin 0,001 µg/ml. Vrijednosti EC<sub>50</sub> izolata *M. fructicola* na trifloksistrobin kretale su se u rasponu od 0,00006 do 0,013 µg/ml, a na piraklostrobin od 0,0002 do 0,005 µg/ml. U istraživanju u Srbiji utvrđen je raspon EC<sub>50</sub> vrijednosti za vrstu *M. fructicola* na azoksistrobin koji je iznosio od 4,59 do čak 58,69 µg/ml, pri čemu je sedam izolata klasificirano kao umjereno rezistentno (Hrustić i sur., 2018). Za vrstu *M. fructicola*, Luo i Schnabel (2008) utvrđuju raspon EC<sub>50</sub> vrijednosti od 0,05 do 0,14 µg/ml za azoksistrobin. Potrebno je naglasiti kako su istraživanja osjetljivosti *Monilinia* vrsta u SAD-u, južnoj Italiji i Srbiji provedena prema metodologiji *in vitro* inhibicije rasta micelija na fungicidu (Luo i Schnabel, 2008; Abate i sur., 2018; Hrustić i sur., 2018), što se može smatrati manje prikladnim za aktivne tvari iz skupine strobilurina. Upravo Amiri i sur. (2010) uspoređuju EC<sub>50</sub> vrijednosti vrste *M. fructicola* na azoksistrobinu i piraklostrobinu u *in vitro* testu rasta micelija i testu rasta kličnih cijevi. Kod populacije osnovne osjetljivosti, EC<sub>50</sub> vrijednosti kretale su se u rasponu od 0,05 do 0,6 µg/ml u *in vitro* testu rasta kličnih cijevi, dok je prosječna EC<sub>50</sub> vrijednost za azoksistrobin iznosila 0,15 µg/ml. U testu rasta micelija na azoksistrobinu, vrijednosti su se kretale od 0,09 do 0,27 µg/ml, dok je prosječna EC<sub>50</sub> vrijednost iznosila 0,07 µg/ml. Kod piraklostrobina je prosječna EC<sub>50</sub> vrijednost populacije osnovne osjetljivosti u testu rasta kličnih cijevi iznosila 0,06 µg/ml, prema rasponu EC<sub>50</sub> vrijednosti od 0,02 do 0,18 µg/ml, dok je prosječna EC<sub>50</sub> vrijednost u testu rasta micelija iznosila 0,04 µg/ml, prema rasponu od 0,01 do 0,11 µg/ml. Kod populacija koje su bile

izložene fungicidima nisu utvrđene statistički značajne razlike između EC<sub>50</sub> vrijednosti u testu rasta micelija i testu rasta kličnih cijevi na azoksistrobinu i piraklostrobinu, ali su EC<sub>50</sub> vrijednosti u testu rasta micelija brojčano uvijek bile niže. Amiri i sur. (2010) također utvrđuju unakrsnu rezistentnost izolata *M. fructicola* na azoksistrobin i piraklostrobin, što je u skladu s navodima FRAC-a (2020). Podatak kako su se srednje učinkovite koncentracije vrste *M. fructicola* na azoksistrobin u testu rasta kličnih cijevi u Brazilu kretale u rasponu od 0,05 do 0,63 µg/ml (Pereira i sur., 2017), ukazuje kako su izolati *M. fructicola* iz Hrvatske osjetljiviji. Iako May-De Mio i sur. (2011) u Brazilu ne utvrđuju izolate *M. fructicola* rezistentne na azoksistrobin, zapažaju značajne promjene u osjetljivosti istraživanih populacija u usporedbi s onim povijesnim. U brojnim se istraživanjima osjetljivosti gljiva iz porodice Sclerotiniaceae na fungicide iz skupine vanjskih inhibitora kvinona navodi kako dodatak SHAM-a hranjivoj podlozi značajno inhibira pojavu alternativne respiracije u gljiva, koja može ometati aktivnost samog fungicida (Amiri i sur., 2008; Luo i Schnabel, 2008; Myresiotis i sur., 2008; Amiri i sur., 2010; May-De Mio i sur., 2011; Weber i Hahn, 2011; Chen i sur., 2014; Pereira i sur., 2017; Abate i sur., 2018; Hrustić i sur., 2018). Ipak, neka istraživanja u svojoj metodologiji ne uključuju dodatak SHAM-a (Chen i sur., 2013a). Niske EC<sub>50</sub> vrijednosti *Monilinia* spp. izolata iz Hrvatske za piraklostrobin i trifloksistrobin ukazuju kako kod ispitivanih jedinki nije došlo do razvoja mehanizama alternativne respiracije kojima bi zaobišle inhibitorne učinke fungicida na klijanje spora. Upravo je takva pojava zabilježena u istraživanju inhibicije rasta micelija u južnoj Italiji (Abate i sur., 2018), gdje su utvrđeni i sinergistički učinci vanjskih inhibitora kvinona i SHAM-a. Weber i Hahn (2011) također zapažaju značajno niže EC<sub>50</sub> vrijednosti kod vrste *B. cinerea* kada je trifloksistrobinu dodan SHAM. U slučaju da su rezultati ovog istraživanja ukazivali na smanjenu osjetljivost *Monilinia* vrsta na vanjske inhibitore kvinona, istraživanje osjetljivosti obuhvatilo bi i pokušaj supresije alternativne respiracije korištenjem SHAM-a. Neki autori navode kako SHAM u koncentraciji od 100 µg/ml ne utječe na klijanje spora (Schnabel i sur., 2003; Amiri i sur., 2008) ili su inhibitorni učinci na klijanje spora < 20 % (Weber i Hahn, 2011). S druge strane, Pereira i sur. (2017) zapažaju značajno smanjenje klijanja spora na kontroli s dodatkom SHAM-a u istoj koncentraciji, u usporedbi s hranjivom podlogom bez SHAM-a. Važno je naglasiti kako mehanizam alternativne respiracije najčešće nije aktivan za vrijeme parazitiranja gljive na biljci te je samim time i osjetljivost na fungicide manja u *in vitro* uvjetima, u usporedbi s osjetljivošću *in vivo* (Mondal i sur., 2005).

Rezultati istraživanja osjetljivosti na fungicide pokazuju kako su populacije *Monilinia* vrsta u Hrvatskoj osjetljive na sve ispitivane fungicide, s iznimkom vrste *M. fructicola* na tiofanatmetil, za koju je kod pet izolata utvrđena niska razina rezistentnosti. Iako za aktivne tvari iz skupina inhibitora sukcinat-dehidrogenaze, vanjskih inhibitora kvinona, inhibitora



demetilacije, inhibitora keto reduktaze i inhibitora signala u kompleksu mitogen-aktivacijskih proteinskih kinaza nisu utvrđene populacije smanjene osjetljivosti, sklonost razvoju rezistentnosti novo introducirane vrste *M. fructicola* u budućnosti može rezultirati otežanim i nedovoljno učinkovitim mjerama suzbijanja smeđe truleži u praksi. Utvrđena rezistentnost vrste *M. fructicola* na metil benzimidazol karbamate posljedično smanjuje spektar dostupnih učinkovitih sredstava za zaštitu bilja. U praksi, to može rezultirati češćom primjenom fungicida iz drugih skupina, čime se povećava selekcijski pritisak na patogene, posebno kada se radi o fungicidima s jednostrukim mehanizmom djelovanja koji djeluju na samo jedan metabolički proces u gljivi. Takve pojave mogu dovesti do pojave smanjene osjetljivosti i na druge fungicide ili do pojave unakrsne rezistentnosti na fungicide unutar iste skupine, ali i između različitih skupina fungicida. U Hrvatskoj se svi fungicidi ispitivani u ovom istraživanju primjenjuju na brojnim biljnim vrstama i za suzbijanje velikog broja patogena te je za sve karakterističan jednostruki način djelovanja. Iz tog je razloga ključno implementirati učinkovitu antirezistentnu strategiju koja značajno može smanjiti rizik od pojave rezistentnosti patogena. Obzirom da se promjene u osjetljivosti fitopatogenih vrsta gljiva roda *Monilinia* na različite fungicide zapažaju u cijelom svijetu, učinkovitost takvih mjera je u Hrvatskoj potrebno provjeriti za nekoliko godina.

## 6. ZAKLJUČCI

1) Prvi cilj ovog istraživanja bio je determinirati *Monilinia* vrste na zaraženim plodovima breskve, nektarine i šljive te istražiti njihovu raširenost i zastupljenost.

➤ Postavljena je prva hipoteza kako je bioraznolikost populacija *Monilinia* vrsta na plodovima breskve, nektarine i šljive različita ovisno o lokalitetima (voćnjacima).

Na temelju morfoloških obilježja izolata u čistoj kulturi, identifikacije PCR metodama i analize sekvenci, identificirane su vrste *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola*, dok druge *Monilinia* vrste nisu utvrđene. Nalaz vrste *M. fructicola* u okviru istraživanja prvi je nalaz te vrste na koštičavom voću u Hrvatskoj. Vrste *M. laxa* i *M. fructigena* bile su prisutne u svih 14 županija obuhvaćenih ovim istraživanjem (Dubrovačko-neretvanska, Splitsko-dalmatinska, Zadarska, Istarska, Varaždinska, Međimurska, Zagrebačka, Sisačko-moslavačka, Virovitičko-podravska, Bjelovarsko-bilogorska, Koprivničko-križevačka, Osječko-baranjska, Brodsko-posavska i Vukovarsko-srijemska), dok je raširenost vrste *M. fructicola* bila ograničena na Dubrovačko-neretvansku, Splitsko-dalmatinsku, Istarsku, Međimursku, Zagrebačku i Vukovarsko-srijemsku županiju. Od utvrđenih *Monilinia* vrsta u Hrvatskoj, niti jedna se ne može smatrati dominantnom, već su populacije u Hrvatskoj relativno podjednako zastupljene. Tako je *M. laxa* zastupljena s 37,1 %, *M. fructigena* s 34,6 % i *M. fructicola* s 28,3 %. Međutim, utvrđene su razlike u učestalosti *Monilinia* vrsta u 29 nasada breskve, nektarine i šljive u Hrvatskoj, pri čemu *M. laxa* nije nađena u pet nasada, *M. fructigena* u šest, dok je *M. fructicola* potvrđena u devet nasada. Breskvu je najčešće parazitirala *M. laxa* (41,8 %), nektarinu *M. fructigena* (50,9 %), a šljivu *M. fructicola* (65,9 %).

➤ Obzirom da rezultati pokazuju kako su se na istraživanim lokalitetima populacije *Monilinia* vrsta na plodovima breskve, nektarine i šljive razlikovale, prva postavljena hipoteza se **prihvaća**.

2) Drugi cilj ovog istraživanja bio je utvrditi razlike u patogenosti između izolata *Monilinia* vrsta.

➤ Postavljena je druga hipoteza kako se *Monilinia* vrste međusobno razlikuju u patogenosti.

Svi su reprezentativni izolati vrsta *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* uzrokovali tipične simptome smeđe truleži na plodovima breskve, nektarine i šljive, čime je dokazana patogenost *Monilinia* vrsta na koštičavom voću te su ispunjeni Kochovi postulati.

a) Na plodovima breskve nisu utvrđene statistički značajne razlike u patogenosti između izolata unutar istih *Monilinia* vrsta. Utvrđena je razlika u patogenosti između različitih vrsta, i to između vrsta *M. fructigena* i *M. fructicola*, pri čemu se *M. fructigena* pokazala virulentnijom. Patogenost vrste *M. laxa* statistički se nije značajno razlikovala od vrsta *M. fructigena* i *M. fructicola*. Patogenost *M. laxa* bila je između *M. fructigena* i *M. fructicola*.

b) Na plodovima nektarine nisu utvrđene statistički značajne razlike u patogenosti između izolata unutar istih *Monilinia* vrsta niti između različitih *Monilinia* vrsta.

c) Na plodovima šljive utvrđene su statistički značajne razlike u patogenosti između izolata unutar vrsta *M. laxa* i *M. fructigena*. Statistički značajne razlike u patogenosti nisu utvrđene između različitih *Monilinia* vrsta.

➤ Iako su utvrđene razlike u pojedinim segmentima patogenosti, može se zaključiti kako nema razlika u patogenosti između *Monilinia* vrsta te se druga postavljena hipoteza **ne prihvaća**.

### **3) Treći cilj ovog istraživanja bio je utvrditi razlike u brzini rasta micelija i vijabilnosti konidija između izolata *Monilinia* vrsta.**

➤ Postavljena je treća hipoteza kako se *Monilinia* vrste međusobno razlikuju u brzini rasta micelija i vijabilnosti konidija.

a) Utvrđene su razlike u brzini rasta micelija između *Monilinia* vrsta. Najveći prosječni rast micelija kod temperature od 25 °C u mm/danu imala je *M. fructicola* (6,368), zatim *M. laxa* (3,432) pa *M. fructigena* (2,648).

b) Utvrđene su statistički značajne razlike u vijabilnosti konidija između različitih vrsta, i to između vrsta *M. laxa* i *M. fructicola*, pri čemu je *M. laxa* imala najveći prosječni broj vijabilnih konidija, a *M. fructicola* najmanji. Vijabilnost konidija vrste *M. fructigena* statistički se nije značajno razlikovala od vrsta *M. laxa* i *M. fructicola*. Vijabilnost konidija *M. fructigena* bila je između *M. laxa* i *M. fructicola*.

➤ Obzirom na utvrđene razlike u brzini rasta micelija i vijabilnosti konidija *Monilinia* vrsta, treća postavljena hipoteza se **prihvaća**.

### **4) Četvrti cilj ovog istraživanja bio je utvrditi razlike u osjetljivosti na fungicide između izolata *Monilinia* vrsta.**

➤ Postavljena je četvrta hipoteza kako se *Monilinia* vrste međusobno razlikuju u osjetljivosti na fungicide.

Svi su reprezentativni izolati *Monilinia* vrsta pokazali osjetljivu reakciju na boskalid, difenkonazol, fenbukonazol, fenheksamid, fluopiram i tebukonazol u *in vitro* testu rasta

micelija te na boskalid, fludioksonil, fluopiram, piraklostrobin i trifloksistrobin u *in vitro* testu rasta kličnih cijevi. Iako su se svi izolati vrsta *M. laxa* i *M. fructigena* pokazali kao osjetljivi na tiofanat-metil, kod pet je izolata *M. fructicola* utvrđena smanjena osjetljivost, od čega se četiri izolata prema utvrđenim EC<sub>50</sub> vrijednostima mogu smatrati nisko rezistentnima (NS 30/13, ZG 26/13, VD 4/13 i PO 129/13).

➤ Unatoč utvrđenoj rezistentnosti četiri izolata vrste *M. fructicola* na tiofanat-metil, *Monilinia* vrste pokazale su se osjetljive na sve fungicide te se četvrta postavljena hipoteza **ne prihvaća**.

Ovim su istraživanjem prvi puta u Hrvatskoj dobiveni podaci o raširenosti i bioraznolikosti populacija *Monilinia* vrsta na koštičavom voću u Hrvatskoj. Nepostojanje prijašnjih istraživanja onemogućilo je provođenje komparativne analize bioraznolikosti populacija, obzirom na promjene koje su zasigurno nastupile uslijed ulaska vrste *M. fructicola* u hrvatske nasade koštičavog voća i njene visoke zastupljenosti na jugu Hrvatske. Rezultati ovog istraživanja će budućim istraživanjima *Monilinia* vrsta na koštičavom voću u Hrvatskoj predstavljati prve sistematizirane i povijesne podatke koji će omogućiti detaljniju analizu promjena u populaciji *Monilinia* vrsta. Nastavak istraživanja učestalosti pojedinih *Monilinia* vrsta na koštičavom voću u Hrvatskoj omogućio bi bolji uvid u potencijalno širenje vrste *M. fructicola* na nova područja u Hrvatskoj koje će zasigurno nastupiti nakon njenog prodora. Osim toga, nastavak istraživanja omogućio bi i praćenje pojave nekih drugih *Monilinia* vrsta, koje u Hrvatskoj još nisu utvrđene. Istraživanje genetske varijabilnosti populacije *M. fructicola* u Hrvatskoj, posebice na lokacijama na kojima je utvrđena kao najučestalija, pružilo bi bolji uvid u eventualne puteve ulaska ovog patogena u Hrvatsku te vremenu njene introdukcije, obzirom da rezultati ne upućuju na jasan zaključak. Buduće bi istraživanje svakako trebalo obuhvatiti iste županije, od kojih neke u većem obimu, ali i županije koje nisu bile predmet ovog istraživanja. Praćenje pojave rezistentnosti patogena predstavlja imperativ u suvremenoj zaštiti bilja. Kako je poznato da je vrsta *M. fructicola*, u usporedbi s *M. laxa* i *M. fructigena*, sklonija razvijanju otpornosti na fungicide te zbog dokazane pojave rezistentnosti na tiofanat-metil u Hrvatskoj, praćenje osjetljivosti populacija i jedinki *M. fructicola* na fungicide potrebno je kontinuirano provoditi. Jedino je učestalim praćenjem moguće sustavno bilježiti eventualne promjene u osjetljivosti te, prema potrebi, revidirati i prilagoditi mjere suzbijanja *Monilinia* vrsta.

## 7. POPIS LITERATURE

- Abate D., Pastore C., Gerin D., De Miccolis Angelini R. M., Rotolo C., Pollastro S., Faretra F. (2018). Characterization of *Monilinia* spp. populations on stone fruit in South Italy. *Plant Dis* 102 (9): 1708-1717. doi: 10.1094/PDIS-08-17-1314-RE
- Agrios G. N. (1988). *Plant pathology*, 3<sup>rd</sup> Edition. Academic Press, New York, SAD, pp. 845
- Amiri A., Scherm H., Brannen P. M., Schnabel G. (2008). Laboratory evaluation of three rapid, agar-based assays to assess fungicide sensitivity in *Monilinia fructicola*. *Plant Dis* 92 (3): 415-420. doi: 10.1094/PDIS-92-3-0415
- Amiri A., Brannen P. M., Schnabel G. (2010). Reduced sensitivity in *Monilinia fructicola* field isolates from South Carolina and Georgia to respiration inhibitor fungicides. *Plant Dis* 94 (6): 737-743. doi: 10.1094/PDIS-94-6-0737
- Amiri A., Mulvaney K. A., Pandit L. K., Angelis D. R. (2017). First report of resistance to fluxapyroxad and fluopyram in *Botrytis cinerea* from commercial apple orchards in Washington State. *Plant Dis* 101 (3): 508. doi: 10.1094/PDIS-09-16-1384-PDN
- Bannon F., Gort G., Van Leeuwen G., Holb I., Jeger M. (2009). Diurnal patterns in dispersal of *Monilinia fructigena* conidia in an apple orchard in relation to weather factors. *Agric For Meteorol* 149 (3-4): 518-525. doi: 10.1016/j.agrformet.2008.10.001
- Baroffio C. A., Siegfried W., Hilber U. W. (2003). Long-term monitoring for resistance of *Botryotinia fuckeliana* to anilinopyrimidine, phenylpyrrole, and hydroxylanilide fungicides in Switzerland. *Plant Dis* 87 (6): 662-666. doi: 10.1094/PDIS.2003.87.6.662
- Bartlett D. W., Clough J. M., Godwin J. R., Hall A. A., Hamer M., Parr-Dobrzanski B. (2002). The strobilurin fungicides. *Pest Manag Sci* 58 (7): 649-662. doi: 10.1002/ps.520
- Batra L. R. (1979). First authenticated North American record of *Monilinia fructigena*, with notes on related species. *Mycotaxon* 8 (2): 476-484
- Batra L. R. (1991). World species of *Monilinia* (Fungi): their ecology, biosystematics and control. *Mycol Mem* 16: 1-246
- Biggs A. R., Northover J. (1985). Inoculum sources for *Monilinia fructicola* in Ontario peach orchards. *Can J Plant Pathol* 7 (3): 302-307. doi: 10.1080/07060668509501695
- Biggs A. R., Northover J. (1988). Influence of temperature and wetness duration on infection of peach and sweet cherry fruits by *Monilinia fructicola*. *Phytopathology* 78 (10): 1352-1356. doi: 10.1094/Phyto-78-1352

- Biggs A. R., El-Kholi M. M., El-Neshawy S., Nickerson R. (1997). Effects of calcium salts on growth, polygalacturonase activity, and infection of peach fruit by *Monilinia fructicola*. *Plant Dis* 81 (4): 399-403. doi: 10.1094/PDIS.1997.81.4.399
- Boehm E. W. A., Ma Z., Michailides T. J. (2001). Species-specific detection of *Monilinia fructicola* from California stone fruits and flowers. *Phytopathology* 91 (5): 428-439. doi: 10.1094/PHYTO.2001.91.5.428
- Bonatterra A., Mari M., Casalini L., Montesinos E. (2003). Biological control of *Monilinia laxa* and *Rhizopus stolonifer* in postharvest of stone fruit by *Pantoea agglomerans* EPS125 and putative mechanisms of antagonism. *Int J Food Microbiol* 84 (1): 93-104. doi: 10.1016/S0168-1605(02)00403-8
- Bosshard E., Hilber-Bodmer M., Schärer H.-J., Bünter M., Duffy B. (2006). First report of the quarantine brown rot pathogen *Monilinia fructicola* on imported stone fruits in Switzerland. *Plant Dis* 90 (12): 1554. doi: 10.1094/PD-90-1554C
- Brannen P. M., Schnabel G. (2005). Brown rot. U: Southeastern Peach Growers' Handbook (Horton D., Johnson D., ur), Cooperative Extension Service, University of Georgia, Athens, pp. 127-132
- Brent K. J., Hollomon D. W. (2007). Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed? 2<sup>nd</sup> Edition. Fungicide Resistance Action Committee, pp. 60
- Byrde R. J. W., Willetts H. J. (1977). The brown rot fungi of fruit. Pergamon press, New York, pp. 171
- Calavan E. C., Keitt G. W. (1948). Blossom and spur blight (*Sclerotinia laxa*) of sour cherry. *Phytopathology* 38: 857-882
- Carović-Stanko K., Fruk G., Šatović Z., Ivić D., Politeo O., Sever Z., Grdiša M., Strikić F., Jemrić T. (2013). Effects of *Ocimum* spp. essential oil on *Monilinia laxa* in vitro. *Journal of Essent Oil Res* 25 (2): 143-148. doi: 10.1080/10412905.2012.751057
- Casals C., Viñas I., Torres R., Griera C., Usall J. (2010). Effect of temperature and water activity on in vitro germination of *Monilinia* spp. *J Appl Microbiol* 108 (1): 47-54. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04402.x
- Chamberlain M. (1887). Les essences au point de vue de leurs propriétés antiseptiques. *Ann Inst Pasteur* 1: 153-164
- Chen F., Liu X., Schnabel G. (2013a). Field strains of *Monilinia fructicola* resistant to both MBC and DMI fungicides isolated from stone fruit orchards in the eastern United States. *Plant Dis* 97 (8): 1063-1068. doi: 10.1094/PDIS-12-12-1177-RE

- Chen F., Liu X., Chen S., Schnabel E., Schnabel G. (2013b). Characterization of *Monilinia fructicola* strains resistant to both propiconazole and boscalid. *Plant Dis* 97 (5): 645-651. doi: 10.1094/PDIS-10-12-0924-RE
- Chen S. N., Shang Y., Wang Y., Schnabel G., Lin Y., Yin L. F., Luo C. X. (2014). Sensitivity of *Monilinia fructicola* from peach farms in China to four fungicides and characterization of isolates resistant to carbendazim and azoxystrobin. *Plant Dis* 98 (11): 1555-1560. doi: 10.1094/PDIS-11-13-1145-RE
- Clayton C. N. (1942). The germination of fungus spores in relation to controlled humidity. *Phytopathology* 32: 921-943
- Corbin J. B. (1963). Factors determining the length of the incubation period of *Monilinia fructicola* (Wint.). Honey in fruits of *Prunus* spp. *Aust J Agric Res* 14 (1): 51-60. doi: 10.1071/AR9630051
- Corbin J. B., Ogawa J. M., Schultz H. B. (1968). Fluctuations in numbers of *Monilinia laxa* conidia in an apricot orchard during the 1966 season. *Phytopathology* 58: 1387-1394
- Côté M.-J., Tardif M.-C., Meldrum A. J. (2004a). Identification of *Monilinia fructigena*, *M. fructicola*, *M. laxa* and *Monilia polystroma* on inoculated and naturally infected fruit using multiplex PCR. *Plant Dis* 88 (11): 1219-1225. doi: 10.1094/PDIS.2004.88.11.1219
- Côté M.-J., Prud'homme M., Meldrum A. J., Tardif M.-C. (2004b). Variations in sequence and occurrence of SSU rDNA group I introns in *Monilinia fructicola* isolates. *Mycologia* 96 (2): 240-248. doi: 10.2307/3762060
- Cox K. D., Bryson P. K., Schnabel G. (2007). Instability of propiconazole resistance and fitness in *Monilinia fructicola*. *Phytopathology* 97 (4): 448-453. doi: 10.1094/PHYTO-97-4-0448
- Cruickshank R. H., Wade G. C. (1992). The activation of latent infections of *Monilinia fructicola* on apricots by volatiles from the ripening fruit. *J Phytopathol* 136 (2): 107-112. doi: 10.1111/j.1439-0434.1992.tb01288.x
- Cvjetković B. (2010). Mikoze i pseudomikoze voćaka i vinove loze. Zrinski, Čakovec, Hrvatska, pp. 534
- Cvjetković B., Isaković Lj., Matijević D., Stamenković R., Vladislavljević T. (1987). Efikasnost nekih fungicida u suzbijanju sive pjegavosti šećerne repe (*Cercospora beticola*). *Zbornik Saveza društava za zaštitu bilja Jugoslavije* 9: 81-89

- Cvjetković B., Isaković Lj. (1992). Efikasnost inhibitora ergosterola u suzbijanju pepelnice (*Uncinula necator* (Schw.) Burr.) na vinovoj lozi i njena rezistentnost na IBS fungicide. *Agric Conspec Sci* 57 (1): 141-143
- De Cal A., Sagasta E. M., Melgarejo P. (1988). Antifungal substances produced by *Penicillium frequentans* and their relationship to the biocontrol of *Monilinia laxa*. *Phytopathology* 78 (7): 888-893. doi: 10.1094/Phyto-78-888
- De Cal A., Sagasta E. M., Melgarejo P. (1990). Biological control of peach twig blight (*Monilinia laxa*) with *Penicillium frequentans*. *Plant Pathol* 39 (4): 612-618. doi: 10.1111/j.1365-3059.1990.tb02542.x
- De Cal A., Melgarejo P. (1999). Effects of long-wave UV light on *Monilinia* growth and identification of species. *Plant Dis* 83 (1): 62-65. doi: 10.1094/PDIS.1999.83.1.62
- De Cal A., Gell I., Usall J., Viñas I., Melgarejo P. (2009a). First report of brown rot caused by *Monilinia fructicola* in peach orchards in Ebro Valley, Spain. *Plant Dis* 93 (7): 763. doi: 10.1094/PDIS-93-7-0763A
- De Cal A., Larena I., Liñán M., Torres R., Lamarca N., Usall J., Domenichini P., Bellini A., De Erbe X. O., Melgarejo P. (2009b). Population dynamics of *Epicoccum nigrum*, a biocontrol agent against brown rot in stone fruit. *J Appl Microbiol* 106 (2): 592-605. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.04030.x
- De Cal A., Egüen B., Melgarejo P. (2014). Vegetative compatibility groups and sexual reproduction among Spanish *Monilinia fructicola* isolates obtained from peach and nectarine orchards, but not *Monilinia laxa*. *Fungal Biol* 118 (5-6): 484-494. doi: 10.1016/j.funbio.2014.03.007
- De Vries-Paterson R. M., Jones A. L., Cameron A. C. (1991). Fungistatic effects of carbon dioxide in a package environment on the decay of Michigan sweet cherries by *Monilinia fructicola*. *Plant Dis* 75 (9): 943-946. doi: 10.1094/PD-75-0943
- Di Francesco A., Fruk M., Martini C., Jemrić T., Mari M. (2015). First report of Asiatic brown rot (*Monilinia polystroma*) on apple in Croatia. *Plant Dis* 99 (8): 1181. doi: 10.1094/PDIS-12-14-1290-PDN
- Dragoyski K., Dinkova H., Spasova T., Minev I. (2005). Growth and fruit-bearing performance of the plum cultivar Čačanska lepotica grown in the region of the Central Balkan Mountains. *Voćarstvo* 39 (3): 271-277
- Državni zavod za statistiku Republike Hrvatske. (2018). Poljoprivreda, šumarstvo i ribarstvo, Intenzivna proizvodnja voća i maslina (za tržište). U: Statistički ljetopis Republike



Hrvatske (Ostroški L.J., ur), Državni zavod za statistiku Republike Hrvatske, Zagreb, Hrvatska, pp. 264

EFSA Panel on Plant Health. (2011). Pest risk assessment of *Monilinia fructicola* for the EU territory and identification and evaluation of risk management options. EFSA J 9 (4): 2119, pp. 155

Egüen B., Melgarejo P., De Cal A. (2015). Sensitivity of *Monilinia fructicola* from Spanish peach orchards to thiophanate-methyl, iprodione, and cyproconazole: Fitness analysis and competitiveness. Eur J Plant Pathol 141 (4): 789-801. doi: 10.1007/s10658-014-0579-2

Egüen B., Melgarejo P., De Cal A. (2016). The effect of fungicide resistance on the structure of *Monilinia laxa* populations in Spanish peach and nectarine orchards. Eur J Plant Pathol 145 (4): 815-827. doi: 10.1007/s10658-016-0871-4

El Ghaouth A., Wilson C. L., Wisniewski M. E. (1995). Sugar analogs as potential fungicides for postharvest pathogens of apple and peach. Plant Dis 79 (3): 254-258. doi: 10.1094/PD-79-0254

Elmer P. A. G., Spiers T. M., Wood P. N. (2007). Effects of pre-harvest foliar calcium sprays on fruit calcium levels and brown rot of peaches. Crop Prot 26 (1): 11-18. doi: 10.1016/j.cropro.2006.03.011

Elshafie H. S., Mancini E., Camele I., De Martino L., De Feo V. (2015). In vivo antifungal activity of two essential oils from Mediterranean plants against postharvest brown rot disease of peach fruit. Ind Crops Prod 66: 11-15. doi: 10.1016/j.indcrop.2014.12.031

Emery K. M., Michailides T. J., Scherm H. (2000). Incidence of latent infections of immature peach fruit by *Monilinia fructicola* and relationship to brown rot in Georgia. Plant Dis 84 (8): 853-857. doi: 10.1094/PDIS.2000.84.8.853

EPPO/CABI. (1996). Quarantine Pests for Europe (2<sup>nd</sup> edition) – Data Sheets on quarantine pests for the European Union and for the European and Mediterranean Plant Protection Organization (Smith I. M., McNamara D. G., Scott P. R., Holderness M., ur) CABI, Wallingford, United Kingdom, pp. 1425

EPPO. (2002). First report of *Monilinia fructicola* in France. EPPO Reporting Service 1: 003. (preuzeto s: <https://gd.eppo.int/reporting/article-2166>; 1.11.2019.)

EPPO. (2006). Eradication of *Monilinia fructicola* in Austria. EPPO Reporting Service 7: 139. (preuzeto s: <https://gd.eppo.int/reporting/article-1133>; 1.11.2019.)

EPPO. (2009). EPPO Standard PM 7/18 (2) *Monilinia fructicola*. Diagnostics. Bull OEPP 39: 337-343. doi: 10.1111/j.1365-2338.2009.02321.x

- EPPO. (2010). First report of *Monilinia fructicola* in Germany. EPPO Reporting Service 1: 016. (preuzeto s: <https://gd.eppo.int/reporting/article-325>; 1.11.2019.)
- EPPO. (2011). First reports of *Monilinia polystroma* in Hungary and the Czech Republic. EPPO Reporting Service 6: 134. (preuzeto s: <https://gd.eppo.int/reporting/article-1703>; 1.11.2019.)
- EPPO. (2019). EPPO Global Database. (preuzeto s: <https://gd.eppo.int/>; 1.11.2019.)
- Esterio M., Ramos C., Walker A.-S., Fillinger S., Leroux P., Auger J. (2011). Phenotypic and genetic characterization of Chilean isolates of *Botrytis cinerea* with different levels of sensitivity to fenhexamid. *Phytopathol Mediterr* 50 (3): 414-420
- Europska unija. (2000). Direktiva Vijeća 2000/29/EZ od 8. svibnja 2000. o zaštitnim mjerama protiv unošenja u Zajednicu organizama štetnih za bilje ili biljne proizvode i protiv njihovog širenja unutar Zajednice. Službeni list Europske Unije L 169, pp. 1-181
- Europska unija. (2018). Agriculture, forestry and fishery statistics. Publications Office of the European Union, Luksemburg. (preuzeto s: <https://ec.europa.eu/eurostat/documents/3217494/9455154/KS-FK-18-001-EN-N.pdf>; 1.11.2019.)
- Fan J. Y., Guo L.-Y., Xu J. P., Luo Y., Michailides T. J. (2010). Genetic diversity of populations of *Monilinia fructicola* (Fungi, Ascomycota, Helotiales) from China. *J Eukaryot Microbiol* 57 (2): 206-212. doi: 10.1111/j.1550-7408.2009.00467.x
- Fan J. Y., Luo Y., Michailides T. J., Guo L. Y. (2014). Simultaneous quantification of alleles E198A and H6Y in the b-tubulin gene conferring benzimidazole resistance in *Monilinia fructicola* using a duplex real-time (TaqMan) PCR. *Pest Manag Sci* 70 (2): 245-251. doi: 10.1002/ps.3549
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2006). ISPM No. 6 Guidelines for surveillance. International standards for phytosanitary measures No. 1-24, Secretariat of the International Plant Protection Convention, pp. 69-72
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2018). FAOSTAT - Food and Agriculture Organization of the United Nations. (preuzeto s: <http://www.fao.org/faostat/en/#home>; 1.11.2019.)
- Fazinić T., Lovrek Z., Ivić D. (2017). Potential impact and management of *Monilinia fructicola* in an integrated peach orchard. *Agric Conspec Sci* 82 (1): 27-31
- Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39 (4): 783-791. doi: 10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x

- Fernández-Ortuño D., Torés J. A., Chamorro M., Pérez-García A., de Vicente A. (2016a). Characterization of resistance to six chemical classes of site-specific fungicides registered for gray mold control on strawberry in Spain. *Plant Dis* 100 (11): 2234-2239. doi: 10.1094/PDIS-03-16-0280-RE
- Fernández-Ortuño D., Torés J. A., Pérez-García A., de Vicente A. (2016b). First report of fludioxonil resistance in *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mold, from strawberry fields in Spain. *Plant Dis* 100 (8): 1779. doi: 10.1094/PDIS-02-16-0172-PDN
- Fernández-Ortuño D., Pérez-García A., Chamorro M., de la Peña M., de Vicente A., Torés J. A. (2017). Resistance to the SDHI fungicides boscalid, fluopyram, fluxapyroxad, and penthiopyrad in *Botrytis cinerea* from commercial strawberry fields in Spain. *Plant Dis* 101 (7): 1306-1313. doi: 10.1094/PDIS-01-17-0067-RE
- Fillinger S., Leroux P., Auclair C., Barreau C., Al Hajj C., Debieu D. (2008). Genetic analysis of fenhexamid-resistant field isolates of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Antimicrob Agents Chemother* 52 (11): 3933-3940. doi: 10.1128/AAC.00615-08
- Förster H., Adaskaveg J. E. (2000). Early brown rot infections in sweet cherry fruit are detected by *Monilinia*-specific DNA primers. *Phytopathology* 90 (2): 171-178. doi: 10.1094/PHYTO.2000.90.2.171
- Förster H., Kanetis L., Adaskaveg J. E. (2004). Spiral gradient dilution, a rapid method for determining growth responses and 50% effective concentration values in fungus–fungicide interactions. *Phytopathology* 94 (2): 163-170. doi: 10.1094/PHYTO.2004.94.2.163
- Förster H., Driever G. F. Thompson D. C., Adaskaveg J. E. (2007). Postharvest decay management for stone fruit crops in California using the “reduced-risk” fungicides fludioxonil and fenhexamid. *Plant Dis* 91 (2): 209-215. doi: 10.1094/PDIS-91-2-0209
- FRAC (Fungicide resistance action committee). (2014). FRAC Pathogen Risk List (December 2013): 1-6. (preuzeto s: [https://www.frac.info/docs/default-source/publications/pathogen-risk/frac-pathogen-list-2019.pdf?sfvrsn=763d489a\\_2;](https://www.frac.info/docs/default-source/publications/pathogen-risk/frac-pathogen-list-2019.pdf?sfvrsn=763d489a_2; 1.11.2019) 1.11.2019.)
- FRAC (Fungicide resistance action committee). (2020). FRAC Code List 2020: Fungal control agents sorted by cross resistance pattern and mode of action (including FRAC Code numbering): 1-16. (preuzeto s: [https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2020-finalb16c2b2c512362eb9a1eff00004acf5d.pdf?sfvrsn=54f499a\\_2;](https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2020-finalb16c2b2c512362eb9a1eff00004acf5d.pdf?sfvrsn=54f499a_2; 10.10.2020) 10.10.2020.)

- Free S. J., Holtz B. A., Michailides T. J. (1996). Mating behavior in field populations of *Monilinia fructicola* in California. *Mycologia* 88 (2): 208-211. doi: 10.1080/00275514.1996.12026645
- Fry W. E. (1982). Principles of plant disease management. Academic Press, New York, pp. 378
- Fulton C. E., Brown A. E. (1997). Use of SSU rDNA group-I intron to distinguish *Monilinia fructicola* from *M. laxa* and *M. fructigena*. *FEMS Microbiol Lett* 157 (2): 307-312. doi: 10.1016/S0378-1097(97)00492-8
- Fulton C. E., Van Leeuwen G. C. M., Brown A. E. (1999). Genetic variation among and within *Monilinia* species causing brown rot of stone and pome fruits. *Eur J Plant Pathol* 105 (5): 495-500. doi: 10.1023/A:1008711107347
- Garcia-Benitez C., Melgarejo P., De Cal A. (2017). Detection of latent *Monilinia* infections in nectarine flowers and fruit by qPCR. *Plant Dis* 101 (6): 1002-1008. doi: 10.1094/PDIS-11-16-1682-RE
- Gell I., Cubero J., Melgarejo P. (2007). Two different PCR approaches for universal diagnosis of brown rot and identification of *Monilinia* spp. in stone fruit trees. *J Appl Microbiol* 103 (6): 2629-2637. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03495.x
- Gell I., De Cal A., Torres R., Usall J., Melgarejo P. (2008). Relationship between the incidence of latent infections caused by *Monilinia* spp. and the incidence of brown rot of peach fruit: factors affecting latent infection. *Eur J Plant Pathol* 121 (4): 487-498. doi: 10.1007/s10658-008-9268-3
- Gell I., De Cal A., Torres R., Usall J., Melgarejo P. (2009). Conidial density of *Monilinia* spp. on peach fruit surfaces in relation to the incidences of latent infections and brown rot. *Eur J Plant Pathol* 123 (4): 415-424. doi: 10.1007/s10658-008-9378-y
- Harada Y. (1977). Studies on the Japanese species of *Monilinia* (Sclerotiniaceae). *Bulletin of Faculty of Agriculture Hirosaki University* 27: 30-109
- Harada Y., Sasaki M., Nakao S. (1990). On occurrence in recent years of brown rot disease on *Prunus mume* in Oita Pref. and its causal fungus. *Ann Phytopathol Soc Jpn* 59: 387
- Harada Y., Nakao S., Sasaki M., Sasaki Y., Ichihashi Y., Sano T. (2004). *Monilia mumeicola*, a new brown rot fungus on *Prunus mume* in Japan. *J Gen Plant Pathol* 70 (6): 297-307. doi: 10.1007/s10327-004-0137-4
- Hewitt W. B., Leach L. D. (1939). Brown rot Sclerotinias occurring in California and their distribution on stone fruits. *Phytopathology* 29: 337-351

- Hilber-Bodmer M., Knorst V., Smits T. H. M., Patocchi A. (2012). First report of Asian brown rot caused by *Monilia polystroma* on apricot in Switzerland. *Plant Dis* 96 (1): 146. doi: 10.1094/PDIS-06-11-0522
- Hilber U. W. (1992). Comparative studies on genetic variability and fungicide resistance in *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel against vinclozolin and the phenylpyrrole CGA 173506. Doktorska disertacija. Sveučilište u Baselu, Basel
- Holb I. J. (2006). Possibilities of brown rot management in organic stone fruit production in Hungary. *Int J Hortic Sci* 12 (3): 87-91. doi: 10.31421/IJHS/12/3/665
- Holb I. J. (2008a). Brown rot blossom blight of pome and stone fruits: symptom, disease cycle, host resistance, and biological control. *Int J Hortic Sci* 14 (3): 15-21. doi: 10.31421/IJHS/14/3/796
- Holb I. J. (2008b). Monitoring conidial density of *Monilinia fructigena* in the air in relation to brown rot development in integrated and organic apple orchards. *Eur J Plant Pathol* 120 (4): 397-408. doi: 10.1007/s10658-007-9233-6
- Holb I. J., Schnabel G. (2007). Differential effect of triazoles on mycelial growth and disease measurements of *Monilinia fructicola* isolates with reduced sensitivity to DMI fungicides. *Crop Prot* 26: 753-759. doi:10.1016/j.cropro.2006.07.001
- Holtz B. A., Michailides T. J., Hong C. X. (1998). Development of apothecia from stone fruit infected and stromatized by *Monilinia fructicola* in California. *Plant Dis* 82 (12): 1375-1380. doi: 10.1094/PDIS.1998.82.12.1375
- Honey E. E. (1936). North American Species of *Monilinia*. I. Occurrence, grouping, and life-histories. *Am J Bot* 23 (2): 100-106. doi: 10.2307/2436302
- Hong C. X., Michailides T. J., Holtz B. A. (1996). Survey of primary inoculum sources of brown rot in stone fruit orchards in the San Joaquin Valley of California. *Phytopathology* 86: S110
- Hong C. X., Holtz B. A., Morgan D. P., Michailides T. J. (1997). Significance of thinned fruit as a source of the secondary inoculum of *Monilinia fructicola* in California nectarine orchards. *Plant Dis* 81 (5): 519-524. doi: 10.1094/PDIS.1997.81.5.519
- Hong C. X., Michailides T. J. (1998). Effect of temperature on the discharge and germination of ascospores by apothecia of *Monilinia fructicola*. *Plant Dis* 82 (2): 195-202. doi: 10.1094/PDIS.1998.82.2.195

- Hong C. X., Michailides T. J., Holtz B. A. (1998). Effects of wounding, inoculum density, and biological control agents on postharvest brown rot of stone fruits. *Plant Dis* 82 (11): 1210-1216. doi: 10.1094/PDIS.1998.82.11.1210
- Hong C. X., Michailides T. J., Holtz, B. A. (2000). Mycoflora of stone fruit mummies in California orchards. *Plant Dis* 84 (4): 417-422. doi: 10.1094/PDIS.2000.84.4.417
- Hrustić J., Mihajlović M., Tanović B., Delibašić G., Stanković I., Krstić B., Bulajić A. (2013). First report of brown rot caused by *Monilinia fructicola* on nectarine in Serbia. *Plant Dis* 97 (1): 147. doi: 10.1094/PDIS-08-12-0718-PDN
- Hrustić J., Delibašić G., Stanković I., Grahovac M., Krstić B., Bulajić A., Tanović B. (2015). *Monilinia* spp. causing brown rot of stone fruit in Serbia. *Plant Dis* 99 (5): 709-717. doi: 10.1094/PDIS-07-14-0732-RE
- Hrustić J., Mihajlović M., Grahovac M., Delibašić G., Tanović B. (2018). Fungicide sensitivity, growth rate, aggressiveness and frost hardiness of *Monilinia fructicola* and *Monilinia laxa* isolates. *Eur J Plant Pathol* 151 (2): 389-400. doi: 10.1007/s10658-017-1380-9
- Hu M.-J., Cox K. D., Schnabel G., Luo C.-X. (2011). *Monilinia* species causing brown rot of peach in China. *PLoS One* 6 (9): 1-14. doi: 10.1371/journal.pone.0024990
- loos R., Frey P. (2000). Genomic variation within *Monilinia laxa*, *M. fructigena* and *M. fructicola*, and application to species identification by PCR. *Eur J Plant Pathol* 106 (4): 373-378. doi: 10.1023/A:1008798520882
- Ivanović M., Ivanović D. (2005). Bolesti voćaka i vinove loze i njihovo suzbijanje. Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd, Srbija, pp. 400
- Ivić D., Novak A. (2012). Smeđa trulež koštičavih voćaka – *Monilinia fructicola* (G. Winter) Hony. Hrvatski centar za poljoprivredu, hranu i selo, Zagreb, Hrvatska, pp. 6-42
- Janisiewicz W. J. (1987). Postharvest biological control of blue mold on apples. *Phytopathology* 77 (3): 481-485. doi: 10.1094/Phyto-77-481
- Janisiewicz W. J., Biggs A. R., Jurick II W. M., Vico I., Conway W. S. (2013). Biological characteristics of *Monilinia fructicola* isolates from stone fruits in eastern West Virginia. *Can J Plant Pathol* 35 (3): 315-327. doi: 10.1080/07060661.2013.823465
- Jänsch M., Frey J. E., Hilber-Bodmer M., Broggin G. A. L., Weger J., Schnabel G., Patocchi A. (2012). SSR marker analysis of *Monilinia fructicola* from Swiss apricots suggests introduction of the pathogen from neighbouring countries and the United States. *Plant Pathol* 61 (2): 247-254. doi: 10.1111/j.1365-3059.2011.02511.x

- Jemrić T., Ivić D., Fruk G., Skutin Matijaš H., Cvjetković B., Bupić M., Pavković B. (2011). Reduction of postharvest decay of peach and nectarine caused by *Monilinia laxa* using hot water dipping. *Food Bioproc Tech* 4 (1): 149-154. doi: 10.1007/s11947-010-0355-z
- Jerome S. M. R. (1958). Brown rot of stone fruits: Latent contamination in relation to spread of the disease. *J Aust Inst Agric Sci* 24: 132-140
- Jiang J., Ding L., Michailides T. J., Li H., Ma Z. (2009). Molecular characterization of field azoxystrobin-resistant isolates of *Botrytis cinerea*. *Pestic Biochem Physiol* 93 (2): 72-76. doi: 10.1016/j.pestbp.2008.11.004
- Jones A. L. (1990). Brown rot diseases. U: Compendium of apple and pear diseases (Jones A. L., Aldwinckle H. S., ur), APS Press, St. Paul, Minnesota, SAD, pp. 100
- Jones A. L., Ehret G. R. (1976). Isolation and characterization of benomyl tolerant strains of *Monilinia fructicola*. *Plant Dis Rep* 60: 765-769
- Karabulut O. A., Smilanick J. L., Crisosto C. H., Palou L. (2010). Control of brown rot of stone fruits by brief heated water immersion treatments. *Crop Prot* 29 (8): 903-906. doi: 10.1016/j.cropro.2010.03.010
- Kim Y. K., Xiao C. L. (2010). Resistance to pyraclostrobin and boscalid in populations of *Botrytis cinerea* from stored apples in Washington State. *Plant Dis* 94 (5): 604-612. doi: 10.1094/PDIS-94-5-0604
- Kišpatić J., Medin A., Poparić A., Kasap G. (1976). *Monilia laxa* (Ehr.) Sacc. i Vogl kao uzročnik sušenja mladice Maraske. *Agric Conspec Sci* 39 (49): 317-320
- Kišpatić J., Maceljki M. (1981). Zaštita voćaka i vinove loze. Nakladni zavod Znanje
- Kovačević Ž., Kišpatić J., Panjan M. (1960). Bolesti i štetnici voćaka i vinove loze. Poljoprivredni nakladni zavod, Zagreb, Hrvatska, pp. 416
- Kuck K. H., Russell P. E. (2006). FRAC: Combined resistance risk assessment. *Asp Appl Biol* 78: 3-10
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. (2016). MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 33 (7): 1870-1874. doi: 10.1093/molbev/msw054
- Landgraf F. A., Zehr E. I. (1982). Inoculum sources for *Monilinia fructicola* in South Carolina peach orchards. *Phytopathology* 72 (2): 185-190. doi: 10.1094/Phyto-72-185

- Lane C. R. (2002). A synoptic key for differentiation of *Monilinia fructicola*, *M. fructigena*, and *M. laxa*, based on examination of cultural characters. Bull OEPP 32 (3): 489-493. doi: 10.1046/j.1365-2338.2002.00595.x
- Larena I., Melgarejo P. (1993). The lytic enzymatic complex of *Penicillium purpurogenum* and its effects on *Monilinia laxa*. Mycol Res 97 (1): 105-110. doi: 10.1016/S0953-7562(09)81146-5
- Larena I., Torres R., De Cal A., Liñan M., Melgarejo P., Domenichini P., Bellini A., Mandrin J. F., Lichou J., Ochoa de Erbe X., Usall J. (2005). Biological control of postharvest brown rot (*Monilinia* spp.) of peaches by field applications of *Epicoccum nigrum*. Biol Control 32 (2): 305-310. doi: 10.1016/j.biocontrol.2004.10.010
- Larkin M. A., Blackshields G., Brown N. P., Chenna R., McGettigan P. A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I. M., Wilm A., Lopez R., Thompson J. D., Gibson T. J., Higgins D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics 23 (21): 2947-2948. doi: 10.1093/bioinformatics/btm404
- Latinović J., Latinović N., Karaoglanidis G. S. (2017). First report of brown rot caused by *Monilinia fructicola* on nectarine fruit in Montenegro. Plant Dis 101 (6): 1045. doi: 10.1094/PDIS-11-16-1601-PDN
- Lazar-Baker E. E., Hetherington S. D., Ku V. V., Newman S. M. (2011). Evaluation of commercial essential oil samples on the growth of postharvest pathogen *Monilinia fructicola* (G. Winter) Honey. Lett Appl Microbiol 52 (3): 227-232. doi: 10.1111/j.1472-765X.2010.02996.x
- Lee M. H., Bostock R. M. (2006). Induction, regulation, and role in pathogenesis of appressoria in *Monilinia fructicola*. Phytopathology 96 (10): 1072-1080. doi: 10.1094/PHYTO-96-1072
- Leroch M., Kretchmer M., Hahn M. (2011). Fungicide resistant phenotypes of *Botrytis cinerea* isolates from commercial vineyards in South West Germany. J Phytopathol 159 (1): 63-65. doi: 10.1111/j.1439-0434.2010.01719.x
- Leroux P., Descotes A. (1996). Resistance of *Botrytis cinerea* to fungicides and strategies for its control in the Champagne vineyards. Proc Br Crop Prot Pests Dis 1: 131-136
- Li Z. (1984). Peach germplasm and breeding in China. HortScience 19 (3, 1): 348-351
- Luo C. X., Schnabel G. (2008). Adaptation to fungicides in *Monilinia fructicola* isolates with different fungicide resistance phenotypes. Phytopathology 98 (2): 230-238. doi: 10.1094/PHYTO-98-2-0230



- Luo C. X., Cox K. D., Amiri A., Schnabel G. (2008). Occurrence and detection of the DMI resistance-associated genetic element 'Mona' in *Monilinia fructicola*. *Plant Dis* 92 (7): 1099-1103. doi: 10.1094/PDIS-92-7-1099
- Luo Y., Michailides T. J. (2001). Factors affecting latent infection of prune fruit by *Monilinia fructicola*. *Phytopathology* 91 (9): 864-872. doi: 10.1094/PHYTO.2001.91.9.864
- Luo Y., Ma Z., Reyes H. C., Morgan D., Michailides T. J. (2007). Quantification of airborne spores of *Monilinia fructicola* in stone fruit orchards of California using real-time PCR. *Eur J Plant Pathol* 118 (2): 145-154. doi: 10.1007/s10658-007-9124-x
- Ma Z., Michailides T. J. (2007). Approaches for eliminating PCR inhibitors and designing PCR primers for the detection of phytopathogenic fungi. *Crop Prot* 26 (2): 145-161. doi: 10.1016/j.cropro.2006.04.014
- Ma Z., Luo Y., Michailides T. J. (2003a). Nested PCR assays for detection of *Monilinia fructicola* in stone fruit orchards and *Botryosphaeria dothidea* from pistachios in California. *J Phytopathol* 151 (6): 312-322. doi: 10.1046/j.1439-0434.2003.00725.x
- Ma Z., Yoshimura M. A., Michailides T. J. (2003b). Identification and characterization of benzimidazole resistance in *Monilinia fructicola* from stone fruit orchards in California. *Appl Environ Microbiol* 69 (12): 7145-7152. doi: 10.1128/aem.69.12.7145-7152.2003
- Ma Z., Yoshimura M. A., Holtz B. A., Michailides T. J. (2005). Characterization and PCR-based detection of benzimidazole-resistant isolates of *Monilinia laxa* in California. *Pest Manag Sci* 61 (5): 449-457. doi: 10.1002/ps.982
- Madrigal C., Pascual S., Melgarejo P. (1994). Biological control of peach twig blight (*Monilinia laxa*) with *Epicoccum nigrum*. *Plant Pathol* 43 (3): 554-561. doi: 10.1111/j.1365-3059.1994.tb01590.x
- Magan N., Lacey J. (1988). Ecological determinants of mold growth in stored grain. *Int J Food Microbiol* 7 (3): 245-256. doi: 10.1016/0168-1605(88)90043-8
- Malandrakis A. A., Markoglou A. N., Ziogas B. N. (2012). PCR-RFLP detection of the E198A mutation conferring resistance to benzimidazoles in field isolates of *Monilinia laxa* from Greece. *Crop Prot* 39 (39): 11-17. doi: 10.1016/j.cropro.2012.04.001
- Malandrakis A., Koukiasas N., Veloukas T., Karaoglanidis G., Markoglou A. (2013). Baseline sensitivity of *Monilinia laxa* from Greece to fenhexamid and analysis of fenhexamid-resistant mutants. *Crop Prot* 46: 13-17. doi: 10.1016/j.cropro.2012.12.009

- Margosan D. A., Smilanick J. L., Simmons G. F., Henson D. J. (1997). Combination of hot water and ethanol to control postharvest decay of peaches and nectarines. *Plant Dis* 81 (12): 1405-1409. doi: 10.1094/PDIS.1997.81.12.1405
- Mari M., Torres R., Casalini L., Lamarca N., Mandrin J. F., Lichou J., Larena I., De Cal A., Melgarejo P., Usall J. (2007). Control of postharvest brown rot on nectarine by *Epicoccum nigrum* and physico-chemical treatments. *J Sci Food Agric* 87 (7): 1271-1277. doi: 10.1002/jsfa.2839
- Mari M., Martini C., Guidarelli M., Neri F. (2012). Postharvest biocontrol of *Monilinia laxa*, *Monilinia fructicola* and *Monilinia fructigena* on stone fruit by two *Aureobasidium pullulans* strains. *Biol Control* 60 (2): 132-140. doi: 10.1016/j.biocontrol.2011.10.013
- Martin R. R., James C. A., Levesque C. A. (2000). Impacts of molecular diagnostic technologies of plant disease management. *Annu Rev Phytopathol* 38: 207-239. doi: 10.1146/annurev.phyto.38.1.207
- Martini C., Lantos A., Di Francesco A., Guidarelli M., D'Aquino S., Baraldi E. (2014). First report of Asiatic brown rot caused by *Monilinia polystroma* on peach in Italy. *Plant Dis* 98 (11): 1585. doi: 10.1094/PDIS-05-14-0551-PDN
- Matheron M. E., Porchas M. (2004). Activity of boscalid, fenhexamid, fluazinam, fludioxonil, and vinclozolin on growth of *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum* and development of lettuce drop. *Plant Dis* 88 (6): 665-668. doi: 10.1094/PDIS.2004.88.6.665
- May-De Mio L. L., Luo Y., Michailides T. J. (2011). Sensitivity of *Monilinia fructicola* from Brazil to tebuconazole, azoxystrobin, and thiophanate-methyl and implications for disease management. *Plant Dis* 95 (7): 821-827. doi: 10.1094/PDIS-07-10-0511
- McKeen C. D., Reilly C. C., Pusey P. L. (1986). Production and partial characterization of antifungal substances antagonistic to *Monilinia fructicola* from *Bacillus subtilis*. *Phytopathology* 76 (2): 136-139. doi: 10.1094/Phyto-76-136
- McManus P. S., Best V. M., Volland R. P., Leininger B. L. (1999). Sensitivity of *Monilinia oxycocci* to fenbuconazole and propiconazole in vitro and control of cranberry cottonball in the field. *Plant Dis* 83 (5): 445-450. doi: 10.1094/PDIS.1999.83.5.445
- Melgarejo P., Carrillo R., Sagasta E. M. (1986). Potential for biological control of *Monilinia laxa* in peach twigs. *Crop Prot* 5 (6): 422-426. doi: 10.1016/0261-2194(86)90076-1
- Michailides T. J., Morgan D. P. (1997). Influence of fruit-to-fruit contact on the susceptibility of French prune to infection by *Monilinia fructicola*. *Plant Dis* 81 (12): 1416-1424. doi: 10.1094/PDIS.1997.81.12.1416

- Michailides T. J., Ogawa J. M., Opgenorth D. C. (1987). Shift of *Monilinia* spp. and distribution of isolates sensitive and resistant to benomyl in California prune and apricot orchards. *Plant Dis* 71 (10): 893-896. doi: 10.1094/PD-71-0893
- Miessner S., Stammler G. (2010). *Monilinia laxa*, *M. fructigena* and *M. fructicola*: Risk estimation of resistance to QoI fungicides and identification of species with cytochrome *b* gene sequences. *J Plant Dis Prot* 117 (4): 162-167. doi: 10.1007/BF03356354
- Milatović D., Nikolić M., Miletić, N. (2011). Trešnja i višnja. Naučno voćarsko društvo Srbije, Čačak, Srbija, pp. 530
- Miličević T. (2005). Genotipska i fenotipska varijabilnost unutar populacija patogene gljive *Botryotinia fuckeliana* (De Bary) Whetz. na vinovoj lozi i jagodama. Doktorska disertacija. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zagreb
- Ministarstvo poljoprivrede. (2013). Tehnološke upute za integriranu proizvodnju voća za 2014. godinu. Ministarstvo poljoprivrede, Zagreb, Hrvatska, pp. 53
- Ministarstvo poljoprivrede. (2019). Popis registriranih sredstava za zaštitu bilja na dan 01.11.2019. (preuzeto s: [https://fis.mps.hr/TrazilicaSZB/Default.aspx?lan=hr-Hr](https://fis.mps.hr/TrazilicaSZB/Default.aspx?lan=hr-Hr;); 1.11.2019.)
- Morgulis A., Coulouris G., Raytselis Y., Madden T. L., Agarwala R., Schäffer A. A. (2008). Database indexing for production MegaBLAST searches. *Bioinformatics* 24 (16): 1757-1764. doi: 10.1093/bioinformatics/btn322
- Mondal S. N., Bhatia A., Shilts T., Timmer L. W. (2005). Baseline sensitivities of fungal pathogens of fruit and foliage of Citrus to azoxystrobin, pyraclostrobin, and fenbuconazole. *Plant Dis* 89 (11): 1186-1194. doi: 10.1094/PD-89-1186
- Moorman G. W., Walker A. S., May S. (2012). First report of fenhexamid-resistant *Botrytis cinerea* causing gray mold on Heurchera in a North American green-house. *Plant Dis* 96 (1): 147. doi: 10.1094/PDIS-08-11-0721
- Munda A. (2015). First report of brown rot on peach caused by *Monilia polystroma* in Slovenia. *Plant Dis* 99 (9): 1281. doi: 10.1094/PDIS-02-15-0178-PDN
- Munda A., Viršček Marn M. (2010). First report of brown rot caused by *Monilinia fructicola* affecting peach orchards in Slovenia. *Plant Dis* 94 (9): 1166. doi: 10.1094/PDIS-94-9-1166A
- Myresiotis C. K., Karaoglanidis G. S., Tzavella-Klonari K. (2007). Resistance of *Botrytis cinerea* isolates from vegetable crops to anilinopyrimidine, phenylpyrrole, hydroxyanilide, benzimidazole, and dicarboximide fungicides. *Plant Dis* 91 (4): 407-413. doi: 10.1094/PDIS-91-4-0407

- Myresiotis C. K., Bardas G. A., Karaoglanidis G. S. (2008). Baseline sensitivity of *Botrytis cinerea* to pyraclostrobin and boscalid and control of anilinopyrimidine- and benzimidazole resistant strains by these fungicides. *Plant Dis* 92 (10): 1427-1431. doi: 10.1094/PDIS-92-10-1427
- Nakao S. (1992). Brown rot disease of *Prunus mume* caused by an undescribed *Monilia* fungus. *Kongetsu-No-Noyaku* 1: 92-95
- Narodne novine. (2014). Zakon o održivoj uporabi pesticida. Zagreb: Narodne novine d.d., 14
- Nei M., Kumar S. (2000). Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press, New York, SAD, pp. 348
- Northover J., Cerkauskas R. F. (1994). Detection and significance of symptomless latent infections of *Monilinia fructicola* in plums. *Can J Plant Pathol* 16 (1): 30-36. doi: 10.1080/07060669409500785
- Northover J., Biggs A. R. (1995). Effect of conidial concentration of *Monilinia fructicola* on brown rot development in detached cherries. *Can J Plant Pathol* 17 (3): 205-214. doi: 10.1080/07060669509500682
- Ogawa J. M., Manji B. T., Bostock R. M., Canez V. M., Bose E. A. (1984). Detection and characterization of benomyl-resistant *Monilinia laxa* on apricots. *Plant Dis* 68 (1): 29-31. doi: 10.1094/PD-69-29
- Ogawa J. M., Zehr E. I., Biggs A. R. (1995). Brown rot. U: Compendium of stone fruit diseases (Ogawa J. M., Zehr E. I., Bird G. W., Ritchie D. F., Uriu K., Uyemoto J. K., ur), APS Press, St. Paul, Minnesota, SAD, pp. 7-10
- Ondejková N., Hudecová M., Bacigálová K. (2010). First report on *Monilinia fructicola* in the Slovak Republic. *Plant Prot Sci* 46 (4): 181-184. doi: 10.17221/1271-PPS
- Oxenham S. K. (2003). Classification of an *Ocimum basilicum* germplasm collection and examination of the antifungal effects of the essential oil of basil. Doktorska disertacija. Sveučilište u Glasgowu, Glasgow
- Palou L., Crisosto C. H., Smilanick J. L., Adaskaveg J. E., Zoffoli J. P. (2002). Effects of continuous 0.3 ppm ozone exposure on decay development and physiological responses of peaches and table grapes in cold storage. *Postharvest Biol Technol* 24 (1): 39-48. doi: 10.1016/S0925-5214(01)00118-1

- Papavasileiou A., Testempasis S., Michailides T. J., Karaoglanidis G. S. (2015a). Frequency of brown rot fungi on blossoms and fruit in stone fruit orchards in Greece. *Plant Pathol* 64 (2): 416-424. doi: 10.1111/ppa.12264
- Papavasileiou A., Karaoglanidis G. S., Michailides T. J. (2015b). Intraspecific diversity of *Monilinia fructicola* and *M. laxa* populations from blossoms and fruit of different hosts in Greece. *Plant Dis* 99 (10): 1353-1359. doi: 10.1094/PDIS-02-15-0233-RE
- Papavasileiou A., Madesis P. B., Karaoglanidis G. S. (2016). Identification and differentiation of *Monilinia* species causing brown rot of pome and stone fruit using high resolution melting (HRM) analysis. *Phytopathology* 106 (9): 1055-1064. doi: 10.1094/PHYTO-01-16-0016-R
- Pasche J. S., Piche L. M., Gudmestad N. C. (2005). Effect of the F129L mutation in *Alternaria solani* on fungicides affecting mitochondrial respiration. *Plant Dis* 89 (3): 269-278. doi: 10.1094/PD-89-0269
- Parker D. M., Zhang N., Smart C. D., Köller W. D. (2006). Polymorphism of 14 alpha-demethylase gene (CYP51) in brown rot pathogen *Monilinia fructicola* from a resistant orchard in New York State. *Phytopathology* 96: S90
- Pellegrino C., Gullino M. L., Garibaldi A., Spadaro D. (2009). First report of brown rot of stone fruit caused by *Monilinia fructicola* in Italy. *Plant Dis* 93 (6): 668. doi: 10.1094/PDIS-93-6-0668A
- Penrose L. J. (1990). Prolonged field persistence of resistance to benomyl in *Monilinia fructicola*. *Crop Prot* 9 (3): 190-192. doi: 10.1016/0261-2194(90)90162-Z
- Penrose L. J., Tarran J., Wong A.-L. (1976). First record of *Sclerotinia laxa* Aderh. & Ruhl. New South Wales: Differentiation from *S. fructicola* (Wint.) Rehm. by cultural characteristics and electrophoresis. *Aust J Agric Res* 27 (4): 547-556. doi: 10.1071/AR9760547
- Pereira W. V., Primiano I. V., Morales R. G. F., Peres N. A., Amorim L., May De Mio L. L. (2017). Reduced sensitivity to azoxystrobin of *Monilinia fructicola* isolates from Brazilian stone fruits is not associated with previously described mutations in the Cytochrome *B* gene. *Plant Dis* 101 (5): 766-773. doi: 10.1094/PDIS-09-16-1247-RE
- Petróczy M., Palkovics L. (2006). First report of brown rot caused by *Monilinia fructicola* on imported peach in Hungary. *Plant Dis* 90 (3): 375. doi: 10.1094/PD-90-0375B
- Petróczy M., Palkovics L. (2009). First report of *Monilia polystroma* on apple in Hungary. *Eur J Plant Pathol* 125 (2): 343-347. doi: 10.1007/s10658-009-9476-5

- Petróczy M., Szigethy A., Palkovics L. (2012). *Monilinia* species in Hungary: morphology, culture characteristics, and molecular analysis. *Trees (Berl West)* 26 (1): 153-164. doi: 10.1007/s00468-011-0622-2
- Poniatowska A., Michalecka M., Bielenin A. (2013). Characteristic of *Monilinia* spp. fungi causing brown rot of pome and stone fruits in Poland. *Eur J Plant Pathol* 135 (4): 855-865. doi: 10.1007/s10658-012-0130-2
- Pusey P. L., Wilson C. L. (1984). Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. *Plant Dis* 68 (9): 753-756. doi: 10.1094/PD-69-753
- Ren W., Shao W., Han X., Zhou M., Chen C. (2016). Molecular and biochemical characterization of laboratory and field mutants of *Botrytis cinerea* resistant to fludioxonil. *Plant Dis* 100 (7): 1414-1423. doi: 10.1094/PDIS-11-15-1290-RE
- Roberts J. W., Dunegan J. C. (1924). The fungus causing the common brown rot of fruits in America. *J Agric Res* 28 (9): 955-960
- Rungjindamai N., Jeffries P., Xu X. M. (2014). Epidemiology and management of brown rot on stone fruit caused by *Monilinia laxa*. *Eur J Plant Pathol* 140 (1): 1-17. doi: 10.1007/s10658-014-0452-3
- Sanoamuang N., Gaunt R. E. (1995). Persistence and fitness of carbendazim-resistant and dicarboximide-resistant isolates of *Monilinia fructicola* (Wint) Honey in flowers, shoots and fruit of stone fruit. *Plant Pathol* 44 (3): 448-457. doi: 10.1111/j.1365-3059.1995.tb01667.x
- Schnabel G., Dai Q. (2004). Heterologous expression of the P450 sterol 14 $\alpha$ -demethylase gene from *Monilinia fructicola* reduces sensitivity to some but not all DMI fungicides. *Pestic Biochem Physiol* 78 (1): 31-38. doi: 10.1016/j.pestbp.2003.09.008
- Schnabel G., Dai Q., Paradkar M. R. (2003). Cloning and expression analysis of the ATP binding cassette transporter MFABC1 gene and the alternative oxidase gene MfAOX1 from *Monilinia fructicola*. *Pest Manag Sci* 59 (10): 1143-1151. doi: 10.1002/ps.744
- Schnabel G., Bryson P. K., Bridges W. C., Brannen P. M. (2004). Reduced sensitivity in *Monilinia fructicola* to propiconazole in Georgia and implications for disease management. *Plant Dis* 88 (9): 1000-1004. doi: 10.1094/PDIS.2004.88.9.1000
- Sholberg P. L., Gaunce A. P. (1996). Fumigation of stone fruit with acetic acid to control postharvest decay. *Crop Prot* 15 (8): 681-686. doi: 10.1016/S0261-2194(96)00039-7
- Shao W. (2009). Etiology, occurrence and control of papaya (*Chaenomeles lagenaria*) brown rot. Magistarski rad. Huazhong Agronomsko Sveučilište, Wuhan

- Sharma R. R., Singh D., Singh R. (2009). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biol Control* 50 (3): 205-221. doi: 10.1016/j.biocontrol.2009.05.001
- Smilanick J. L., Denis-Arrue R., Bosch J. R., Gonzalez A. R., Henson D., Janisiewicz W. J. (1993). Control of postharvest brown rot of nectarines and peaches by *Pseudomonas* species. *Crop Prot* 12 (7): 513-520. doi: 10.1016/0261-2194(93)90092-W
- Sneath P. H. A., Sokal R. R. (1973). *Numerical Taxonomy. The principles and practice of numerical classification.* W. H. Freeman and Company, San Francisco, SAD, pp. 573
- Snyder C. L., Jones A. L. (1999). Genetic variation between strains of *Monilinia fructicola* and *Monilinia laxa* isolated from cherries in Michigan. *Can J Plant Pathol* 21 (1):70-77. doi: 10.1080/07060661.1999.10599997
- Spiegel J., Stammler G. (2006). Baseline sensitivity of *Monilinia laxa* and *M. fructigena* to pyraclostrobin and boscalid. *J Plant Dis Prot* 113 (5): 199-206. doi: 10.1007/BF03356181
- Stammler G., Brix H. D., Nave B., Gold R., Schoefl U. (2007). Studies on the biological performance of boscalid and its mode of action. U: Dehne H. W., Deising H. B., Gisi U., Kuck K. H., Russell P. E., Lyr H. (ur) *Proceedings of 15<sup>th</sup> International Reinhardsbrunn Symposium, Modern fungicides and antifungal compounds V*, Friedrichroda, Njemačka, pp. 45-51
- Steinfeld U., Sierotzki H., Parisi S., Gisi U. (2002). Comparison of resistance mechanisms to strobilurin fungicides in *Venturia inaequalis*. U: Lyr H., Russell P. E., Dehne H.-W., Gisi U., Kuck K.-H. (ur) *Proceedings of 13<sup>th</sup> International Reinhardsbrunn Symposium, Modern fungicides and antifungal compounds III*, Bonn, Njemačka, pp. 167-176
- Stevens C., Wilson C. L., Lu J. Y., Khan V. A., Chalutz E., Droby S., Kabwe M. K., Haung Z., Adeyeye O., Pusey L. P. (1996). Plant hormesis induced by ultraviolet light-C for controlling postharvest diseases of tree fruits. *Crop Prot* 15 (2): 129-134. doi: 10.1016/0261-2194(95)00082-8
- Stevens C., Khan V. A., Wilson C. L., Lu J. Y., Chalutz E., Droby S. (2005). The effect of fruit orientation of postharvest commodities following low dose ultraviolet light-C treatment on host induced resistance to decay. *Crop Prot* 24 (8): 756-759. doi: 10.1016/j.cropro.2004.12.008
- Šubić M. (2016). Mogućnosti i ograničenja suzbijanja štetnih organizama u suvremenim nasadima trešanja prema integriranim načelima. *Glasilo biljne zaštite* 16 (4): 365-377

- Tamm L., Fluckiger W. (1993). Influence of temperature and moisture on growth, spore production, and conidial germination of *Monilinia laxa*. *Phytopathology* 83 (12): 1321-1326. doi: 10.1094/Phyto-83-1321
- Tanović B., Gašić S., Hrustić J., Mihajlović M., Grahovac M., Delibašić G., Stevanović M. (2013). Development of a thyme essential oil formulation and its effect on *Monilinia fructigena*. *Pestic Phytomed* 28 (4): 273-280. doi: 10.2298/PIF1304273T
- Terui M., Harada Y. (1966). Apothecial production of *Monilinia fructicola* on artificial media. *Trans Mycol Soc Japan* 7 (2, 3): 309-311
- Thompson J. D., Gibson T. J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D. G. (1997). The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25 (24): 4876-4882. doi: 10.1093/nar/25.24.4876
- Tian S. P., Bertolini P. (1999). Effect of temperature during conidial formation of *Monilinia laxa* on conidial size, germination and infection of stored nectarines. *J Phytopathol* 147 (11-12): 635-641. doi: 10.1046/j.1439-0434.1999.00440.x
- Tomić Ž. (1993). Glijivične bolesti šećerne repe u Hrvatskoj s posebnim osvrtom na njihovo suzbijanje. Magistarski rad. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zagreb
- Tronsmo A., Raa J. (1977). Antagonistic action of *Trichoderma pseudokoningii* against the apple pathogen *Botrytis cinerea*. *J Phytopathol* 89 (3): 216-220. doi: 10.1111/j.1439-0434.1977.tb02861.x
- Turechek B., Heidenreich C., Burr T. (2001). Brown rot. NYS IPM Tree Fruit Crops Fact Sheet Series (Revised). (preuzeto s: [https://s3.amazonaws.com/assets.cce.cornell.edu/attachments/28087/Brown\\_Rot\\_1.22.18.pdf?1516651892](https://s3.amazonaws.com/assets.cce.cornell.edu/attachments/28087/Brown_Rot_1.22.18.pdf?1516651892); 1.11.2019.)
- Valleau W. D. (1915). Varietal resistance of plums to brown rot. *J Agric Res* 5 (9): 365-396
- Van Brouwershaven I. R., Bruil M. L., Van Leeuwen G. C. M., Kox L. F. F. (2010). A real-time (TaqMan) PCR assay to differentiate *Monilinia fructicola* from other three brown rot fungi of fruit crops. *Plant Pathol* 59 (3): 548-555. doi: 10.1111/j.1365-3059.2009.02220.x
- Van Leeuwen G. C. M. (2000). The brown rot fungi of fruit crops (*Monilinia* spp.), with special reference to *Monilinia fructigena* (Aderh. & Ruhl.) Honey. Doktorska disertacija. Sveučilište u Wageningenu, Wageningen



- Van Leeuwen G. C. M., Van Kesteren H. A. (1998). Delineation of the three brown rot fungi of fruit crops (*Monilinia* spp.) on the basis of quantitative characteristics. *Can J Bot* 76 (12): 2041-2050. doi: 10.1139/cjb-76-12-2042
- Van Leeuwen G. C. M., Baayern R. P., Jeger M. J. (2001). Pest risk analysis (PRA) for the countries of the European Union as PRA area on *Monilinia fructicola*. *Bull OEPP* 31 (4): 481-487. doi: 10.1111/j.1365-2338.2001.tb01030.x
- Van Leeuwen G. C. M., Baayen R. P., Holb I. J., Jeger M. J. (2002). Distinction of the Asiatic brown rot fungus *Monilinia polystroma* sp. nov. from *M. fructigena*. *Mycol Res* 106 (4): 444-451. doi: 10.1017/S0953756202005695
- Vasić M., Duduk N., Ivanović M. S. (2013). First report of brown rot caused by *Monilia polystroma* on apple in Serbia. *Plant Dis* 97 (1): 145. doi: 10.1094/PDIS-07-12-0670-PDN
- Villani S. M., Cox K. D. (2011). Characterizing fenbuconazole and propiconazole sensitivity and prevalence of 'Mona' in isolates of *Monilinia fructicola* from New York. *Plant Dis* 95 (7): 828-834. doi: 10.1094/PDIS-12-10-0943
- Villarino M. (2010). Brown rot epidemiology on peach after the introduction of quarantine pathogen *Monilinia fructicola* in Spain. *Doktorska disertacija*. Sveučilište u Madridu, Madrid
- Villarino M., Melgarejo P., Usall J., Segarra J., De Cal A. (2010). Primary inoculum sources of *Monilinia* spp. in Spanish peach orchards and their relative importance in Brown rot. *Plant Dis* 94 (8): 1048-1054. doi: 10.1094/PDIS-94-8-1048
- Villarino M., Sandin-España P., Melgarejo P., De Cal A. (2011). High chlorogenic and neochlorogenic acid levels in immature peach reduce *Monilinia laxa* infection by interfering with fungal melanin biosynthesis. *J Agric Food Chem* 59 (7): 3205-3213. doi: 10.1021/jf104251z
- Villarino M., Melgarejo P., Usall J., Segarra J., Lamarca N., De Cal A. (2012a). Secondary inoculum dynamics of *Monilinia* spp. and relationship to the incidence of postharvest brown rot in peaches and the weather conditions during the growing season. *Eur J Plant Pathol* 133 (3): 585-598. doi: 10.1007/s10658-011-9931-y
- Villarino M., Larena I., Martinez F., Melgarejo P., De Cal A. (2012b). Analysis of genetic diversity in *Monilinia fructicola* from the Ebro Valley in Spain using ISSR and RAPD markers. *Eur J Plant Pathol* 132 (4): 511-524. doi: 10.1007/s10658-011-9895-y
- Wade G. C. (1956). Investigations on the brown rot of apricots caused by *Sclerotinia fructicola* (Wint.) Rehm.: The occurrence of latent infection in fruit. *Aust J Agric Res* 7 (6): 504-516. doi: 10.1071/AR9560516

- Wang J., Guo L., Xiao C., Zhu X. (2018). Detection and identification of six *Monilinia* spp. causing brown rot using TaqMan Real-Time PCR from pure cultures and infected apple fruit. *Plant Dis* 102 (8): 1527-1533. doi: 10.1094/PDIS-10-17-1662-RE
- Watson W. A., Zehr E. I., Grimes L. W. (2002). Influence of temperature and wetting period on inoculum production by *Monilinia fructicola* in peach twig cankers. *Plant Dis* 86 (6): 666-668. doi: 10.1094/PDIS.2002.86.6.666
- Weaver L. O. (1950). Effect of temperature and relative humidity on occurrence of blossom blight of stone fruits. *Phytopathology* 40 (12): 1136-1153
- Weber R. W. S. (2010). Occurrence of Hyd R3 fenhexamid resistance among *Botrytis* isolates in Northern German soft fruit production. *J Plant Dis Prot* 117 (4): 177-179. doi: 10.1007/BF03356357
- Weber R. W. S., Hahn M. (2011). A rapid and simple method for determining fungicide resistance in *Botrytis*. *J Plant Dis Prot* 118 (1): 17-25. doi: 10.1007/BF03356376
- Weger J., Schanze M., Hilber-Bodmer M., Smits T. H. M., Patocchi A. (2011). First report of the  $\beta$ -Tubulin E198A mutation conferring resistance to methyl benzimidazole carbamates in European isolates of *Monilinia fructicola*. *Plant Dis* 95 (4): 497. doi: 10.1094/PDIS-12-10-0922
- Whan J. H. (1976). Tolerance of *Sclerotinia fructicola* to benomyl. *Plant Dis Rep* 60: 200-201
- White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. U: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J., ur), Academic Press, San Diego, California, SAD, pp. 315-322
- Wilcox W. F. (1989). Influence of environment and inoculum density on the incidence of brown rot blossom blight of sour cherry. *Phytopathology* 79 (5): 530-534. doi: 10.1094/Phyto-79-530
- Willetts H. J., Harada Y. (1984). A review of apothecial production by *Monilinia fungi* in Japan. *Mycologia* 76 (2): 314-325. doi: 10.2307/3793107
- Wilson I. G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol* 63 (10): 371-375
- Xu X.-M., Robinson J. D. (2000). Epidemiology of brown rot (*Monilinia fructigena*) on apple: infection of fruits by conidia. *Plant Pathol* 49 (2): 201-206. doi: 10.1046/j.1365-3059.2000.00437.x

- Xu X.-M., Guerin L., Robinson J. D. (2001). Effects of temperature and relative humidity on conidial germination and viability, colonization and sporulation of *Monilinia fructigena*. *Plant Pathol* 50 (5): 561-568. doi: 10.1046/j.1365-3059.2001.00606.x
- Xu X.-M., Bertone C., Berrie A. (2007). Effects of wounding, fruit age and wetness duration on the development of cherry brown rot in the UK. *Plant Pathol* 56 (1): 114-119. doi: 10.1111/j.1365-3059.2006.01502.x
- Yin L. F., Chen G. K., Chen S. N., Du S. F., Li G. Q., Luo C. X. (2014a). First report of brown rot caused by *Monilia mumecola* on Chinese sour cherry in Chongqing Municipality, China. *Plant Dis* 98 (7): 1009. doi: 10.1094/PDIS-01-14-0029-PDN
- Yin L. F., Chen S. N., Cai M. L., Li G. Q., Luo C. X. (2014b). First report of brown rot of apricot caused by *Monilia mumecola*. *Plant Dis* 98 (5): 694. doi: 10.1094/PDIS-09-13-0995-PDN
- Yoshimura M. A., Luo Y., Ma Z., Michailides T. J. (2004). Sensitivity of *Monilinia fructicola* from stone fruit to thiophanate-methyl, iprodione, and tebuconazole. *Plant Dis* 88 (4): 373-378. doi: 10.1094/PDIS.2004.88.4.373
- Zehr E. I. (1982). Control of brown rot in peach orchards. *Plant Dis* 66 (12): 1101-1105. doi: 10.1094/PD-66-1101
- Zehr E. I., Toler J. E., Luszcz L. A. (1991). Spread and persistence of benomyl-resistant *Monilinia fructicola* in South Carolina peach orchards. *Plant Dis* 75 (6): 590-593. doi: 10.1094/PD-75-0590
- Zehr E. I., Luszcz L. A., Olien W. C., Newall W. C., Toler J. E. (1999). Reduced sensitivity in *Monilinia fructicola* to propiconazole following prolonged exposure in peach orchards. *Plant Dis* 83 (10): 913-916. doi: 10.1094/PDIS.1999.83.10.913
- Zhang C. Q., Yuan S. K., Sun H. Y., Qi Z. Q., Zhou M. G., Zhu G. N. (2007). Sensitivity of *Botrytis cinerea* from vegetable greenhouses to boscalid. *Plant Pathol* 56 (4): 646-653. doi: 10.1111/j.1365-3059.2007.01611.x
- Zhang Z., Schwartz S., Wagner L., Miller W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol* 7 (1-2): 203-214. doi: 10.1089/10665270050081478
- Zhao H., Kim Y. K., Huang L., Xiao C. L. (2010). Resistance to thiabendazole and baseline sensitivity to fludioxonil and pyrimethanil in *Botrytis cinerea* populations from apple and pear in Washington State. *Postharvest Biol Technol* 56 (1): 12-18. doi: 10.1016/j.postharvbio.2009.11.013

Zhao Y. Z., Wang D., Liu Z. H. (2013). First report of brown rot on *Crataegus pinnatifida* var. *major* caused by *Monilia yunnanensis* in China. *Plant Dis* 97 (9): 1249. doi: 10.1094/PDIS-01-13-0085-PDN

Zhu X.-Q., Guo L.-Y. (2010). First report of brown rot on plum caused by *Monilia polystroma* in China. *Plant Dis* 94 (4): 478-478. doi: 10.1094/PDIS-94-4-0478A

Zhu X.-Q., Chen X.-Y., Guo L.-Y. (2011). Population structure of brown rot fungi on stone fruits in China. *Plant Dis* 95 (10): 1284-1291. doi: 10.1094/PDIS-02-11-0079

Zhu X.-Q., Niu C.-W., Chen X.-Y., Guo L.-Y. (2016). *Monilinia* species associated with brown rot of cultivated apple and pear fruit in China. *Plant Dis* 100 (11): 2240-2250. doi: 10.1094/PDIS-03-16-0325-RE

## 8. ŽIVOTOPIS

Tina Fazinić rođena je 31.12.1981. u Zagrebu. Nakon završene osnovne škole, upisuje IV. gimnaziju u Zagrebu koju završava 2000. godine. Iste godine, upisuje Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, smjer Bilinogojstvo, a kasnije i usmjerenje Voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo. Diplomirala je 2008. godine pod mentorstvom prof. dr. sc. Ane Jeromel na temu „Miris vina na direktno rodne hibride“. Od 2010. godine zaposlena je u Centru za zaštitu bilja pri Hrvatskoj agenciji za poljoprivredu i hranu, gdje radi i danas. Do 2015. godine sudjeluje u radu Laboratorija za mikologiju, pri čemu se usavršava u istraživačkim djelatnostima iz područja fitopatologije, a usporedno radi na ocjeni dokumentacije za registraciju sredstava za zaštitu bilja iz područja učinkovitosti i ekotoksikologije. Poslijediplomski doktorski studij Poljoprivredne znanosti upisuje 2013. godine, prilikom čega se usmjerava na istraživanje gljiva roda *Monilinia* na koštičavom voću pod mentorstvom prof. dr. sc. Tihomira Miličevića. Od 2015. godine do danas radi unutar Odjela za sredstva za zaštitu bilja i biocide kao rukovoditeljica Odsjeka i Odjela, pri čemu nastavlja rad na ocjeni dokumentacije za registraciju sredstava za zaštitu bilja iz područja ekotoksikologije. Iz područja ocjene aktivnih tvari i sredstava za zaštitu bilja te dijagnostike biljnih patogena usavršava se u zemlji i inozemstvu, a suradnica je na Programima posebnog nadzora te na projektu „Monitoring rezistentnosti štetnih organizama na sredstva za zaštitu bilja u Republici Hrvatskoj (2018.-2020.)“. Autor je ili koautor jednog A1 i dva A2 znanstvena rada objavljena u domaćim i stranim časopisima te jednog stručnog rada. Iz područja fitopatologije izlaže na međunarodnim i domaćim znanstvenim i stručnim skupovima, a sudjeluje i na sastancima Europske agencije za sigurnost hrane (EFSA) i Europske i mediteranske organizacije za zaštitu bilja (EPPO) vezano uz aktivne tvari i sredstva za zaštitu bilja. Član je Hrvatskog društva biljne zaštite (HDBZ).

### IZDVOJENE PUBLIKACIJE

#### Znanstveni radovi (A1)

Ivić D., Fazinić, T., Novak A., Šajbić L., Stepanović M., Gotlin Čuljak T., Miličević T. (2020). Resistance of *Monilinia fructicola* to thiophanate-methyl in Croatia. Eur J Plant Pathol. doi: 10.1007/s10658-020-02131-5

#### Znanstveni radovi (A2)

Ivić D., Fazinić T., Cole J., Novak A. (2014). *Monilinia* species identified on peach and nectarine in Croatia, with the first record of *Monilinia fructicola*. Bull OEPP 44 (1): 70-72. doi: 10.1111/epp.12085

Fazinić T., Lovrek Z., Ivić D. (2017). Potential impact and management of *Monilinia fructicola* in an integrated peach orchard. Agric Conspec Sci 82 (1): 27-31

#### Stručni radovi

Ivić D., Fazinić T. (2011). Certifikacijske sheme za proizvodnju sadnog materijala značajnih voćnih vrsta u Hrvatskoj. Pom Croat 17 (1-2): 31-36

#### Sažeci objavljeni u zbornicima sažetaka skupova

Fazinić T., Ivić D., Lovrek Z., Miličević T. (2016). Management and potential impact of *Monilinia fructicola* on peach in Croatia. U: Jemrić T. (ur) Book of abstracts of International symposium on sustainable fruit production, Donja Stubica, Hrvatska, pp. 67

Fazinić T., Tomić Ž., Sever Z., Miličević T., Ivić D. (2016). Jumping across Atlantic Ocean – North American plant pathogenic fungi invading Croatia. U: Jelaska S. D. (ur) Book of abstracts of 2<sup>nd</sup> Croatian Symposium on invasive species, Zagreb, Hrvatska, pp. 37

Fazinić T., Sever Z., Miličević T., Ivić D. (2017). *Monilinia* vrste na jezgričavom i koštičavom voću u Republici Hrvatskoj. U: Cvjetković B. (ur) Zbornik sažetaka 61. seminara biljne zaštite, Opatija, 20

Fazinić T., Novak A., Križanac I., Sever Z., Šajbić L., Šimunac K., Ivić D. (2019). Prvi nalaz *Monilinia fructicola* na trešnji u Hrvatskoj. Zbornik sažetaka 63. seminara biljne zaštite, Opatija, Hrvatska, pp. 66-67

### **Brošura**

Ivić D., Fazinić T. (2011). Gospodarski značajni virusi vinove loze. Hrvatski centar za poljoprivredu, hranu i selo, Zagreb, Hrvatska, pp. 1-38

## 9. PRILOZI

Prilog 1. Sakupljeni uzorci simptomatičnih plodova breskve, nektarine i šljive, lokacije i datumi uzorkovanja te biljka domaćin

Broj	Oznaka uzorka	Lokacija	Županija	Datum uzorkovanja	Domaćin
1.	ME 123/12	Modrić	Dubrovačko-neretvanska	3.7.2012.	Breskva
2.	ME 126/12	Metković	Dubrovačko-neretvanska	3.7.2012.	Breskva
3.	ME 127/12	Metković	Dubrovačko-neretvanska	3.7.2012.	Breskva
4.	ME 128/12	Metković	Dubrovačko-neretvanska	3.7.2012.	Breskva
5.	ME 129/12	Modrić	Dubrovačko-neretvanska	3.7.2012.	Breskva
6.	VD 32/12	Kroška	Splitsko-dalmatinska	3.7.2012.	Breskva
7.	VD 33/12	Kroška	Splitsko-dalmatinska	3.7.2012.	Breskva
8.	VD 34/12	Kroška	Splitsko-dalmatinska	3.7.2012.	Breskva
9.	VD 35/12	Kroška	Splitsko-dalmatinska	3.7.2012.	Breskva
10.	VD 36/12	Kroška	Splitsko-dalmatinska	3.7.2012.	Breskva
11.	VD 37/12	Kroška	Splitsko-dalmatinska	3.7.2012.	Breskva
12.	VD 38/12	Kroška	Splitsko-dalmatinska	3.7.2012.	Breskva
13.	VD 39/12	Kroška	Splitsko-dalmatinska	3.7.2012.	Breskva
14.	VD 40/12	Kroška	Splitsko-dalmatinska	3.7.2012.	Breskva
15.	VD 41/12	Kroška	Splitsko-dalmatinska	3.7.2012.	Nektarina
16.	VD 42/12	Kroška	Splitsko-dalmatinska	3.7.2012.	Nektarina
17.	VD 43/12	Kroška	Splitsko-dalmatinska	3.7.2012.	Nektarina
18.	VD 44/12	Kroška	Splitsko-dalmatinska	3.7.2012.	Nektarina
19.	VD 45/12	Kroška	Splitsko-dalmatinska	3.7.2012.	Nektarina
20.	VD 46/12	Kroška	Splitsko-dalmatinska	3.7.2012.	Nektarina
21.	VD 47/12	Kroška	Splitsko-dalmatinska	3.7.2012.	Nektarina
22.	VD 48/12	Kroška	Splitsko-dalmatinska	3.7.2012.	Nektarina
23.	VD 49/12	Kroška	Splitsko-dalmatinska	3.7.2012.	Nektarina

Broj	Oznaka uzorka	Lokacija	Županija	Datum uzorkovanja	Domaćin
24.	VD 50/12	Kroška	Splitsko-dalmatinska	3.7.2012.	Nektarina
25.	VD 51/12	Kroška	Splitsko-dalmatinska	3.7.2012.	Nektarina
26.	ZD 124/12	Podgradina	Zadarska	16.7.2012.	Breskva
27.	ZD 125/12	Podgradina	Zadarska	16.7.2012.	Breskva
28.	ZD 126/12	Podgradina	Zadarska	16.7.2012.	Breskva
29.	ZD 127/12	Podgradina	Zadarska	16.7.2012.	Breskva
30.	ZD 128/12	Podgradina	Zadarska	16.7.2012.	Breskva
31.	ZD 129/12	Podgradina	Zadarska	16.7.2012.	Breskva
32.	ZD 130/12	Podgradina	Zadarska	16.7.2012.	Breskva
33.	ZD 131/12	Podgradina	Zadarska	16.7.2012.	Breskva
34.	ZD 132/12	Podgradina	Zadarska	16.7.2012.	Breskva
35.	ZD 133/12	Podgradina	Zadarska	16.7.2012.	Breskva
36.	ZD 134/12	Podgradina	Zadarska	16.7.2012.	Breskva
37.	ZD 135/12	Podgradina	Zadarska	16.7.2012.	Breskva
38.	ZD 136/12	Podgradina	Zadarska	16.7.2012.	Breskva
39.	ZD 137/12	Podgradina	Zadarska	16.7.2012.	Breskva
40.	ZD 138/12	Podgradina	Zadarska	16.7.2012.	Breskva
41.	ZD 139/12	Kašić	Zadarska	16.7.2012.	Breskva
42.	ZD 140/12	Kašić	Zadarska	16.7.2012.	Breskva
43.	ZD 141/12	Kašić	Zadarska	16.7.2012.	Breskva
44.	ZD 142/12	Kašić	Zadarska	16.7.2012.	Breskva
45.	ZD 143/12	Kašić	Zadarska	16.7.2012.	Breskva
46.	ZD 144/12	Kašić	Zadarska	16.7.2012.	Breskva
47.	ZD 145/12	Kašić	Zadarska	16.7.2012.	Breskva
48.	ZD 146/12	Kašić	Zadarska	16.7.2012.	Breskva
49.	ZD 147/12	Kašić	Zadarska	16.7.2012.	Breskva
50.	ZD 148/12	Kašić	Zadarska	16.7.2012.	Breskva



Broj	Oznaka uzorka	Lokacija	Županija	Datum uzorkovanja	Domaćin
51.	ZD 149/12	Kašić	Zadarska	16.7.2012.	Breskva
52.	ZD 150/12	Kašić	Zadarska	16.7.2012.	Breskva
53.	ZD 151/12	Kašić	Zadarska	16.7.2012.	Nektarina
54.	ZD 152/12	Kašić	Zadarska	16.7.2012.	Nektarina
55.	ZD 153/12	Kašić	Zadarska	16.7.2012.	Nektarina
56.	ZD 154/12	Kašić	Zadarska	16.7.2012.	Nektarina
57.	ZD 155/12	Kašić	Zadarska	16.7.2012.	Nektarina
58.	ZD 156/12	Kašić	Zadarska	16.7.2012.	Nektarina
59.	ZD 157/12	Kašić	Zadarska	16.7.2012.	Nektarina
60.	ZD 158/12	Kašić	Zadarska	16.7.2012.	Nektarina
61.	ZD 159/12	Kašić	Zadarska	16.7.2012.	Nektarina
62.	ZD 160/12	Kašić	Zadarska	16.7.2012.	Nektarina
63.	ZD 161/12	Kašić	Zadarska	16.7.2012.	Nektarina
64.	ZD 162/12	Smilčić	Zadarska	16.7.2012.	Nektarina
65.	ZD 163/12	Smilčić	Zadarska	16.7.2012.	Nektarina
66.	ZD 164/12	Smilčić	Zadarska	16.7.2012.	Nektarina
67.	ZD 165/12	Smilčić	Zadarska	16.7.2012.	Nektarina
68.	ZD 166/12	Smilčić	Zadarska	16.7.2012.	Nektarina
69.	ZD 167/12	Smilčić	Zadarska	16.7.2012.	Nektarina
70.	ZD 168/12	Smilčić	Zadarska	16.7.2012.	Nektarina
71.	PO 93/12	Finida	Istarska	17.7.2012.	Nektarina
72.	PO 94/12	Finida	Istarska	17.7.2012.	Nektarina
73.	PO 95/12	Finida	Istarska	17.7.2012.	Nektarina
74.	PO 96/12	Finida	Istarska	17.7.2012.	Nektarina
75.	PO 97/12	Finida	Istarska	17.7.2012.	Nektarina
76.	PO 98/12	Finida	Istarska	17.7.2012.	Nektarina
77.	PO 99/12	Finida	Istarska	17.7.2012.	Nektarina

Broj	Oznaka uzorka	Lokacija	Županija	Datum uzorkovanja	Domaćin
78.	PO 100/12	Finida	Istarska	17.7.2012.	Nektarina
79.	PO 101/12	Finida	Istarska	17.7.2012.	Nektarina
80.	PO 102/12	Finida	Istarska	17.7.2012.	Nektarina
81.	PO 103/12	Finida	Istarska	17.7.2012.	Nektarina
82.	PO 104/12	Finida	Istarska	17.7.2012.	Breskva
83.	PO 105/12	Finida	Istarska	17.7.2012.	Breskva
84.	PO 106/12	Finida	Istarska	17.7.2012.	Breskva
85.	PO 107/12	Finida	Istarska	17.7.2012.	Breskva
86.	PO 108/12	Finida	Istarska	17.7.2012.	Breskva
87.	PO 109/12	Finida	Istarska	17.7.2012.	Breskva
88.	PO 110/12	Finida	Istarska	17.7.2012.	Breskva
89.	PO 111/12	Finida	Istarska	17.7.2012.	Breskva
90.	PO 112/12	Finida	Istarska	17.7.2012.	Breskva
91.	PO 113/12	Finida	Istarska	17.7.2012.	Breskva
92.	PO 114/12	Finida	Istarska	17.7.2012.	Breskva
93.	PO 115/12	Finida	Istarska	17.7.2012.	Breskva
94.	PO 116/12	Finida	Istarska	17.7.2012.	Breskva
95.	PO 117/12	Finida	Istarska	17.7.2012.	Breskva
96.	PO 118/12	Finida	Istarska	17.7.2012.	Breskva
97.	PO 119/12	Finida	Istarska	17.7.2012.	Breskva
98.	PO 120/12	Finida	Istarska	17.7.2012.	Breskva
99.	PO 121/12	Finida	Istarska	17.7.2012.	Breskva
100.	PO 122/12	Finida	Istarska	17.7.2012.	Breskva
101.	PO 123/12	Finida	Istarska	17.7.2012.	Breskva
102.	VŽ 79/12	Biškupec	Varaždinska	18.7.2012.	Breskva
103.	VŽ 80/12	Biškupec	Varaždinska	18.7.2012.	Breskva
104.	VŽ 81/12	Biškupec	Varaždinska	18.7.2012.	Breskva

Broj	Oznaka uzorka	Lokacija	Županija	Datum uzorkovanja	Domaćin
105.	VŽ 82/12	Biškupec	Varaždinska	18.7.2012.	Breskva
106.	VŽ 83/12	Biškupec	Varaždinska	18.7.2012.	Breskva
107.	VŽ 84/12	Biškupec	Varaždinska	18.7.2012.	Breskva
108.	VŽ 85/12	Vratišinec	Međimurska	18.7.2012.	Breskva
109.	VŽ 86/12	Vratišinec	Međimurska	18.7.2012.	Breskva
110.	VŽ 87/12	Vratišinec	Međimurska	18.7.2012.	Nektarina
111.	VŽ 88/12	Vratišinec	Međimurska	18.7.2012.	Nektarina
112.	VŽ 89/12	Vratišinec	Međimurska	18.7.2012.	Nektarina
113.	VŽ 90/12	Vratišinec	Međimurska	18.7.2012.	Nektarina
114.	BR 52/12	Novo Čiče	Zagrebačka	19.7.2012.	Breskva
115.	BR 53/12	Novo Čiče	Zagrebačka	19.7.2012.	Breskva
116.	BR 54/12	Staro Čiče	Zagrebačka	19.7.2012.	Breskva
117.	BR 55/12	Staro Čiče	Zagrebačka	19.7.2012.	Breskva
118.	BR 56/12	Staro Čiče	Zagrebačka	19.7.2012.	Breskva
119.	BR 57/12	Staro Čiče	Zagrebačka	19.7.2012.	Breskva
120.	BR 58/12	Staro Čiče	Zagrebačka	19.7.2012.	Breskva
121.	BR 59/12	Staro Čiče	Zagrebačka	19.7.2012.	Breskva
122.	BR 60/12	Staro Čiče	Zagrebačka	19.7.2012.	Breskva
123.	BR 61/12	Staro Čiče	Zagrebačka	19.7.2012.	Breskva
124.	BR 62/12	Staro Čiče	Zagrebačka	19.7.2012.	Breskva
125.	BR 63/12	Staro Čiče	Zagrebačka	19.7.2012.	Breskva
126.	BR 64/12	Staro Čiče	Zagrebačka	19.7.2012.	Breskva
127.	BR 65/12	Velika Ludina	Sisačko-moslavačka	19.7.2012.	Breskva
128.	BR 66/12	Velika Ludina	Sisačko-moslavačka	19.7.2012.	Breskva
129.	BR 67/12	Velika Ludina	Sisačko-moslavačka	19.7.2012.	Breskva
130.	BR 68/12	Velika Ludina	Sisačko-moslavačka	19.7.2012.	Breskva
131.	BR 69/12	Velika Ludina	Sisačko-moslavačka	19.7.2012.	Nektarina

Broj	Oznaka uzorka	Lokacija	Županija	Datum uzorkovanja	Domaćin
132.	BR 70/12	Velika Ludina	Sisačko-moslavačka	19.7.2012.	Nektarina
133.	BR 71/12	Velika Ludina	Sisačko-moslavačka	19.7.2012.	Nektarina
134.	BR 72/12	Velika Ludina	Sisačko-moslavačka	19.7.2012.	Nektarina
135.	BR 73/12	Velika Ludina	Sisačko-moslavačka	19.7.2012.	Nektarina
136.	BR 74/12	Velika Ludina	Sisačko-moslavačka	19.7.2012.	Nektarina
137.	BR 75/12	Bukovje Bistransko	Zagrebačka	19.7.2012.	Nektarina
138.	BR 76/12	Bukovje Bistransko	Zagrebačka	19.7.2012.	Nektarina
139.	VT 17/12	Vukosavljevica - Brdo	Virovitičko-podravska	24.7.2012.	Breskva
140.	VT 18/12	Vukosavljevica - Brdo	Virovitičko-podravska	24.7.2012.	Breskva
141.	VT 19/12	Vukosavljevica - Brdo	Virovitičko-podravska	24.7.2012.	Breskva
142.	VT 20/12	Vukosavljevica - Brdo	Virovitičko-podravska	24.7.2012.	Breskva
143.	VT 21/12	Vukosavljevica - Brdo	Virovitičko-podravska	24.7.2012.	Breskva
144.	VT 22/12	Vukosavljevica - Potok	Virovitičko-podravska	24.7.2012.	Breskva
145.	VT 23/12	Vukosavljevica - Potok	Virovitičko-podravska	24.7.2012.	Breskva
146.	KC 30/12	Rovišće	Bjelovarsko-bilogorska	26.7.2012.	Nektarina
147.	KC 31/12	Rovišće	Bjelovarsko-bilogorska	26.7.2012.	Nektarina
148.	KC 32/12	Rovišće	Bjelovarsko-bilogorska	26.7.2012.	Breskva
149.	KC 33/12	Rovišće	Bjelovarsko-bilogorska	26.7.2012.	Breskva
150.	KC 34/12	Rovišće	Bjelovarsko-bilogorska	26.7.2012.	Breskva
151.	KC 35/12	Novigrad Podravski	Koprivničko-križevačka	26.7.2012.	Breskva
152.	KC 36/12	Novigrad Podravski	Koprivničko-križevačka	26.7.2012.	Breskva
153.	KC 37/12	Novigrad Podravski	Koprivničko-križevačka	26.7.2012.	Breskva
154.	KC 38/12	Novigrad Podravski	Koprivničko-križevačka	26.7.2012.	Breskva
155.	KC 39/12	Novigrad Podravski	Koprivničko-križevačka	26.7.2012.	Breskva
156.	DB 32/12	Kamenac	Osječko-baranjska	27.7.2012.	Breskva
157.	DB 33/12	Kamenac	Osječko-baranjska	27.7.2012.	Breskva
158.	DB 34/12	Kamenac	Osječko-baranjska	27.7.2012.	Breskva

Broj	Oznaka uzorka	Lokacija	Županija	Datum uzorkovanja	Domaćin
159.	DB 35/12	Kamenac	Osječko-baranjska	27.7.2012.	Breskva
160.	DB 36/12	Kamenac	Osječko-baranjska	27.7.2012.	Breskva
161.	DB 37/12	Kamenac	Osječko-baranjska	27.7.2012.	Breskva
162.	DB 38/12	Kamenac	Osječko-baranjska	27.7.2012.	Nektarina
163.	DB 39/12	Kamenac	Osječko-baranjska	27.7.2012.	Nektarina
164.	DB 40/12	Kamenac	Osječko-baranjska	27.7.2012.	Nektarina
165.	DB 41/12	Kamenac	Osječko-baranjska	27.7.2012.	Nektarina
166.	ŽU 17/12	Završje	Brodsko-posavska	31.7.2012.	Breskva
167.	ŽU 18/12	Završje	Brodsko-posavska	31.7.2012.	Breskva
168.	ŽU 19/12	Završje	Brodsko-posavska	31.7.2012.	Breskva
169.	ŽU 20/12	Završje	Brodsko-posavska	31.7.2012.	Breskva
170.	ŽU 21/12	Završje	Brodsko-posavska	31.7.2012.	Breskva
171.	ŽU 22/12	Završje	Brodsko-posavska	31.7.2012.	Breskva
172.	ŽU 23/12	Završje	Brodsko-posavska	31.7.2012.	Breskva
173.	VD 2/13	Veliki Prolog	Splitsko-dalmatinska	14.6.2013.	Breskva
174.	VD 3/13	Dusina	Splitsko-dalmatinska	14.6.2013.	Breskva
175.	VD 4/13	Dusina	Splitsko-dalmatinska	14.6.2013.	Breskva
176.	VD 5/13	Dusina	Splitsko-dalmatinska	14.6.2013.	Breskva
177.	VD 6/13	Dusina	Splitsko-dalmatinska	14.6.2013.	Breskva
178.	VD 7/13	Dusina	Splitsko-dalmatinska	14.6.2013.	Breskva
179.	VD 8/13	Dusina	Splitsko-dalmatinska	14.6.2013.	Breskva
180.	KC 42/13	Novigrad Podravski	Koprivničko-križevačka	10.7.2013.	Breskva
181.	KC 43/13	Novigrad Podravski	Koprivničko-križevačka	10.7.2013.	Breskva
182.	KC 44/13	Novigrad Podravski	Koprivničko-križevačka	10.7.2013.	Breskva
183.	KC 45/13	Novigrad Podravski	Koprivničko-križevačka	10.7.2013.	Breskva
184.	KC 46/13	Novigrad Podravski	Koprivničko-križevačka	10.7.2013.	Breskva
185.	KC 47/13	Novigrad Podravski	Koprivničko-križevačka	10.7.2013.	Breskva

Broj	Oznaka uzorka	Lokacija	Županija	Datum uzorkovanja	Domaćin
186.	KC 48/13	Novigrad Podravski	Koprivničko-križevačka	10.7.2013.	Breskva
187.	KC 49/13	Novigrad Podravski	Koprivničko-križevačka	10.7.2013.	Breskva
188.	KC 50/13	Novigrad Podravski	Koprivničko-križevačka	10.7.2013.	Breskva
189.	KC 51/13	Novigrad Podravski	Koprivničko-križevačka	10.7.2013.	Breskva
190.	ZG 17/13	Staro Čiče	Zagrebačka	11.7.2013.	Breskva
191.	ZG 18/13	Staro Čiče	Zagrebačka	11.7.2013.	Breskva
192.	ZG 19/13	Staro Čiče	Zagrebačka	11.7.2013.	Breskva
193.	ZG 20/13	Staro Čiče	Zagrebačka	11.7.2013.	Breskva
194.	ZG 21/13	Staro Čiče	Zagrebačka	11.7.2013.	Breskva
195.	ZG 22/13	Staro Čiče	Zagrebačka	11.7.2013.	Breskva
196.	ZG 23/13	Staro Čiče	Zagrebačka	11.7.2013.	Breskva
197.	ZG 24/13	Staro Čiče	Zagrebačka	11.7.2013.	Breskva
198.	ZG 25/13	Staro Čiče	Zagrebačka	11.7.2013.	Breskva
199.	ZG 26/13	Staro Čiče	Zagrebačka	11.7.2013.	Breskva
200.	ZG 27/13	Staro Čiče	Zagrebačka	11.7.2013.	Breskva
201.	ZG 28/13	Staro Čiče	Zagrebačka	11.7.2013.	Breskva
202.	ZG 29/13	Staro Čiče	Zagrebačka	11.7.2013.	Breskva
203.	ZG 30/13	Staro Čiče	Zagrebačka	11.7.2013.	Breskva
204.	ZG 31/13	Staro Čiče	Zagrebačka	11.7.2013.	Breskva
205.	PL 1/13	Vrbovci	Dubrovačko-neretvanska	11.7.2013.	Breskva
206.	PL 2/13	Vrbovci	Dubrovačko-neretvanska	11.7.2013.	Breskva
207.	PL 3/13	Vrbovci	Dubrovačko-neretvanska	11.7.2013.	Breskva
208.	PL 4/13	Vrbovci	Dubrovačko-neretvanska	11.7.2013.	Breskva
209.	PL 5/13	Vrbovci	Dubrovačko-neretvanska	11.7.2013.	Breskva
210.	PL 6/13	Vrbovci	Dubrovačko-neretvanska	11.7.2013.	Breskva
211.	PL 7/13	Vrbovci	Dubrovačko-neretvanska	11.7.2013.	Breskva
212.	PL 8/13	Vrbovci	Dubrovačko-neretvanska	11.7.2013.	Breskva

Broj	Oznaka uzorka	Lokacija	Županija	Datum uzorkovanja	Domaćin
213.	PL 9/13	Vrbovci	Dubrovačko-neretvanska	11.7.2013.	Breskva
214.	PL 10/13	Vrbovci	Dubrovačko-neretvanska	11.7.2013.	Breskva
215.	PL 11/13	Vrbovci	Dubrovačko-neretvanska	11.7.2013.	Breskva
216.	PL 12/13	Vrbovci	Dubrovačko-neretvanska	11.7.2013.	Breskva
217.	PL 13/13	Vrbovci	Dubrovačko-neretvanska	11.7.2013.	Breskva
218.	PL 14/13	Vrbovci	Dubrovačko-neretvanska	11.7.2013.	Breskva
219.	PL 15/13	Vrbovci	Dubrovačko-neretvanska	11.7.2013.	Breskva
220.	PL 16/13	Vrbovci	Dubrovačko-neretvanska	11.7.2013.	Breskva
221.	PL 17/13	Vrbovci	Dubrovačko-neretvanska	11.7.2013.	Breskva
222.	NS 3/13	Umčani	Splitsko-dalmatinska	11.7.2013.	Breskva
223.	NS 4/13	Umčani	Splitsko-dalmatinska	11.7.2013.	Breskva
224.	NS 5/13	Umčani	Splitsko-dalmatinska	11.7.2013.	Breskva
225.	NS 6/13	Umčani	Splitsko-dalmatinska	11.7.2013.	Breskva
226.	NS 7/13	Umčani	Splitsko-dalmatinska	11.7.2013.	Breskva
227.	NS 8/13	Umčani	Splitsko-dalmatinska	11.7.2013.	Breskva
228.	NS 9/13	Umčani	Splitsko-dalmatinska	11.7.2013.	Breskva
229.	NS 10/13	Umčani	Splitsko-dalmatinska	11.7.2013.	Breskva
230.	NS 11/13	Umčani	Splitsko-dalmatinska	11.7.2013.	Breskva
231.	NS 12/13	Umčani	Splitsko-dalmatinska	11.7.2013.	Breskva
232.	NS 13/13	Umčani	Splitsko-dalmatinska	11.7.2013.	Breskva
233.	NS 14/13	Umčani	Splitsko-dalmatinska	11.7.2013.	Breskva
234.	NS 15/13	Umčani	Splitsko-dalmatinska	11.7.2013.	Breskva
235.	NS 16/13	Umčani	Splitsko-dalmatinska	11.7.2013.	Breskva
236.	NS 17/13	Umčani	Splitsko-dalmatinska	11.7.2013.	Breskva
237.	NS 18/13	Umčani	Splitsko-dalmatinska	11.7.2013.	Breskva
238.	NS 19/13	Umčani	Splitsko-dalmatinska	11.7.2013.	Breskva
239.	NS 20/13	Umčani	Splitsko-dalmatinska	11.7.2013.	Breskva

Broj	Oznaka uzorka	Lokacija	Županija	Datum uzorkovanja	Domaćin
240.	NS 21/13	Umčani	Splitsko-dalmatinska	11.7.2013.	Breskva
241.	NS 22/13	Umčani	Splitsko-dalmatinska	11.7.2013.	Breskva
242.	NS 23/13	Umčani	Splitsko-dalmatinska	11.7.2013.	Breskva
243.	NS 24/13	Umčani	Splitsko-dalmatinska	11.7.2013.	Šljiva
244.	NS 25/13	Umčani	Splitsko-dalmatinska	11.7.2013.	Šljiva
245.	NS 26/13	Umčani	Splitsko-dalmatinska	11.7.2013.	Šljiva
246.	NS 27/13	Umčani	Splitsko-dalmatinska	11.7.2013.	Šljiva
247.	NS 28/13	Umčani	Splitsko-dalmatinska	11.7.2013.	Šljiva
248.	NS 29/13	Umčani	Splitsko-dalmatinska	11.7.2013.	Šljiva
249.	NS 30/13	Umčani	Splitsko-dalmatinska	11.7.2013.	Šljiva
250.	NS 31/13	Umčani	Splitsko-dalmatinska	11.7.2013.	Šljiva
251.	NS 32/13	Umčani	Splitsko-dalmatinska	11.7.2013.	Šljiva
252.	NS 33/13	Umčani	Splitsko-dalmatinska	11.7.2013.	Šljiva
253.	NS 34/13	Umčani	Splitsko-dalmatinska	11.7.2013.	Šljiva
254.	NS 35/13	Umčani	Splitsko-dalmatinska	11.7.2013.	Šljiva
255.	NS 36/13	Umčani	Splitsko-dalmatinska	11.7.2013.	Šljiva
256.	NS 37/13	Umčani	Splitsko-dalmatinska	11.7.2013.	Šljiva
257.	NS 38/13	Umčani	Splitsko-dalmatinska	11.7.2013.	Šljiva
258.	NS 39/13	Umčani	Splitsko-dalmatinska	11.7.2013.	Šljiva
259.	NS 40/13	Umčani	Splitsko-dalmatinska	11.7.2013.	Šljiva
260.	NS 41/13	Umčani	Splitsko-dalmatinska	11.7.2013.	Šljiva
261.	NS 42/13	Umčani	Splitsko-dalmatinska	11.7.2013.	Šljiva
262.	NS 43/13	Umčani	Splitsko-dalmatinska	11.7.2013.	Šljiva
263.	NS 44/13	Umčani	Splitsko-dalmatinska	11.7.2013.	Šljiva
264.	NS 45/13	Umčani	Splitsko-dalmatinska	11.7.2013.	Šljiva
265.	NS 46/13	Umčani	Splitsko-dalmatinska	11.7.2013.	Šljiva
266.	NS 47/13	Umčani	Splitsko-dalmatinska	11.7.2013.	Šljiva



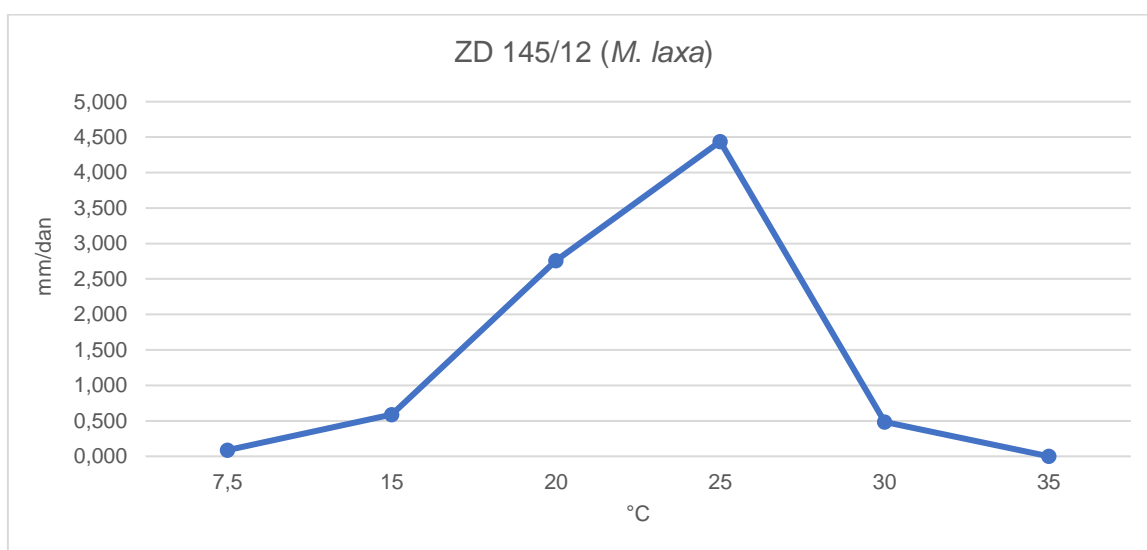
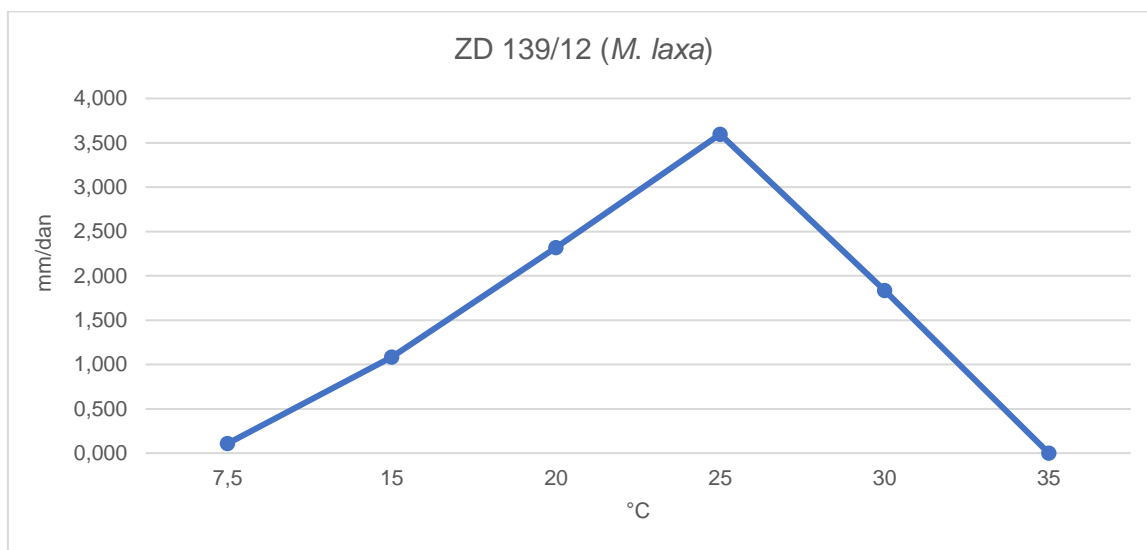
Broj	Oznaka uzorka	Lokacija	Županija	Datum uzorkovanja	Domaćin
267.	NS 48/13	Umčani	Splitsko-dalmatinska	11.7.2013.	Šljiva
268.	NS 49/13	Umčani	Splitsko-dalmatinska	11.7.2013.	Šljiva
269.	NS 50/13	Umčani	Splitsko-dalmatinska	11.7.2013.	Šljiva
270.	NS 51/13	Umčani	Splitsko-dalmatinska	11.7.2013.	Šljiva
271.	NS 52/13	Umčani	Splitsko-dalmatinska	11.7.2013.	Šljiva
272.	NS 53/13	Umčani	Splitsko-dalmatinska	11.7.2013.	Šljiva
273.	ZD 124/13	Baštica	Zadarska	16.7.2013.	Nektarina
274.	ZD 125/13	Baštica	Zadarska	16.7.2013.	Nektarina
275.	ZD 126/13	Baštica	Zadarska	16.7.2013.	Nektarina
276.	ZD 127/13	Baštica	Zadarska	16.7.2013.	Nektarina
277.	ZD 128/13	Baštica	Zadarska	16.7.2013.	Nektarina
278.	ZD 129/13	Baštica	Zadarska	16.7.2013.	Nektarina
279.	ZD 130/13	Baštica	Zadarska	16.7.2013.	Nektarina
280.	ZD 131/13	Baštica	Zadarska	16.7.2013.	Nektarina
281.	ZD 132/13	Baštica	Zadarska	16.7.2013.	Nektarina
282.	ZD 133/13	Baštica	Zadarska	16.7.2013.	Nektarina
283.	ZD 134/13	Smilčić	Zadarska	16.7.2013.	Nektarina
284.	ZD 135/13	Smilčić	Zadarska	16.7.2013.	Nektarina
285.	ZD 136/13	Smilčić	Zadarska	16.7.2013.	Nektarina
286.	ZD 137/13	Smilčić	Zadarska	16.7.2013.	Nektarina
287.	ZD 138/13	Smilčić	Zadarska	16.7.2013.	Nektarina
288.	ZD 139/13	Smilčić	Zadarska	16.7.2013.	Nektarina
289.	ZD 140/13	Smilčić	Zadarska	16.7.2013.	Nektarina
290.	ZD 141/13	Smilčić	Zadarska	16.7.2013.	Nektarina
291.	ZD 142/13	Smilčić	Zadarska	16.7.2013.	Nektarina
292.	ZD 143/13	Smilčić	Zadarska	16.7.2013.	Nektarina
293.	ZD 144/13	Škabrnja	Zadarska	16.7.2013.	Nektarina

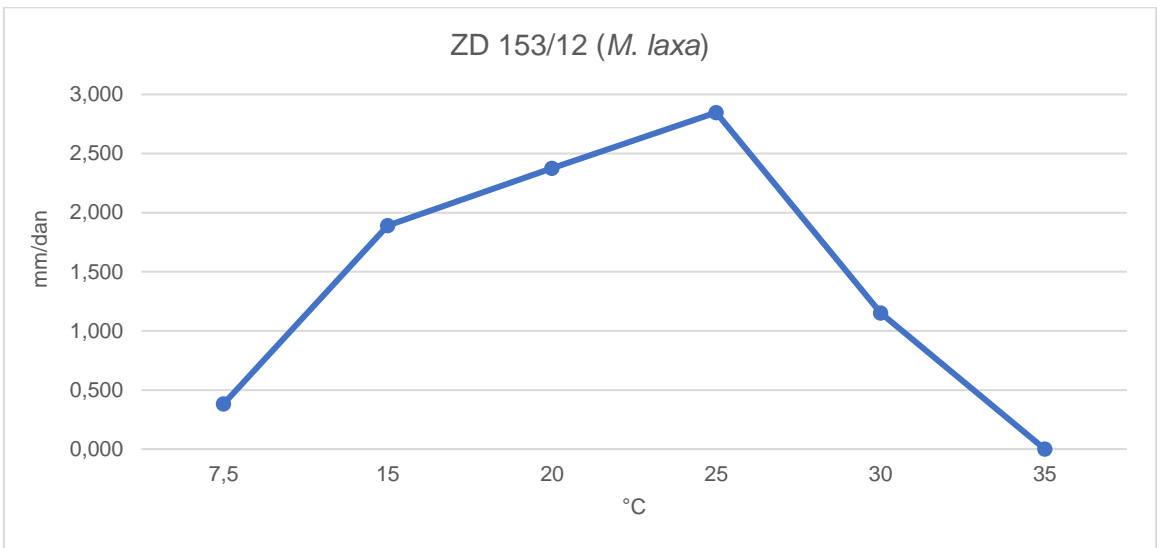
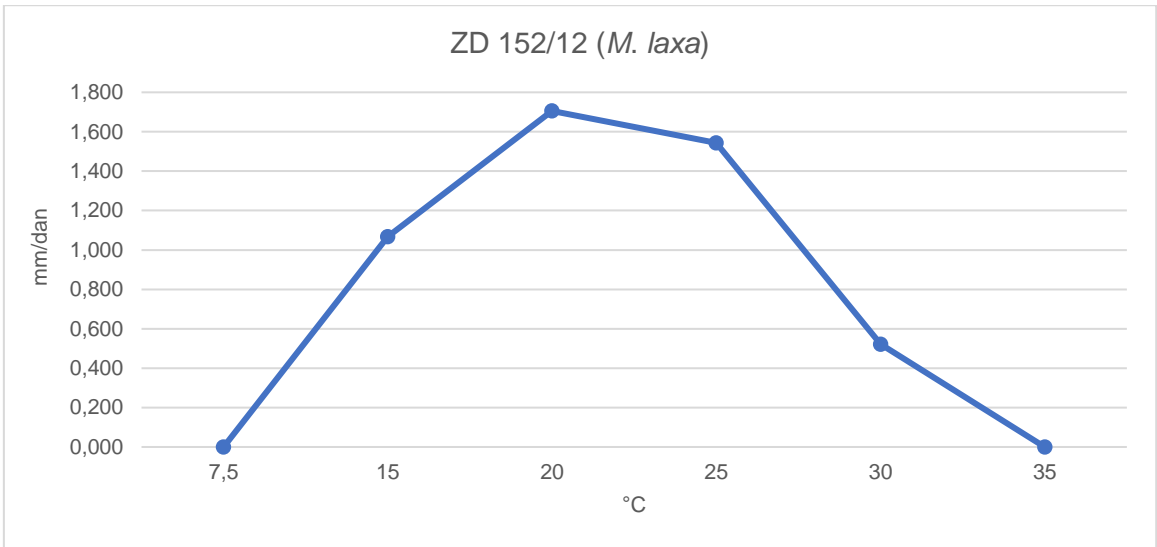
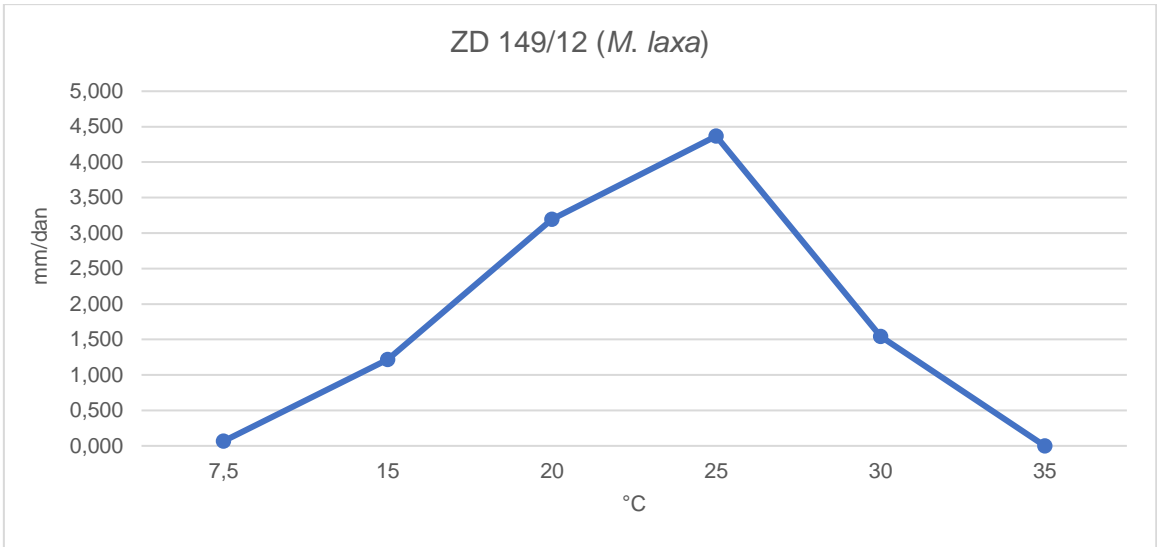
Broj	Oznaka uzorka	Lokacija	Županija	Datum uzorkovanja	Domaćin
294.	ZD 145/13	Škabrnja	Zadarska	16.7.2013.	Nektarina
295.	ZD 146/13	Škabrnja	Zadarska	16.7.2013.	Nektarina
296.	ZD 147/13	Škabrnja	Zadarska	16.7.2013.	Nektarina
297.	ZD 148/13	Škabrnja	Zadarska	16.7.2013.	Nektarina
298.	ZD 149/13	Škabrnja	Zadarska	16.7.2013.	Nektarina
299.	ZD 150/13	Škabrnja	Zadarska	16.7.2013.	Nektarina
300.	ZD 151/13	Škabrnja	Zadarska	16.7.2013.	Nektarina
301.	ZD 152/13	Škabrnja	Zadarska	16.7.2013.	Nektarina
302.	ZD 153/13	Škabrnja	Zadarska	16.7.2013.	Nektarina
303.	VŽ 18/13	Biškupec	Varaždinska	22.7.2013.	Nektarina
304.	VŽ 19/13	Biškupec	Varaždinska	22.7.2013.	Nektarina
305.	VŽ 20/13	Biškupec	Varaždinska	22.7.2013.	Nektarina
306.	VŽ 21/13	Biškupec	Varaždinska	22.7.2013.	Nektarina
307.	VŽ 22/13	Biškupec	Varaždinska	22.7.2013.	Nektarina
308.	VŽ 23/13	Vratišinec	Međimurska	22.7.2013.	Nektarina
309.	VŽ 24/13	Vratišinec	Međimurska	22.7.2013.	Nektarina
310.	VŽ 25/13	Vratišinec	Međimurska	22.7.2013.	Nektarina
311.	VŽ 26/13	Vratišinec	Međimurska	22.7.2013.	Nektarina
312.	VŽ 27/13	Vratišinec	Međimurska	22.7.2013.	Nektarina
313.	VT 22/13	Vukosavljevica	Virovitičko-podravska	29.7.2013.	Nektarina
314.	VT 23/13	Vukosavljevica	Virovitičko-podravska	29.7.2013.	Nektarina
315.	VT 24/13	Vukosavljevica	Virovitičko-podravska	29.7.2013.	Nektarina
316.	VT 25/13	Vukosavljevica	Virovitičko-podravska	29.7.2013.	Nektarina
317.	VT 26/13	Vukosavljevica	Virovitičko-podravska	29.7.2013.	Nektarina
318.	BA 12/13	Borinci	Vukovarsko-srijemska	30.7.2013.	Breskva
319.	BA 13/13	Borinci	Vukovarsko-srijemska	30.7.2013.	Breskva
320.	BA 14/13	Borinci	Vukovarsko-srijemska	30.7.2013.	Breskva

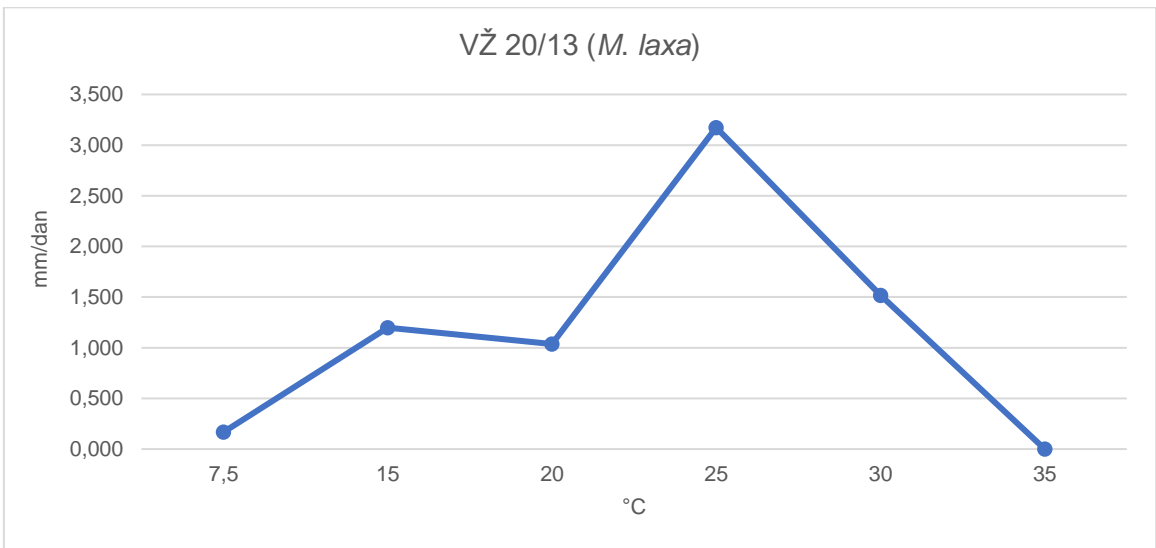
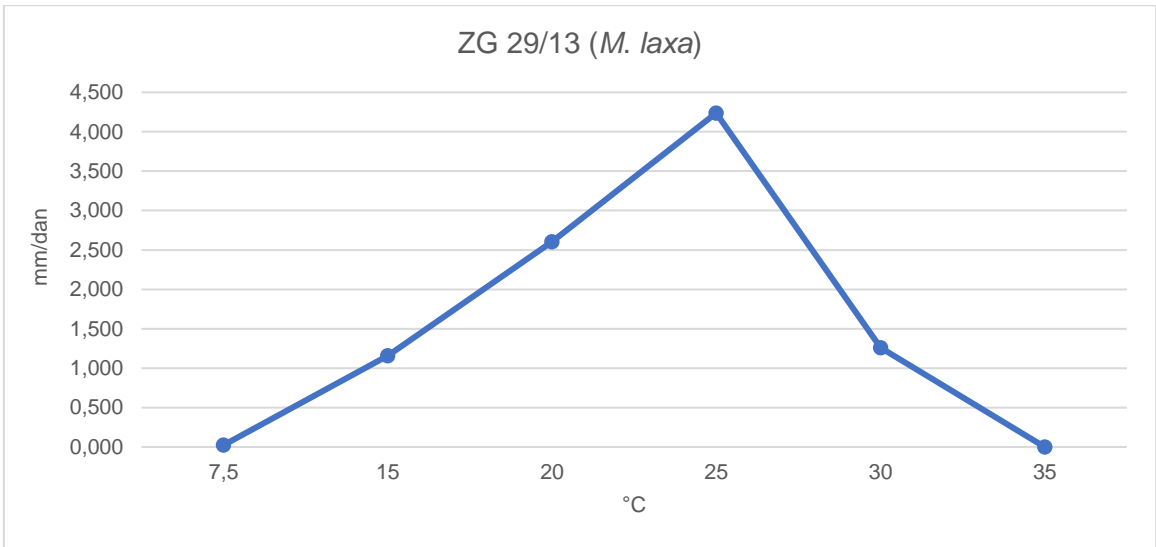
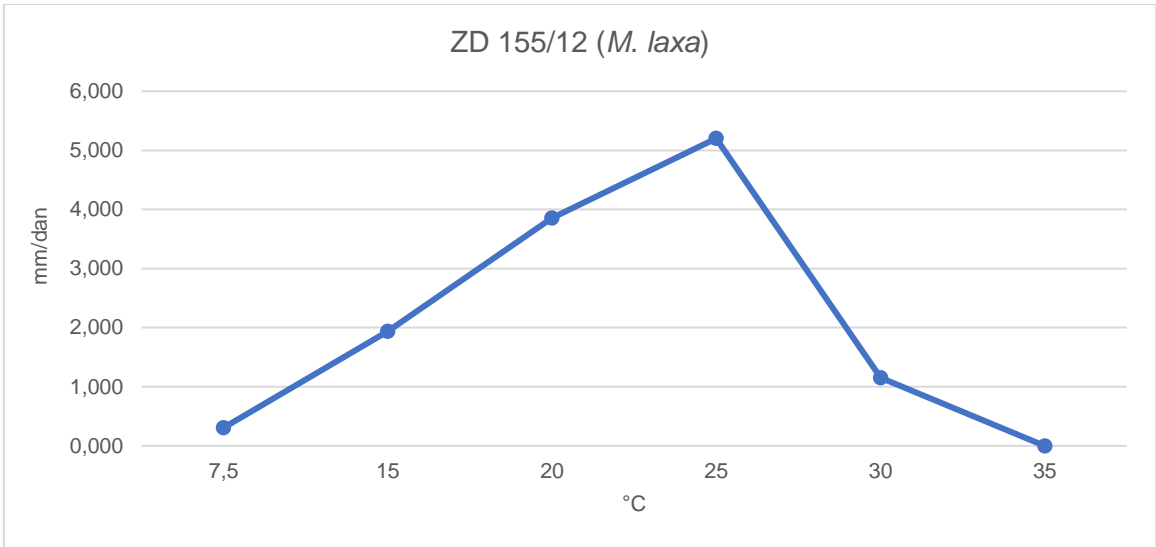
Broj	Oznaka uzorka	Lokacija	Županija	Datum uzorkovanja	Domaćin
321.	BA 15/13	Borinci	Vukovarsko-srijemska	30.7.2013.	Breskva
322.	BA 16/13	Borinci	Vukovarsko-srijemska	30.7.2013.	Breskva
323.	BA 17/13	Borinci	Vukovarsko-srijemska	30.7.2013.	Breskva
324.	BA 18/13	Borinci	Vukovarsko-srijemska	30.7.2013.	Breskva
325.	BA 19/13	Borinci	Vukovarsko-srijemska	30.7.2013.	Breskva
326.	BA 20/13	Borinci	Vukovarsko-srijemska	30.7.2013.	Breskva
327.	BA 21/13	Borinci	Vukovarsko-srijemska	30.7.2013.	Breskva
328.	BA 22/13	Borinci	Vukovarsko-srijemska	30.7.2013.	Breskva
329.	BA 23/13	Borinci	Vukovarsko-srijemska	30.7.2013.	Breskva
330.	BA 24/13	Borinci	Vukovarsko-srijemska	30.7.2013.	Breskva
331.	BA 25/13	Borinci	Vukovarsko-srijemska	30.7.2013.	Breskva
332.	BA 26/13	Borinci	Vukovarsko-srijemska	30.7.2013.	Breskva
333.	BA 27/13	Borinci	Vukovarsko-srijemska	30.7.2013.	Breskva
334.	BA 28/13	Borinci	Vukovarsko-srijemska	30.7.2013.	Breskva
335.	BA 29/13	Borinci	Vukovarsko-srijemska	30.7.2013.	Breskva
336.	BA 30/13	Borinci	Vukovarsko-srijemska	30.7.2013.	Breskva
337.	BA 31/13	Borinci	Vukovarsko-srijemska	30.7.2013.	Breskva
338.	OS 63/13	Tovljač	Osječko-baranjska	30.7.2013.	Nektarina
339.	OS 64/13	Tovljač	Osječko-baranjska	30.7.2013.	Nektarina
340.	OS 65/13	Tovljač	Osječko-baranjska	30.7.2013.	Nektarina
341.	OS 66/13	Tovljač	Osječko-baranjska	30.7.2013.	Nektarina
342.	OS 67/13	Tovljač	Osječko-baranjska	30.7.2013.	Nektarina
343.	OS 69/13	Završje	Brodsko-posavska	7.8.2013.	Breskva
344.	OS 70/13	Završje	Brodsko-posavska	7.8.2013.	Breskva
345.	OS 71/13	Završje	Brodsko-posavska	7.8.2013.	Breskva
346.	OS 72/13	Završje	Brodsko-posavska	7.8.2013.	Breskva
347.	OS 73/13	Završje	Brodsko-posavska	7.8.2013.	Breskva

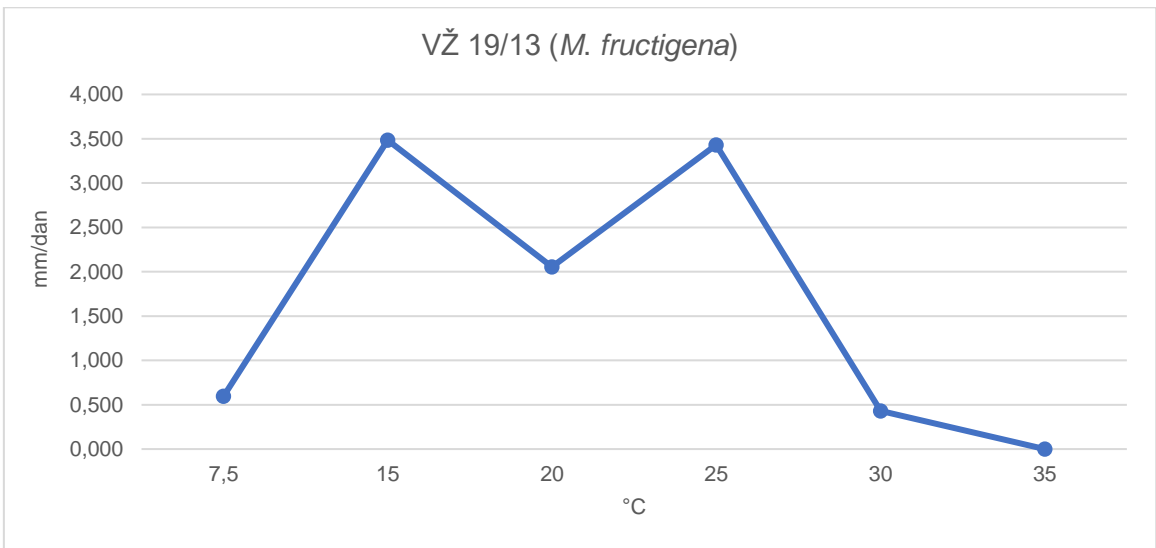
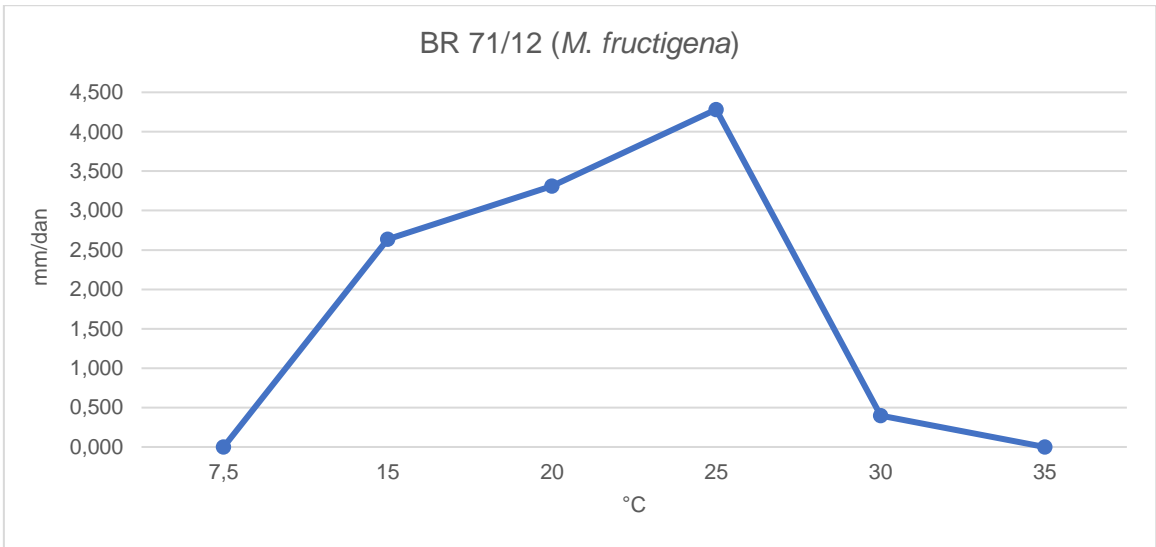
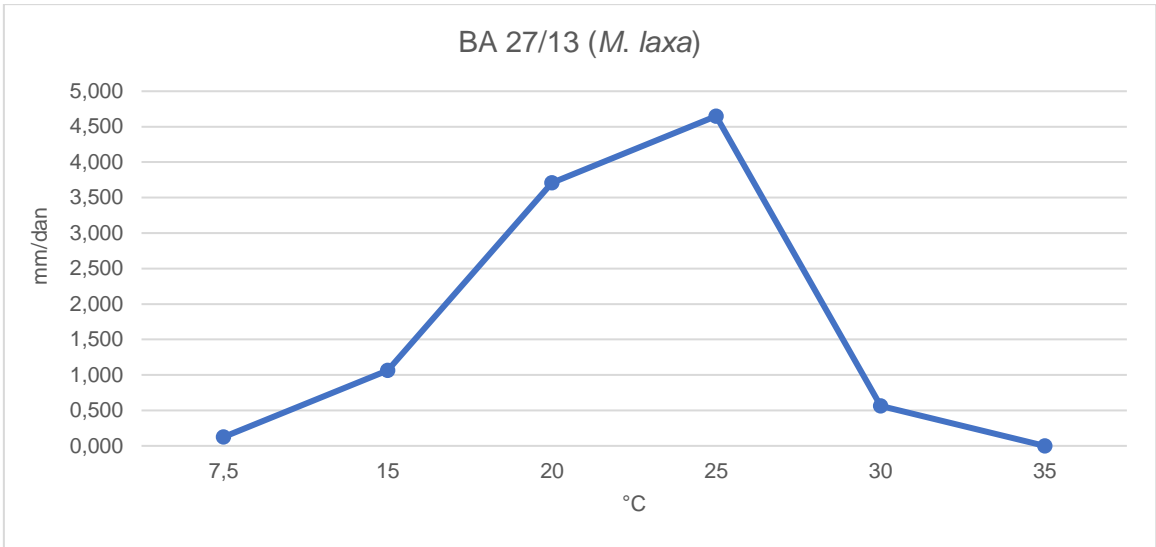
Broj	Oznaka uzorka	Lokacija	Županija	Datum uzorkovanja	Domaćin
348.	PO 118/13	Lazi (Kaldir)	Istarska	13.8.2013.	Šljiva
349.	PO 119/13	Lazi (Kaldir)	Istarska	13.8.2013.	Šljiva
350.	PO 120/13	Lazi (Kaldir)	Istarska	13.8.2013.	Šljiva
351.	PO 121/13	Lazi (Kaldir)	Istarska	13.8.2013.	Šljiva
352.	PO 122/13	Lazi (Kaldir)	Istarska	13.8.2013.	Šljiva
353.	PO 123/13	Lazi (Kaldir)	Istarska	13.8.2013.	Šljiva
354.	PO 124/13	Lazi (Kaldir)	Istarska	13.8.2013.	Šljiva
355.	PO 125/13	Lazi (Kaldir)	Istarska	13.8.2013.	Šljiva
356.	PO 126/13	Lazi (Kaldir)	Istarska	13.8.2013.	Šljiva
357.	PO 127/13	Lazi (Kaldir)	Istarska	13.8.2013.	Šljiva
358.	PO 128/13	Lazi (Kaldir)	Istarska	13.8.2013.	Šljiva
359.	PO 129/13	Lazi (Kaldir)	Istarska	13.8.2013.	Šljiva
360.	PO 130/13	Lazi (Kaldir)	Istarska	13.8.2013.	Šljiva
361.	PO 131/13	Lazi (Kaldir)	Istarska	13.8.2013.	Šljiva
362.	PO 132/13	Lazi (Kaldir)	Istarska	13.8.2013.	Šljiva
363.	VRG 1/16	Dusina	Splitsko-dalmatinska	18.8.2016.	Šljiva
364.	VRG 3/16	Dusina	Splitsko-dalmatinska	18.8.2016.	Šljiva

**Prilog 2.** Grafički prikaz radijalnog porasta kolonije reprezentativnih izolata *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola* na temperaturama od 7,5, 15, 20, 25, 30 i 35 °C (mm/danu)

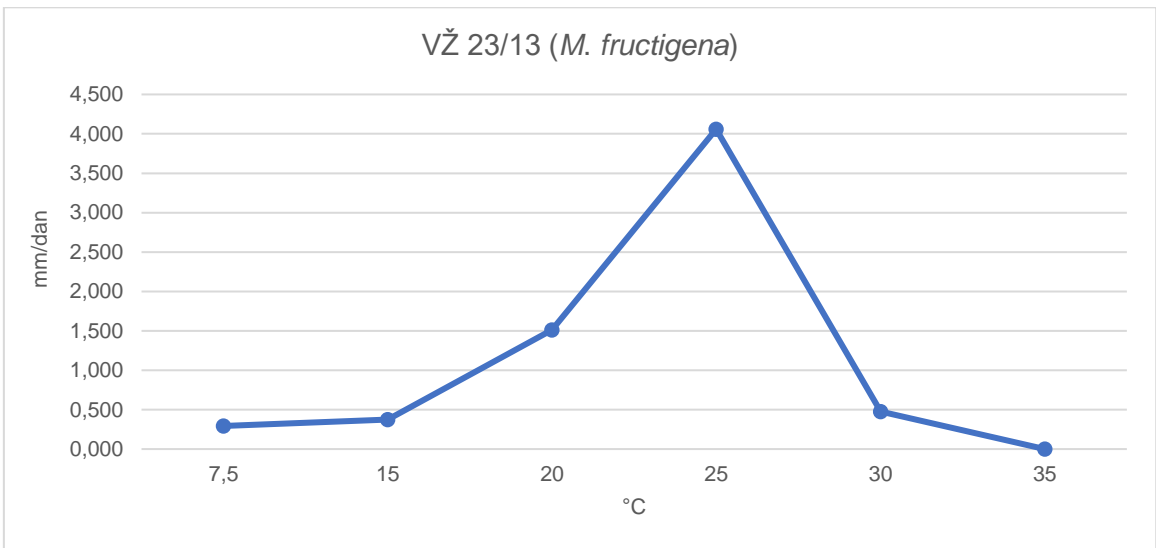
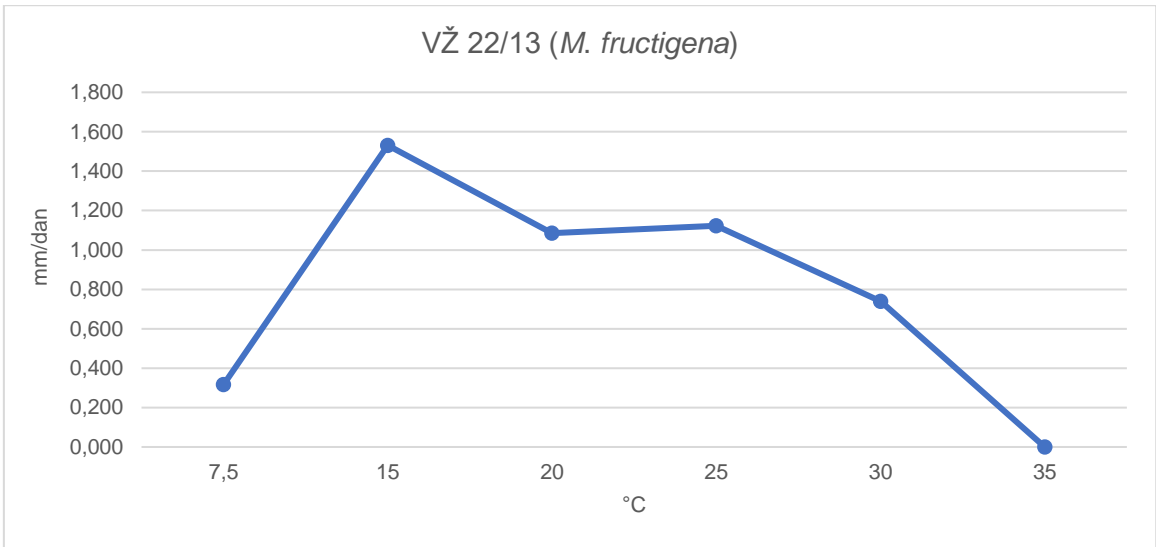
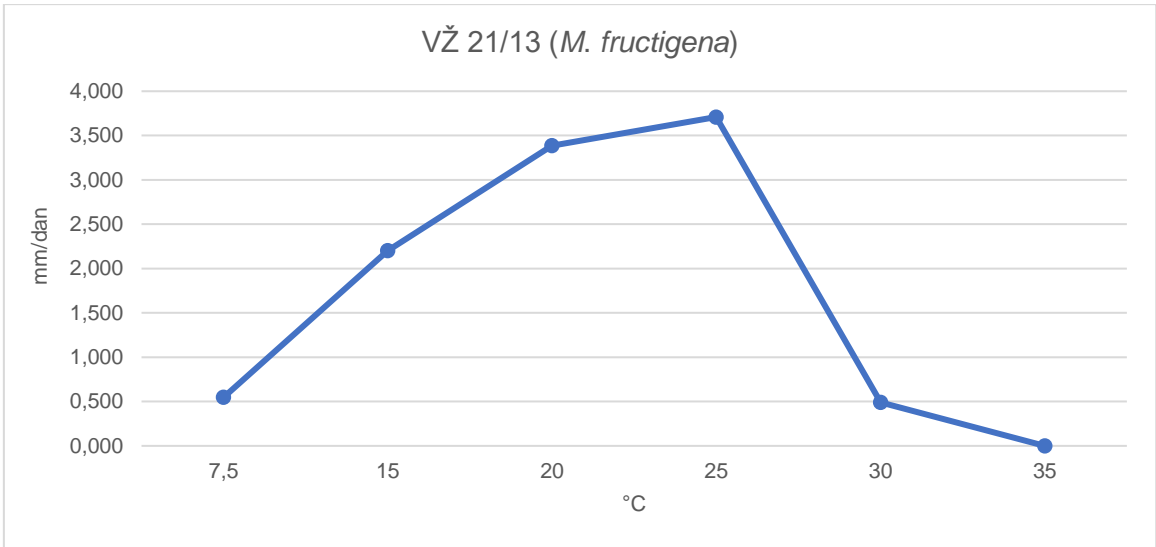


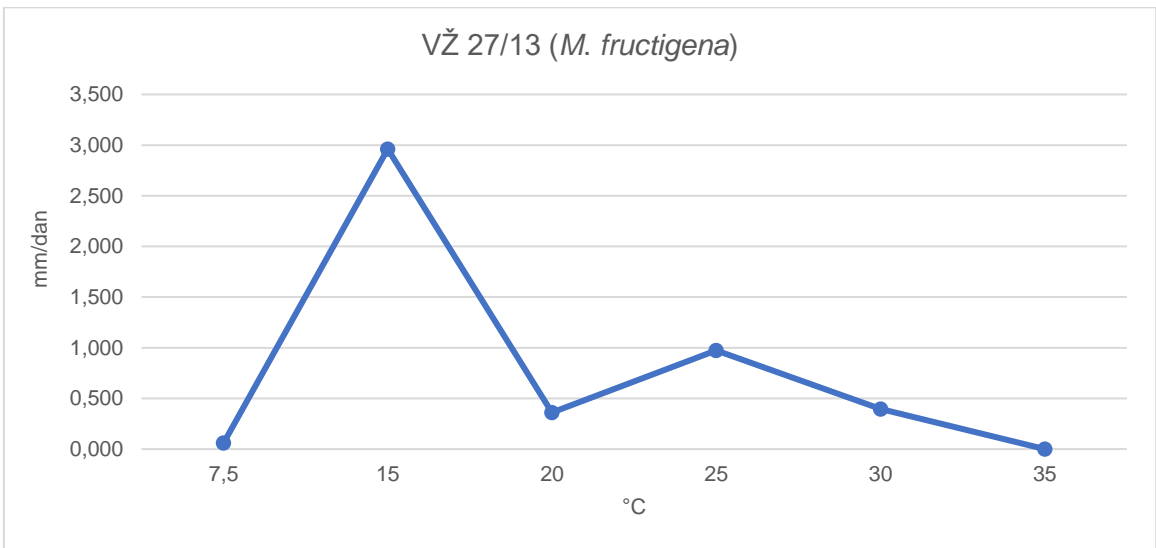
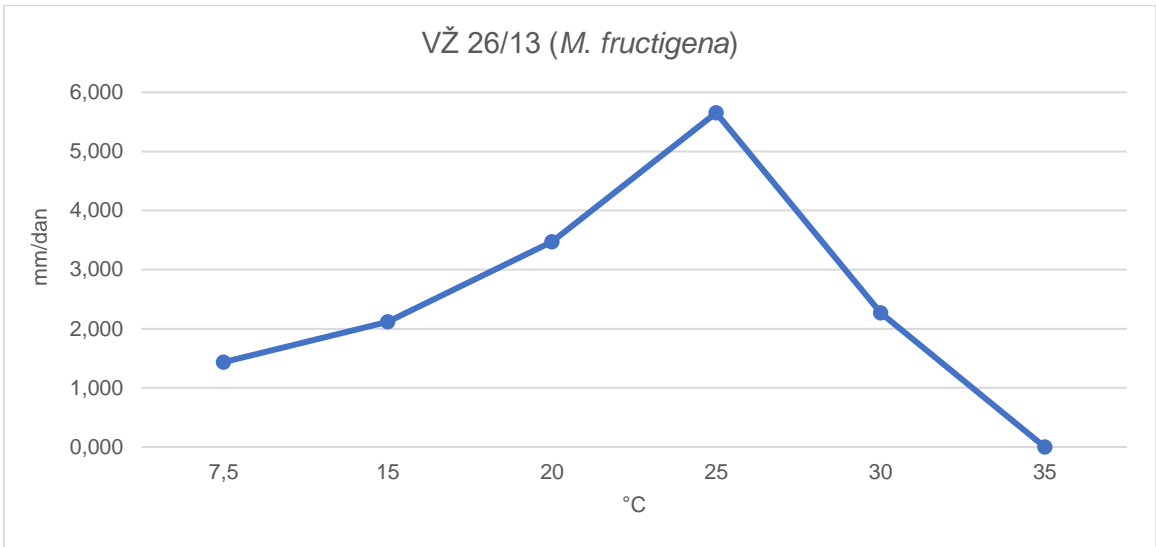
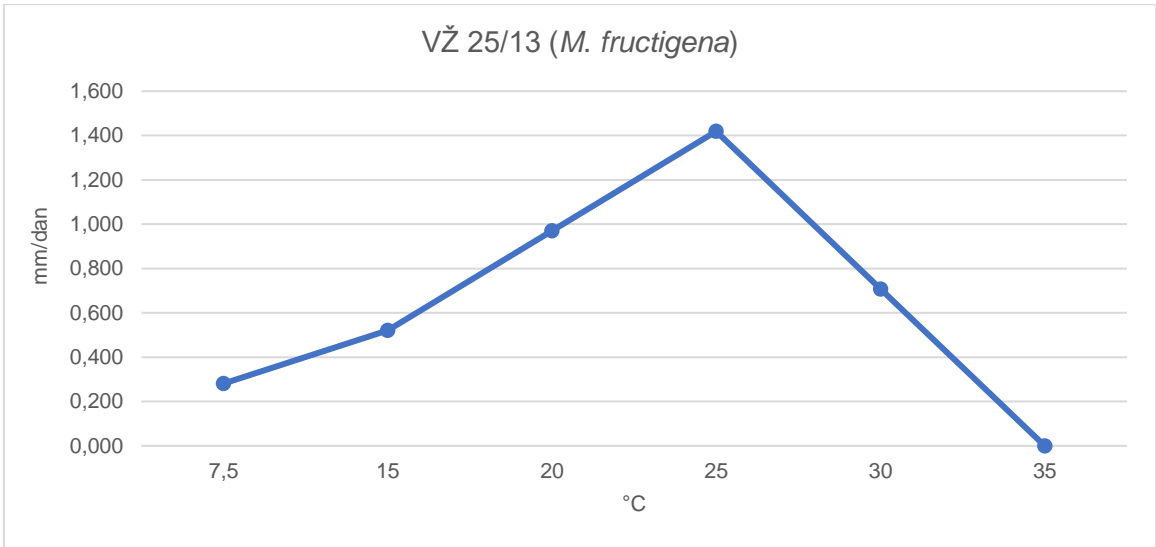


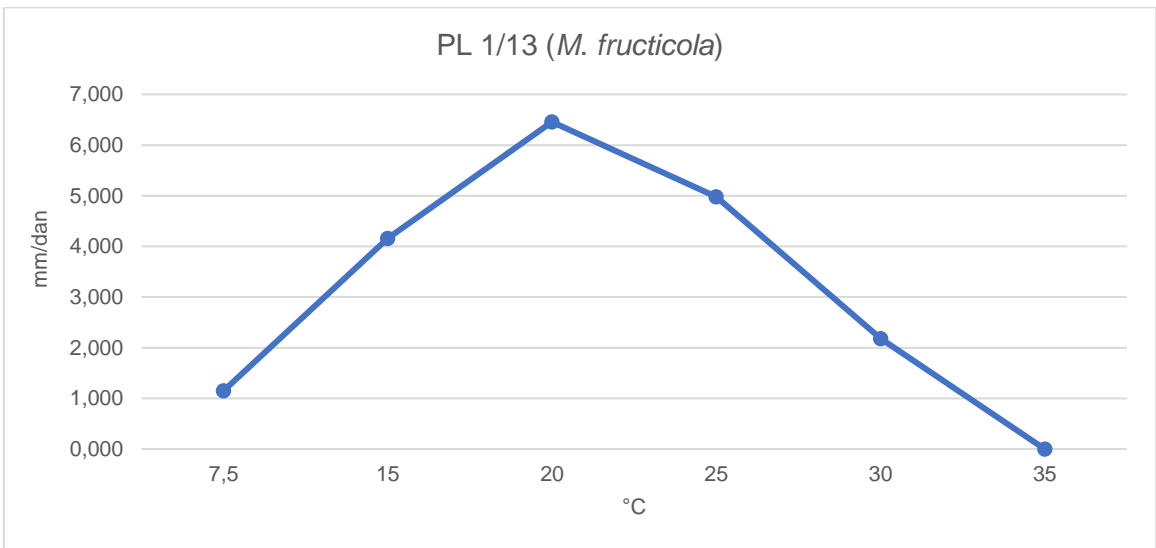
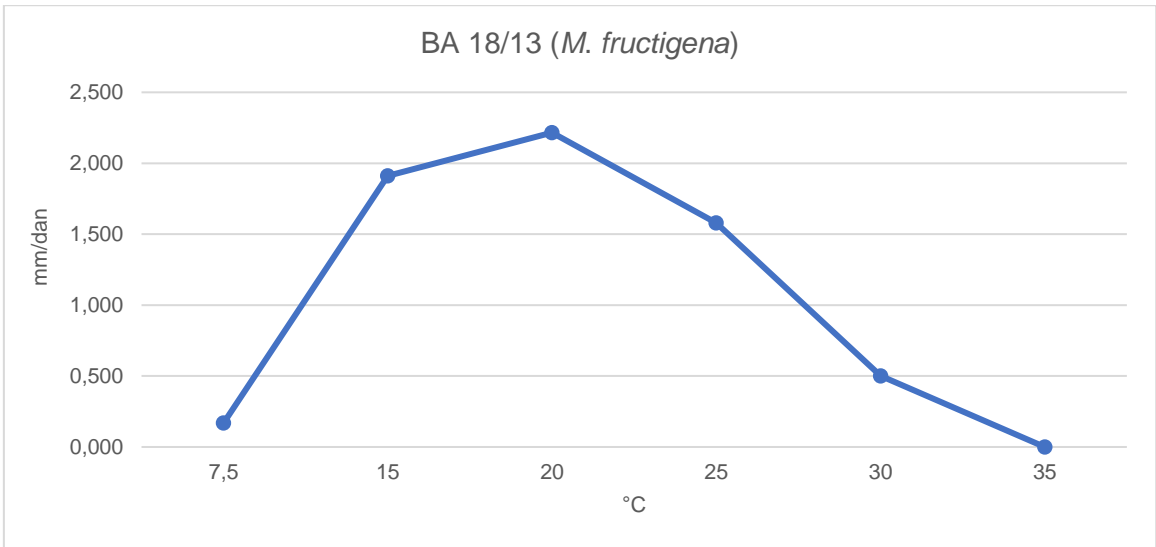
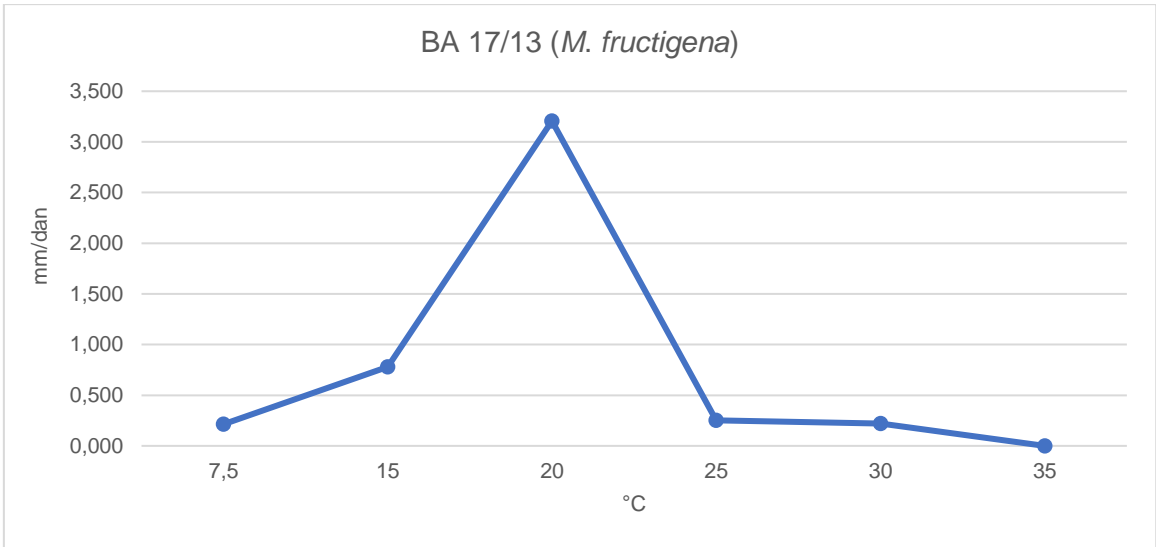


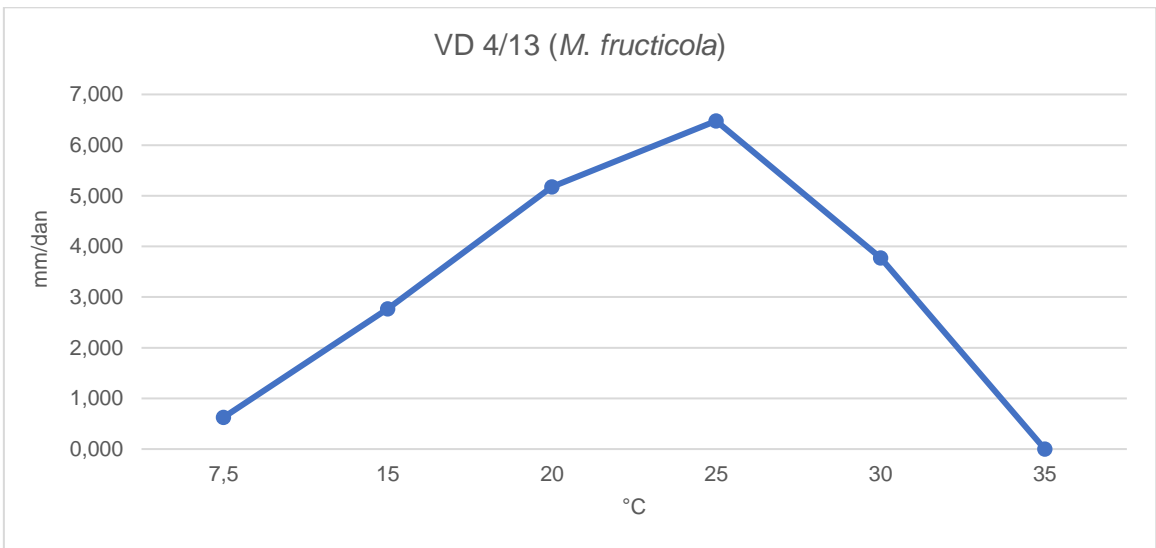
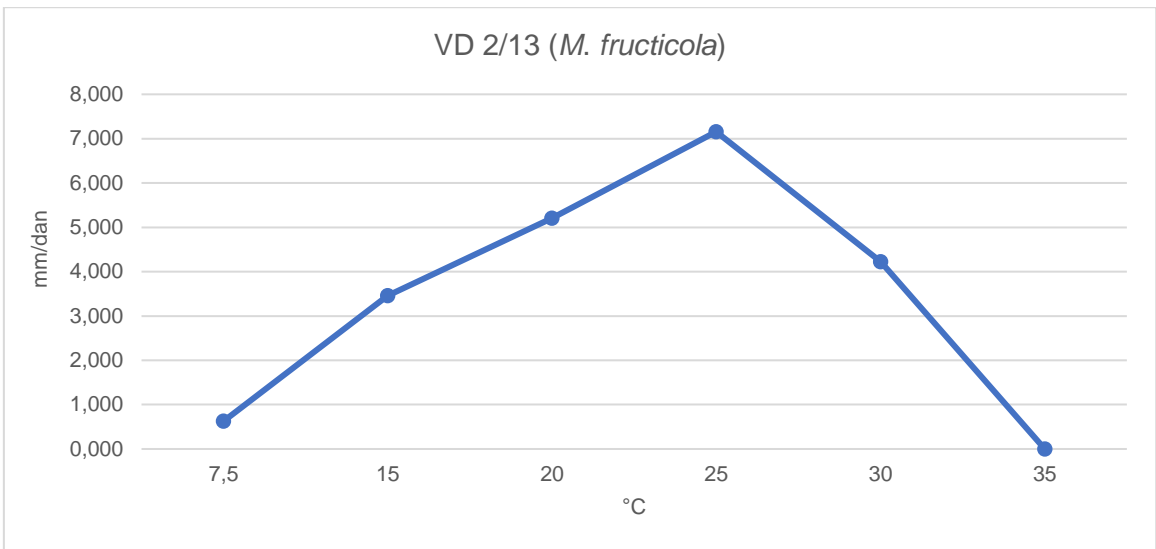
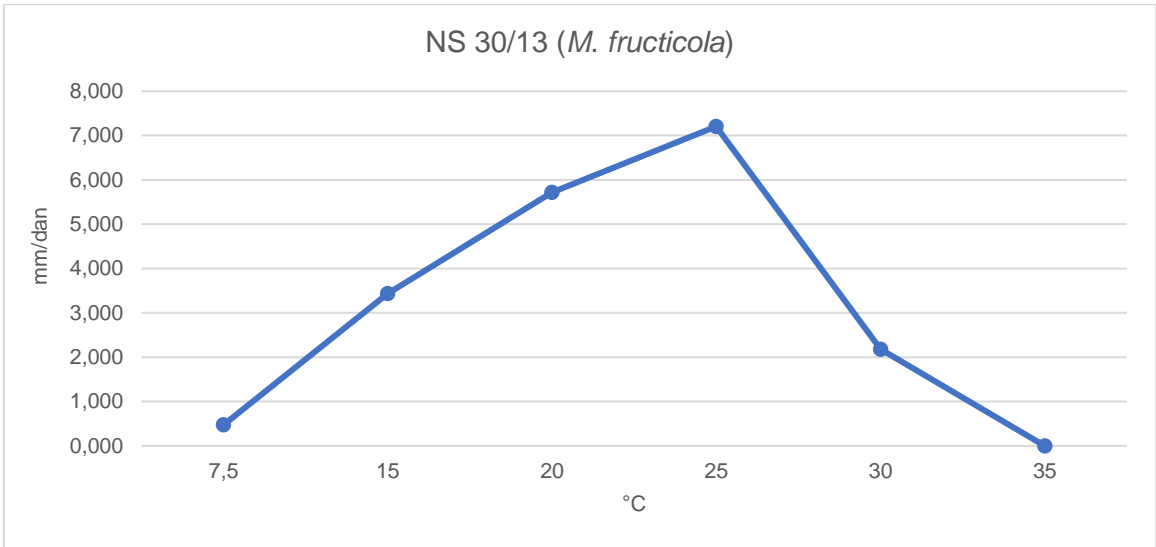


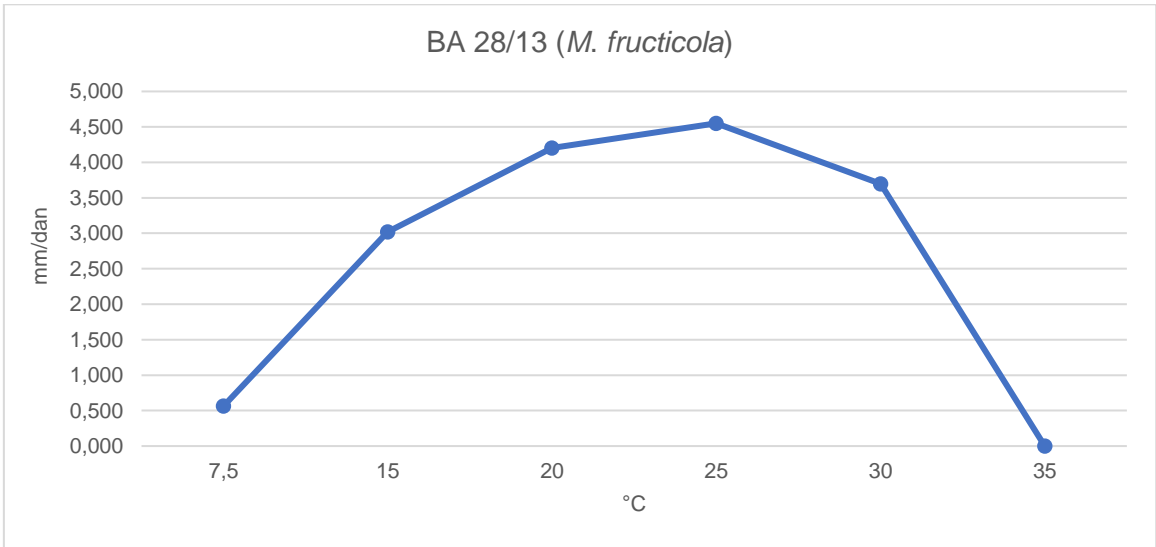
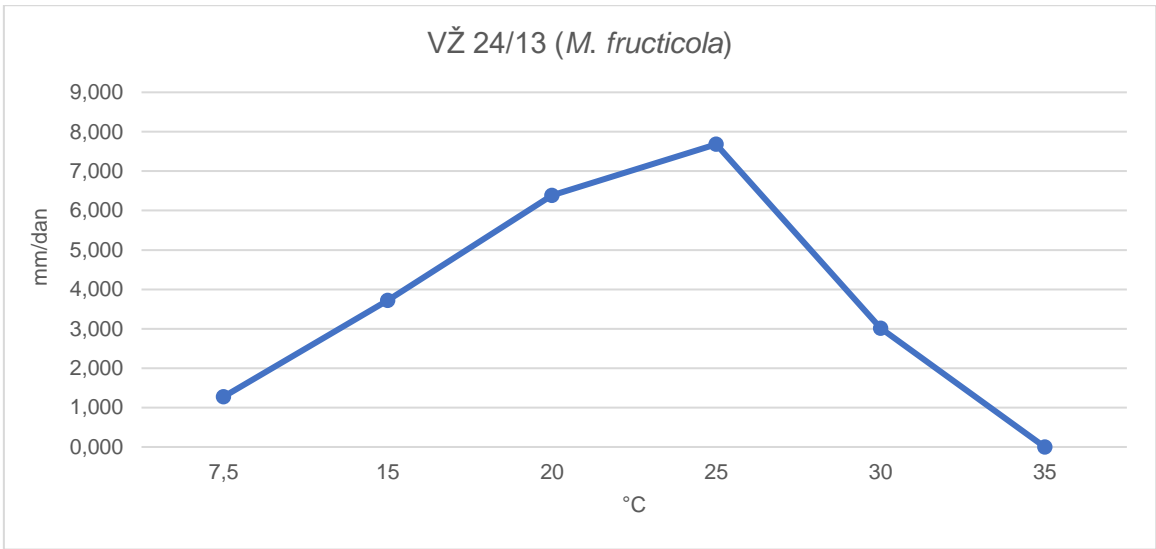
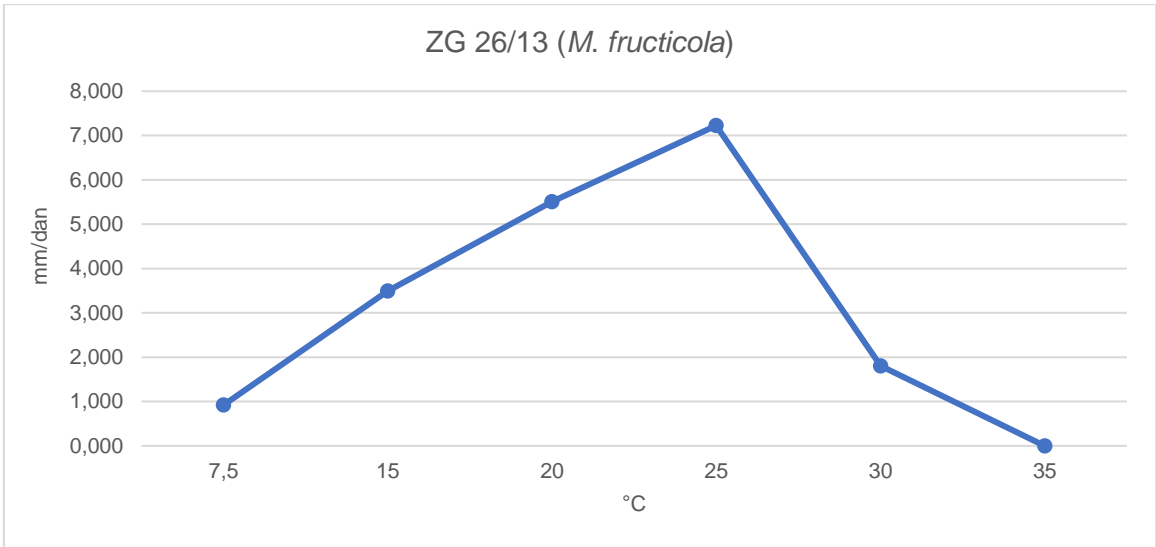


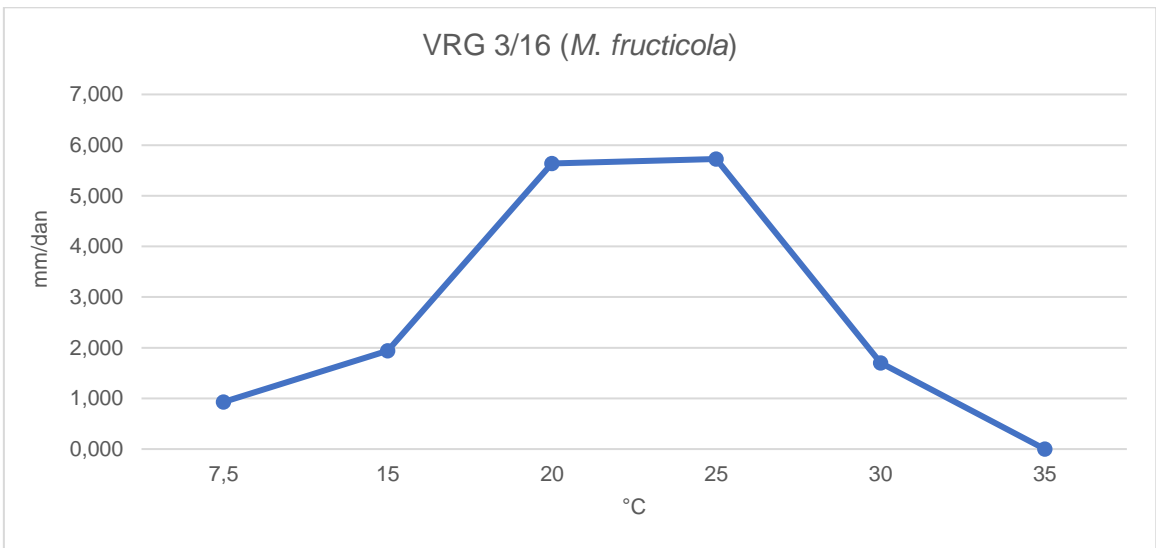
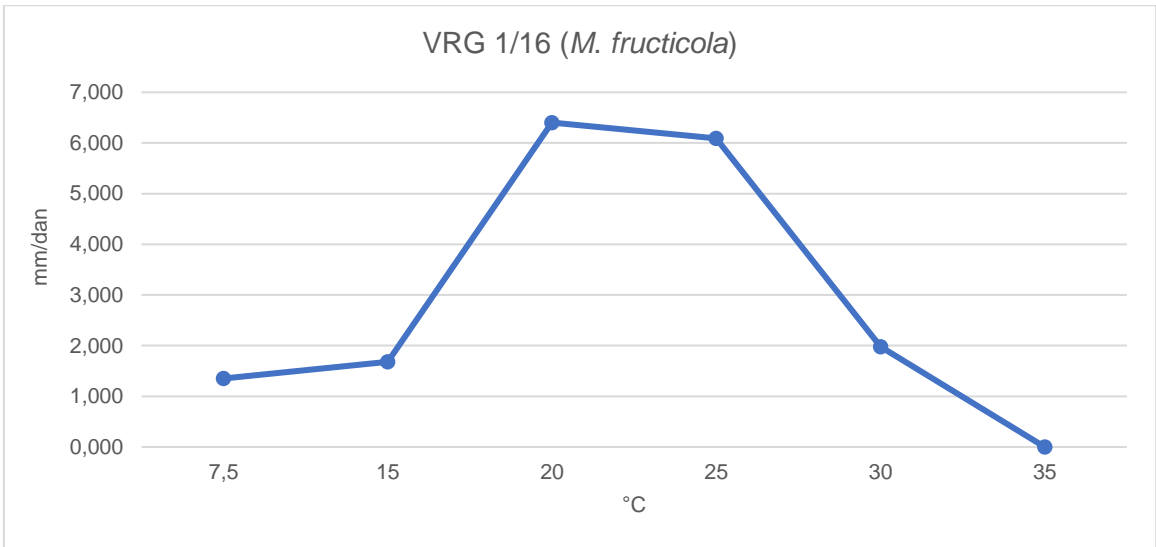
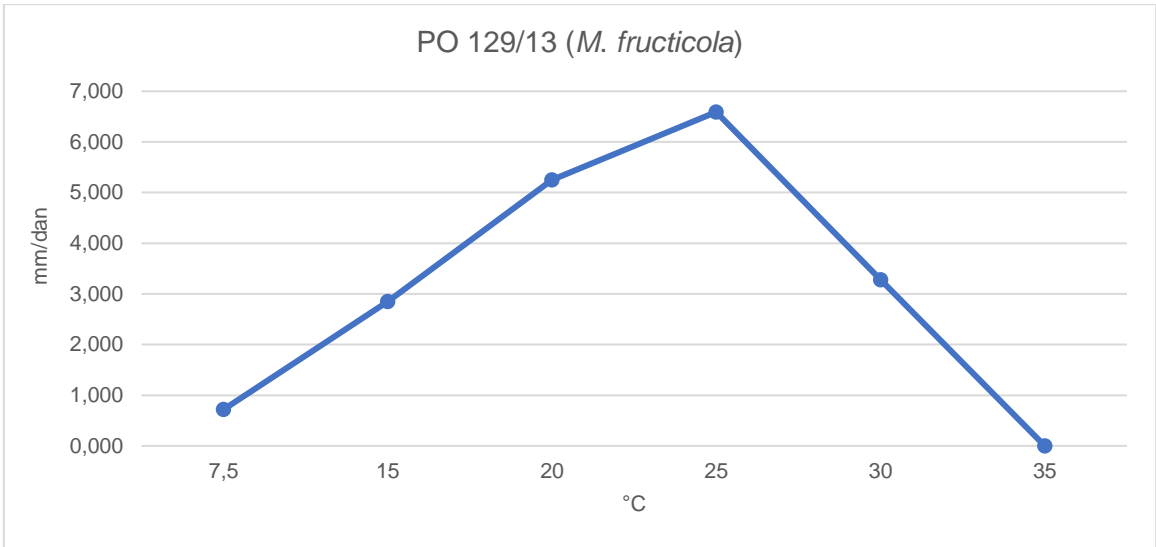












**Prilog 3.** Koncentracije fungicida korištene za izračun EC<sub>50</sub> ili EC<sub>90</sub> vrijednosti izolata *M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola*

Fungicid	Test	Koncentracije (µg/ml)
ZD 139/12 ( <i>M. laxa</i> )		
Boskalid	Rast micelija	0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10
	Klijanje spora	0,03; 0,1; 0,3; 1
Difenkonazol	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,01; 0,1; 0,3
Fenbukonazol	Rast micelija	0,003; 0,03; 0,3; 1; 3
Fenheksamid	Rast micelija	0,01; 0,1; 0,3; 1; 3; 10
Fludioksonil	Klijanje spora	0,003; 0,01; 0,03; 0,1
Fluopiram	Rast micelija	0,03; 0,1; 0,3; 1; 3
	Klijanje spora	0,1; 0,3; 1; 3
Piraklostrobin	Klijanje spora	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3
Tebukonazol	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3
Tiofanat-metil	Rast micelija	0,03; 0,3; 1; 3; 6
Trifloksistrobin	Klijanje spora	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3
ZD 143/12 ( <i>M. laxa</i> )		
Boskalid	Rast micelija	0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 1; 3; 10
	Klijanje spora	0,03; 0,1; 0,3; 1
Difenkonazol	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3
Fenbukonazol	Rast micelija	0,003; 0,01; 0,03; 0,3; 3
Fenheksamid	Rast micelija	0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10
Fludioksonil	Klijanje spora	0,003; 0,01; 0,03; 0,1
Fluopiram	Rast micelija	0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3
	Klijanje spora	0,1; 0,3; 1; 3
Piraklostrobin	Klijanje spora	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3
Tebukonazol	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,01; 0,03; 0,3
Tiofanat-metil	Rast micelija	0,01; 0,03; 0,3; 6
Trifloksistrobin	Klijanje spora	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3
ZD 145/12 ( <i>M. laxa</i> )		
Boskalid	Rast micelija	0,003; 0,01; 0,03; 0,3; 1; 3; 10
	Klijanje spora	0,03; 0,1; 0,3; 1
Difenkonazol	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,01; 0,03; 0,1
Fenbukonazol	Rast micelija	0,003; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3
Fenheksamid	Rast micelija	0,03; 0,3; 1; 3; 10
Fludioksonil	Klijanje spora	0,003; 0,01; 0,03; 0,1
Fluopiram	Rast micelija	0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3
	Klijanje spora	0,1; 0,3; 1; 3
Piraklostrobin	Klijanje spora	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3
Tebukonazol	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3
Tiofanat-metil	Rast micelija	0,03; 0,3; 1; 3; 6
Trifloksistrobin	Klijanje spora	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3

<b>Fungicid</b>	<b>Test</b>	<b>Koncentracije (µg/ml)</b>
<i>ZD 149/12 (M. laxa)</i>		
Boskalid	Rast micelija	0,01; 0,03; 0,3; 1; 3; 10
	Klijanje spora	0,03; 0,1; 0,3; 1
Difenkonazol	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3
Fenbukonazol	Rast micelija	0,003; 0,01; 0,03; 0,3; 1
Fenheksamid	Rast micelija	0,1; 0,3; 1; 3; 10
Fludioksonil	Klijanje spora	0,003; 0,01; 0,03; 0,1
Fluopiram	Rast micelija	0,03; 0,1; 0,3; 1; 3
	Klijanje spora	0,1; 0,3; 1; 3
Piraklostrobin	Klijanje spora	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3
Tebukonazol	Rast micelija	0,001; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3
Tiofanat-metil	Rast micelija	0,1; 0,3; 1; 3; 6
Trifloksistrobin	Klijanje spora	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3
<i>ZD 152/12 (M. laxa)</i>		
Boskalid	Rast micelija	0,01; 0,03; 0,1; 1; 3; 10
	Klijanje spora	0,03; 0,1; 0,3; 1
Difenkonazol	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,01; 0,1; 0,3
Fenbukonazol	Rast micelija	0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1
Fenheksamid	Rast micelija	0,03; 0,3; 1; 3; 10
Fludioksonil	Klijanje spora	0,003; 0,01; 0,03; 0,1
Fluopiram	Rast micelija	0,03; 0,1; 0,3; 1; 3
	Klijanje spora	0,1; 0,3; 1; 3
Piraklostrobin	Klijanje spora	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3
Tebukonazol	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3
Tiofanat-metil	Rast micelija	0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 6
Trifloksistrobin	Klijanje spora	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3
<i>ZD 153/12 (M. laxa)</i>		
Boskalid	Rast micelija	0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10
	Klijanje spora	0,03; 0,1; 0,3; 1
Difenkonazol	Rast micelija	0,001; 0,01; 0,03; 0,3
Fenbukonazol	Rast micelija	0,003; 0,01; 0,1; 0,3
Fenheksamid	Rast micelija	0,03; 1; 3; 10
Fludioksonil	Klijanje spora	0,003; 0,01; 0,03; 0,1
Fluopiram	Rast micelija	0,01; 0,03; 0,1; 1; 3
	Klijanje spora	0,1; 0,3; 1; 3
Piraklostrobin	Klijanje spora	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3
Tebukonazol	Rast micelija	0,003; 0,01; 0,03; 0,3
Tiofanat-metil	Rast micelija	0,03; 0,3; 1; 3; 6
Trifloksistrobin	Klijanje spora	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3



<b>Fungicid</b>	<b>Test</b>	<b>Koncentracije (µg/ml)</b>
<i>ZD 155/12 (M. laxa)</i>		
Boskalid	Rast micelija	0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10
	Klijanje spora	0,03; 0,1; 0,3; 1
Difenkonazol	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,01; 0,03; 0,3
Fenbukonazol	Rast micelija	0,003; 0,03; 0,1; 1
Fenheksamid	Rast micelija	0,1; 0,3; 1; 3; 10
Fludioksonil	Klijanje spora	0,003; 0,01; 0,03; 0,1
Fluopiram	Rast micelija	0,03; 0,1; 0,3; 1; 3
	Klijanje spora	0,1; 0,3; 1; 3
Piraklostrobin	Klijanje spora	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3
Tebukonazol	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3
Tiofanat-metil	Rast micelija	0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 6
Trifloksistrobin	Klijanje spora	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3
<i>ZG 29/13 (M. laxa)</i>		
Boskalid	Rast micelija	0,003; 0,01; 0,3; 1; 3; 10
	Klijanje spora	0,03; 0,1; 0,3; 1
Difenkonazol	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,01; 0,03; 0,1
Fenbukonazol	Rast micelija	0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3
Fenheksamid	Rast micelija	0,03; 0,3; 1; 3; 10
Fludioksonil	Klijanje spora	0,003; 0,01; 0,03; 0,1
Fluopiram	Rast micelija	0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3
	Klijanje spora	0,1; 0,3; 1; 3
Piraklostrobin	Klijanje spora	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3
Tebukonazol	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,01; 0,03; 0,1
Tiofanat-metil	Rast micelija	0,01; 0,1; 0,3; 1; 3; 6
Trifloksistrobin	Klijanje spora	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3
<i>VŽ 20/13 (M. laxa)</i>		
Boskalid	Rast micelija	0,01; 0,03; 0,1; 1; 3; 10
	Klijanje spora	0,03; 0,1; 0,3; 1
Difenkonazol	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,03; 0,1
Fenbukonazol	Rast micelija	0,003; 0,01; 0,03; 1; 3
Fenheksamid	Rast micelija	0,01; 0,3; 1; 3; 10
Fludioksonil	Klijanje spora	0,003; 0,01; 0,03; 0,1
Fluopiram	Rast micelija	0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3
	Klijanje spora	0,1; 0,3; 1; 3
Piraklostrobin	Klijanje spora	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3
Tebukonazol	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3
Tiofanat-metil	Rast micelija	0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 6
Trifloksistrobin	Klijanje spora	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3

Fungicid	Test	Koncentracije (µg/ml)
<i>BA 27/13 (M. laxa)</i>		
Boskalid	Rast micelija	0,003; 0,01; 0,03; 1; 3; 10
	Klijanje spora	0,03; 0,1; 0,3; 1
Difenkonazol	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,01; 0,1; 0,3
Fenbukonazol	Rast micelija	0,003; 0,01; 0,03; 1; 3
Fenheksamid	Rast micelija	0,01; 0,1; 0,3; 1; 3; 10
Fludioksonil	Klijanje spora	0,003; 0,01; 0,03; 0,1
Fluopiram	Rast micelija	0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3
	Klijanje spora	0,1; 0,3; 1; 3
Piraklostrobin	Klijanje spora	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3
Tebukonazol	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3
Tiofanat-metil	Rast micelija	0,1; 0,3; 3; 6
Trifloksistrobin	Klijanje spora	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3
<i>VŽ 19/13 (M. fructigena)</i>		
Boskalid	Rast micelija	0,003; 0,01; 0,1; 0,3; 1; 3; 10
	Klijanje spora	0,03; 0,1; 0,3; 1
Difenkonazol	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,01; 0,03; 0,1
Fenbukonazol	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3
Fenheksamid	Rast micelija	0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 3; 10
Fludioksonil	Klijanje spora	0,003; 0,01; 0,03; 0,1
Fluopiram	Rast micelija	0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3
	Klijanje spora	0,1; 0,3; 1; 3
Piraklostrobin	Klijanje spora	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3
Tebukonazol	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3
Tiofanat-metil	Rast micelija	0,1; 0,3; 1; 3; 6
Trifloksistrobin	Klijanje spora	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3
<i>VŽ 21/13 (M. fructigena)</i>		
Boskalid	Rast micelija	0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10
	Klijanje spora	0,03; 0,1; 0,3; 1
Difenkonazol	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,03; 0,1
Fenbukonazol	Rast micelija	0,001; 0,01; 0,1; 0,3; 1
Fenheksamid	Rast micelija	0,03; 0,1; 1; 3; 10
Fludioksonil	Klijanje spora	0,003; 0,01; 0,03; 0,1
Fluopiram	Rast micelija	0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3
	Klijanje spora	0,1; 0,3; 1; 3
Piraklostrobin	Klijanje spora	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3
Tebukonazol	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3
Tiofanat-metil	Rast micelija	0,01; 0,1; 0,3; 1; 3; 6
Trifloksistrobin	Klijanje spora	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3

Fungicid	Test	Koncentracije (µg/ml)
<i>VŽ 22/13 (M. fructigena)</i>		
Boskalid	Rast micelija	0,1; 0,3; 1; 3; 10
	Klijanje spora	0,03; 0,1; 0,3; 1
Difenkonazol	Rast micelija	0,003; 0,03; 0,1; 0,3
Fenbukonazol	Rast micelija	0,003; 0,01; 0,1; 0,3; 1; 3
Fenheksamid	Rast micelija	0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10
Fludioksonil	Klijanje spora	0,003; 0,01; 0,03; 0,1
	Rast micelija	0,03; 0,1; 0,3; 1; 3
Piraklostrobin	Klijanje spora	0,1; 0,3; 1; 3
	Klijanje spora	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3
Tebukonazol	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,03; 0,1; 0,3
Tiofanat-metil	Rast micelija	0,1; 0,3; 1; 3
Trifloksistrobin	Klijanje spora	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3
<i>VŽ 23/13 (M. fructigena)</i>		
Boskalid	Rast micelija	0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10
	Klijanje spora	0,03; 0,1; 0,3; 1
Difenkonazol	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,03; 0,1
Fenbukonazol	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 1; 3
Fenheksamid	Rast micelija	0,01; 0,1; 1; 3; 10
Fludioksonil	Klijanje spora	0,003; 0,01; 0,03; 0,1
	Rast micelija	0,01; 0,1; 0,3; 1; 3
Piraklostrobin	Klijanje spora	0,1; 0,3; 1; 3
	Klijanje spora	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3
Tebukonazol	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3
Tiofanat-metil	Rast micelija	0,03; 0,3; 1; 3; 6
Trifloksistrobin	Klijanje spora	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3
<i>VŽ 25/13 (M. fructigena)</i>		
Boskalid	Rast micelija	0,01; 0,03; 0,1; 1; 3; 10
	Klijanje spora	0,03; 0,1; 0,3; 1
Difenkonazol	Rast micelija	0,003; 0,03; 0,1; 0,3
Fenbukonazol	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,01; 0,1; 0,3; 1; 3
Fenheksamid	Rast micelija	0,03; 1; 3; 10
Fludioksonil	Klijanje spora	0,003; 0,01; 0,03; 0,1
	Rast micelija	0,03; 0,1; 0,3; 1; 3
Piraklostrobin	Klijanje spora	0,1; 0,3; 1; 3
	Klijanje spora	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3
Tebukonazol	Rast micelija	0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3
Tiofanat-metil	Rast micelija	0,1; 0,3; 1; 3; 6
Trifloksistrobin	Klijanje spora	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3

Fungicid	Test	Koncentracije (µg/ml)
<i>VŽ 26/13 (M. fructigena)</i>		
Boskalid	Rast micelija	0,01; 0,3; 1; 3; 10
	Klijanje spora	0,03; 0,1; 0,3; 1
Difenkonazol	Rast micelija	0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3
Fenbukonazol	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,03; 0,3; 1
Fenheksamid	Rast micelija	0,03; 0,3; 1; 3; 10
Fludioksonil	Klijanje spora	0,003; 0,01; 0,03; 0,1
	Rast micelija	0,01; 0,1; 0,3; 1; 3
Fluopiram	Klijanje spora	0,1; 0,3; 1; 3
	Rast micelija	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3
Piraklostrobin	Rast micelija	0,001; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3
Tiofanat-metil	Rast micelija	0,01; 0,1; 0,3; 1; 3; 6
Trifloksistrobin	Klijanje spora	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3
<i>VŽ 27/13 (M. fructigena)</i>		
Boskalid	Rast micelija	0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10
	Klijanje spora	0,03; 0,1; 0,3; 1
Difenkonazol	Rast micelija	0,001; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3
Fenbukonazol	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,1; 0,3
Fenheksamid	Rast micelija	0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10
Fludioksonil	Klijanje spora	0,003; 0,01; 0,03; 0,1
	Rast micelija	0,03; 0,1; 0,3; 1; 3
Fluopiram	Klijanje spora	0,1; 0,3; 1; 3
	Rast micelija	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3
Piraklostrobin	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,03; 0,1; 0,3
Tiofanat-metil	Rast micelija	0,01; 0,1; 0,3; 1; 3; 6
Trifloksistrobin	Klijanje spora	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3
<i>BA 17/13 (M. fructigena)</i>		
Boskalid	Rast micelija	0,03; 0,3; 1; 3; 10
	Klijanje spora	0,03; 0,1; 0,3; 1
Difenkonazol	Rast micelija	0,003; 0,03; 0,1; 0,3
Fenbukonazol	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3
Fenheksamid	Rast micelija	0,1; 0,3; 1; 3; 10
Fludioksonil	Klijanje spora	0,003; 0,01; 0,03; 0,1
	Rast micelija	0,03; 0,1; 0,3; 1; 3
Fluopiram	Klijanje spora	0,1; 0,3; 1; 3
	Rast micelija	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3
Piraklostrobin	Rast micelija	0,001; 0,03; 0,1; 0,3
Tiofanat-metil	Rast micelija	0,01; 0,1; 0,3; 1; 3; 6
Trifloksistrobin	Klijanje spora	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3

<b>Fungicid</b>	<b>Test</b>	<b>Koncentracije (µg/ml)</b>
<i>BA 18/13 (M. fructigena)</i>		
Boskalid	Rast micelija	0,03; 0,3; 1; 3; 10
	Klijanje spora	0,03; 0,1; 0,3; 1
Difenkonazol	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,03; 0,1
Fenbukonazol	Rast micelija	0,001; 0,01; 1; 3
Fenheksamid	Rast micelija	0,01; 0,3; 1; 3; 10
Fludioksonil	Klijanje spora	0,003; 0,01; 0,03; 0,1
	Rast micelija	0,01; 0,1; 0,3; 1; 3
Fluopiram	Klijanje spora	0,1; 0,3; 1; 3
	Rast micelija	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3
Tebukonazol	Rast micelija	0,003; 0,03; 0,1; 0,3
Tiofanat-metil	Rast micelija	0,1; 0,3; 1; 3; 6
Trifloksistrobin	Klijanje spora	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3
<i>BR 71/12 (M. fructigena)</i>		
Boskalid	Rast micelija	0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 1; 3; 10
	Klijanje spora	0,03; 0,1; 0,3; 1
Difenkonazol	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,03; 0,1; 0,3
Fenbukonazol	Rast micelija	0,001; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1
Fenheksamid	Rast micelija	0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10
Fludioksonil	Klijanje spora	0,003; 0,01; 0,03; 0,1
	Rast micelija	0,03; 0,1; 0,3; 1; 3
Fluopiram	Klijanje spora	0,1; 0,3; 1; 3
	Rast micelija	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3
Tebukonazol	Rast micelija	0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3
Tiofanat-metil	Rast micelija	0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 6
Trifloksistrobin	Klijanje spora	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3
<i>PL 1/13 (M. fructicola)</i>		
Boskalid	Rast micelija	0,01; 0,03; 0,1; 3; 10
	Klijanje spora	0,03; 0,1; 0,3; 1
Difenkonazol	Rast micelija	0,001; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3
Fenbukonazol	Rast micelija	0,001; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1
Fenheksamid	Rast micelija	0,01; 0,3; 1; 3; 10
Fludioksonil	Klijanje spora	0,003; 0,01; 0,03; 0,1
	Rast micelija	0,03; 0,1; 0,3; 1; 3
Fluopiram	Klijanje spora	0,1; 0,3; 1; 3
	Rast micelija	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3
Tebukonazol	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3
Tiofanat-metil	Rast micelija	0,01; 0,03; 0,3; 6
Trifloksistrobin	Klijanje spora	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3

Fungicid	Test	Koncentracije (µg/ml)
<i>VRG 1/16 (M. fructicola)</i>		
Boskalid	Rast micelija	0,01; 0,3; 1; 3
	Klijanje spora	0,03; 0,1; 0,3; 1
Difenkonazol	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,1; 0,3
Fenbukonazol	Rast micelija	0,001; 0,01; 0,03; 3
Fenheksamid	Rast micelija	0,01; 0,3; 1; 3; 10
Fludioksonil	Klijanje spora	0,003; 0,01; 0,03; 0,1
	Rast micelija	0,03; 0,1; 0,3; 1; 3
Fluopiram	Klijanje spora	0,1; 0,3; 1; 3
	Rast micelija	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3
Tebukonazol	Rast micelija	0,001; 0,01; 0,1; 0,3
Tiofanat-metil	Rast micelija	0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 6
Trifloksistrobin	Klijanje spora	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3
<i>NS 30/13 (M. fructicola)</i>		
Boskalid	Rast micelija	0,01; 0,03; 0,3; 1; 3; 10
	Klijanje spora	0,03; 0,1; 0,3; 1
Difenkonazol	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,01; 0,03; 0,3
Fenbukonazol	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3
Fenheksamid	Rast micelija	0,01; 0,1; 0,3; 1; 3; 10
Fludioksonil	Klijanje spora	0,003; 0,01; 0,03; 0,1
	Rast micelija	0,03; 0,1; 0,3; 1; 3
Fluopiram	Klijanje spora	0,1; 0,3; 1; 3
	Rast micelija	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3
Tebukonazol	Rast micelija	0,003; 0,01; 0,03; 0,1
Tiofanat-metil	Rast micelija	0,01; 0,3; 1; 3; 6
Trifloksistrobin	Klijanje spora	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3
<i>VRG 3/16 (M. fructicola)</i>		
Boskalid	Rast micelija	0,01; 0,3; 1; 3; 10
	Klijanje spora	0,03; 0,1; 0,3; 1
Difenkonazol	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,1; 0,3
Fenbukonazol	Rast micelija	0,001; 0,01; 0,03; 1; 3
Fenheksamid	Rast micelija	0,01; 0,03; 1; 3; 10
Fludioksonil	Klijanje spora	0,003; 0,01; 0,03; 0,1
	Rast micelija	0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3
Fluopiram	Klijanje spora	0,1; 0,3; 1; 3
	Rast micelija	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3
Tebukonazol	Rast micelija	0,001; 0,03; 0,1; 0,3
Tiofanat-metil	Rast micelija	0,01; 0,1; 0,3; 1; 3; 6
Trifloksistrobin	Klijanje spora	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3

Fungicid	Test	Koncentracije (µg/ml)
<i>VD 2/13 (M. fructicola)</i>		
Boskalid	Rast micelija	0,03; 0,1; 1; 3; 10
	Klijanje spora	0,03; 0,1; 0,3; 1
Difenkonazol	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3
Fenbukonazol	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,01; 0,1; 1; 3
Fenheksamid	Rast micelija	0,03; 0,3; 1; 3; 10
Fludioksonil	Klijanje spora	0,003; 0,01; 0,03; 0,1
Fluopiram	Rast micelija	0,01; 0,1; 0,3; 1; 3
	Klijanje spora	0,1; 0,3; 1; 3
Piraklostrobin	Klijanje spora	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3
Tebukonazol	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,01; 0,1; 0,3
Tiofanat-metil	Rast micelija	0,01; 0,03; 3; 6
Trifloksistrobin	Klijanje spora	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3
<i>VD 4/13 (M. fructicola)</i>		
Boskalid	Rast micelija	0,01; 0,1; 3; 10
	Klijanje spora	0,03; 0,1; 0,3; 1
Difenkonazol	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,01; 0,03; 0,3
Fenbukonazol	Rast micelija	0,003; 0,03; 0,1; 0,3; 1
Fenheksamid	Rast micelija	0,03; 0,3; 1; 3; 10
Fludioksonil	Klijanje spora	0,003; 0,01; 0,03; 0,1
Fluopiram	Rast micelija	0,03; 0,1; 0,3; 1; 3
	Klijanje spora	0,1; 0,3; 1; 3
Piraklostrobin	Klijanje spora	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3
Tebukonazol	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3
Tiofanat-metil	Rast micelija	0,1; 0,3; 1; 3; 6
Trifloksistrobin	Klijanje spora	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3
<i>ZG 26/13 (M. fructicola)</i>		
Boskalid	Rast micelija	0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10
	Klijanje spora	0,03; 0,1; 0,3; 1
Difenkonazol	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,03; 0,1
Fenbukonazol	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,01; 0,03; 0,1
Fenheksamid	Rast micelija	0,01; 0,3; 1; 3; 10
Fludioksonil	Klijanje spora	0,003; 0,01; 0,03; 0,1
Fluopiram	Rast micelija	0,03; 0,1; 0,3; 1; 3
	Klijanje spora	0,1; 0,3; 1; 3
Piraklostrobin	Klijanje spora	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3
Tebukonazol	Rast micelija	0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3
Tiofanat-metil	Rast micelija	0,1; 1; 3; 6
Trifloksistrobin	Klijanje spora	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3

Fungicid	Test	Koncentracije (µg/ml)
<i>VŽ 24/13 (M. fructicola)</i>		
Boskalid	Rast micelija	0,01; 0,1; 0,3; 1; 3; 10
	Klijanje spora	0,03; 0,1; 0,3; 1
Difenkonazol	Rast micelija	0,001; 0,01; 0,03; 0,1
Fenbukonazol	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3
Fenheksamid	Rast micelija	0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10
	Klijanje spora	0,003; 0,01; 0,03; 0,1
Fluopiram	Rast micelija	0,03; 0,1; 0,3; 1; 3
	Klijanje spora	0,1; 0,3; 1; 3
Piraklostrobin	Klijanje spora	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3
Tebukonazol	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,01; 0,1; 0,3
Tiofanat-metil	Rast micelija	0,03; 0,3; 1; 6
Trifloksistrobin	Klijanje spora	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3
<i>BA 28/13 (M. fructicola)</i>		
Boskalid	Rast micelija	0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10
	Klijanje spora	0,03; 0,1; 0,3; 1
Difenkonazol	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,1; 0,3
Fenbukonazol	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,03; 0,1
Fenheksamid	Rast micelija	0,01; 0,1; 0,3; 1; 3; 10
	Klijanje spora	0,003; 0,01; 0,03; 0,1
Fluopiram	Rast micelija	0,03; 0,1; 1; 3
	Klijanje spora	0,1; 0,3; 1; 3
Piraklostrobin	Klijanje spora	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3
Tebukonazol	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3
Tiofanat-metil	Rast micelija	0,01; 0,03; 0,1; 3; 6
Trifloksistrobin	Klijanje spora	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3
<i>PO 129/13 (M. fructicola)</i>		
Boskalid	Rast micelija	0,01; 0,03; 1; 3; 10
	Klijanje spora	0,03; 0,1; 0,3; 1
Difenkonazol	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,1; 0,3
Fenbukonazol	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,03; 0,1; 0,3
Fenheksamid	Rast micelija	0,03; 0,3; 1; 3; 10
	Klijanje spora	0,003; 0,01; 0,03; 0,1
Fluopiram	Rast micelija	0,03; 0,1; 0,3; 1; 3
	Klijanje spora	0,1; 0,3; 1; 3
Piraklostrobin	Klijanje spora	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3
Tebukonazol	Rast micelija	0,001; 0,003; 0,01; 0,03; 0,3
Tiofanat-metil	Rast micelija	0,3; 1; 3; 6
Trifloksistrobin	Klijanje spora	0,0001; 0,01; 0,03; 0,3



**Prilog 4.** Prikaz morfoloških obilježja izolata *Monilinia* vrsta (Lane, 2002), rezultati identifikacije PCR-om (Côté i sur., 2004a; loos i Frey, 2000) i analize sekvenci\*

Broj	Izolot	Boja kolonije <sup>1</sup>			Brzina rasta <sup>2</sup>		Sporulacija <sup>3</sup>		Sporulacija u koncentričnim krugovima <sup>4</sup>		Rub kolonije <sup>5</sup>		Rozete <sup>6</sup>		Režnjevi uz rozete <sup>7</sup>			Identifikacija PCR-om
		A siva	B žuta	C krem/bijela	D raste brzo	E raste umjereno	F raste sporo	G obilna	H oskudna	I prisutna	J nije prisutna	K valovit	L ravan	M prisutne	N nisu prisutne	O crni	P smeđi	
1.	ME 123/12	A			(E)		H		J		K		M				Q	<i>M. laxa</i>
2.	ME 126/12	A			(E)		H		J		K		M				Q	<i>M. laxa</i>
3.	ME 127/12	A			F		H		J		K		M				O	<i>M. laxa</i>
4.	ME 128/12	A			(E)		G		J		K		M				O	<i>M. laxa</i>
5.	ME 129/12	A			(E)		H		J		K		M				Q	<i>M. laxa</i>
6.	VD 32/12	A			D		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
7.	VD 33/12	A			D		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
8.	VD 34/12	A			D		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
9.	VD 35/12	A			D		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
10.	VD 36/12	A			D		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
11.	<b>VD 37/12</b>	A			D		G		(J)		L		N				Q	<b><i>M. fructicola</i></b>
12.	VD 38/12	A			D		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
13.	VD 39/12	A			D		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
14.	VD 40/12	A			D		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
15.	VD 41/12	A			D		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
16.	VD 42/12	A			D		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
17.	VD 43/12	A			D		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
18.	<b>VD 44/12</b>	A			D		G		(J)		L		N				Q	<b><i>M. fructicola</i></b>
19.	VD 45/12	A			D		G		I		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
20.	VD 46/12	A			D		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>

Broj	Izolot	Boja kolonije <sup>1</sup>			Brzina rasta <sup>2</sup>		Sporulacija <sup>3</sup>		Sporulacija u koncentričnim krugovima <sup>4</sup>		Rub kolonije <sup>5</sup>		Rozete <sup>6</sup>		Režnjevi uz rozete <sup>7</sup>		Identifikacija PCR-om
		A siva	B žuta	C krem/bijela	D raste brzo	E raste umjereno	F raste sporo	G obilna	H oskudna	I prisutna	J nije prisutna	K valovit	L ravan	M prisutne	N nisu prisutne	O crni	
21.	VD 47/12	A			D		G		(J)		L		N		Q		<i>M. fructicola</i>
22.	VD 48/12	A			D		G		(J)		L		N		Q		<i>M. fructicola</i>
23.	VD 49/12	A			D		G		(J)		L		N		Q		<i>M. fructicola</i>
24.	VD 50/12	A			D		G		(J)		L		N		Q		<i>M. fructicola</i>
25.	VD 51/12	(C)			(D)		H		J		<b>K</b>		N		Q		<i>M. fructigena</i>
26.	ZD 124/12	A			(E)		<b>G</b>		J		K		M		O		<i>M. laxa</i>
27.	ZD 125/12	<b>B</b>			(E)		H		J		<b>L</b>		M		O		<i>M. laxa</i>
28.	ZD 126/12	<b>A</b>			E		(G)		(I)		<b>K</b>		<b>M</b>		<b>O</b>		<i>M. fructigena</i>
29.	ZD 127/12	A			(E)		<b>G</b>		J		K		M		O		<i>M. laxa</i>
30.	ZD 128/12	A			(E)		H		J		K		M		O		<i>M. laxa</i>
31.	ZD 129/12	A			(E)		H		J		K		M		O		<i>M. laxa</i>
32.	ZD 130/12	A			(E)		H		J		K		M		O		<i>M. laxa</i>
33.	ZD 131/12	(C)			(D)		(G)		J		<b>K</b>		N		Q		<i>M. fructigena</i>
34.	ZD 132/12	A			(E)		H		J		K		M		O		<i>M. laxa</i>
35.	ZD 133/12	A			(E)		<b>G</b>		J		K		M		O		<i>M. laxa</i>
36.	ZD 134/12	A			(E)		<b>G</b>		J		K		M		O		<i>M. laxa</i>
37.	ZD 135/12	<b>A</b>			E		H		J		<b>K</b>		<b>M</b>		<b>O</b>		<i>M. fructigena</i>
38.	ZD 136/12	A			(E)		H		J		K		M		<b>Q</b>		<i>M. laxa</i>
39.	ZD 137/12	A			(E)		H		J		K		M		O		<i>M. laxa</i>
40.	ZD 138/12	A			(E)		<b>G</b>		J		K		M		O		<i>M. laxa</i>
41.	ZD 139/12	(C)			(E)		H		J		K		(N)		O		<i>M. laxa</i>
42.	ZD 140/12	A			(E)		H		J		K		M		<b>Q</b>		<i>M. laxa</i>
43.	ZD 141/12	(C)			(D)		(G)		(I)		L		N		Q		<i>M. fructigena</i>

Broj	Izolat	Boja kolonije <sup>1</sup>			Brzina rasta <sup>2</sup>			Sporulacija <sup>3</sup>		Sporulacija u koncentričnim krugovima <sup>4</sup>		Rub kolonije <sup>5</sup>		Rozete <sup>6</sup>		Režnjevi uz rozete <sup>7</sup>			Identifikacija PCR-om
		A siva	B žuta	C krem/bijela	D raste brzo	E raste umjereno	F raste sporo	G obilna	H oskudna	I prisutna	J nije prisutna	K valovit	L ravan	M prisutne	N nisu prisutne	O crni	P smeđi	Q nisu prisutni	
44.	ZD 142/12	A			(E)			H		J		K		M			O		<i>M. laxa</i>
45.	ZD 143/12	A			F			H		J		K		M			O		<i>M. laxa</i>
46.	ZD 144/12	A			(E)			<b>G</b>		J		K		M			<b>Q</b>		<i>M. laxa</i>
47.	ZD 145/12	(C)			(E)			H		J		K		(N)			O		<i>M. laxa</i>
48.	ZD 146/12	A			F			H		J		K		M			<b>Q</b>		<i>M. laxa</i>
49.	ZD 147/12	A			<b>D</b>			H		J		K		M			O		<i>M. laxa</i>
50.	ZD 148/12	A			(E)			H		J		K		M			<b>Q</b>		<i>M. laxa</i>
51.	ZD 149/12	A			(E)			H		J		K		M			<b>Q</b>		<i>M. laxa</i>
52.	ZD 150/12	A			(E)			H		J		K		M			O		<i>M. laxa</i>
53.	ZD 151/12	(C)			E			H		J		<b>K</b>		N			Q		<i>M. fructigena</i>
54.	<b>ZD 152/12</b>	A			F			H		J		K		M			O		<b><i>M. laxa</i></b>
55.	ZD 153/12	A			(E)			H		J		K		M			O		<i>M. laxa</i>
56.	ZD 154/12	A			F			<b>G</b>		J		K		M			<b>Q</b>		<i>M. laxa</i>
57.	ZD 155/12	A			(E)			H		J		K		M			O		<i>M. laxa</i>
58.	ZD 156/12	B			(D)			H		J		L		N			Q		<i>M. fructigena</i>
59.	ZD 157/12	B			E			H		J		L		N			Q		<i>M. fructigena</i>
60.	ZD 158/12	<b>A</b>			(D)			H		J		<b>K</b>		<b>M</b>			<b>O</b>		<i>M. fructigena</i>
61.	ZD 159/12	B			E			H		J		L		N			Q		<i>M. fructigena</i>
62.	ZD 160/12	B			E			H		J		L		N			Q		<i>M. fructigena</i>
63.	ZD 161/12	A			F			<b>G</b>		J		K		M			O		<i>M. laxa</i>
64.	ZD 162/12	A			(E)			H		J		K		M			O		<i>M. laxa</i>
65.	<b>ZD 163/12</b>	A			<b>D</b>			H		J		K		M			O		<b><i>M. laxa</i></b>
66.	ZD 164/12	A			F			<b>G</b>		J		K		M			O		<i>M. laxa</i>

Broj	Izolot	Boja kolonije <sup>1</sup>			Brzina rasta <sup>2</sup>		Sporulacija <sup>3</sup>		Sporulacija u koncentričnim krugovima <sup>4</sup>		Rub kolonije <sup>5</sup>		Rozete <sup>6</sup>		Režnjevi uz rozete <sup>7</sup>		Identifikacija PCR-om
		A siva	B žuta	C krem/bijela	D raste brzo	E raste umjereno	F raste sporo	G obilna	H oskudna	I prisutna	J nije prisutna	K valovit	L ravan	M prisutne	N nisu prisutne	O crni	
67.	ZD 165/12	A			(E)		H		J		K		M		<b>Q</b>		<i>M. laxa</i>
68.	ZD 166/12	A			<b>D</b>		H		J		K		(N)		<b>Q</b>		<i>M. laxa</i>
69.	<b>ZD 167/12</b>	A			(E)		H		J		K		M		O		<b><i>M. laxa</i></b>
70.	ZD 168/12	A			<b>D</b>		H		J		K		(N)		<b>Q</b>		<i>M. laxa</i>
71.	PO 93/12	(C)			(D)		H		J		<b>K</b>		N		Q		<i>M. fructigena</i>
72.	PO 94/12	(C)			(D)		H		J		<b>K</b>		N		Q		<i>M. fructigena</i>
73.	PO 95/12	(C)			(D)		H		J		<b>K</b>		N		Q		<i>M. fructigena</i>
74.	PO 96/12	A			(E)		H		J		K		M		<b>Q</b>		<i>M. laxa</i>
75.	PO 97/12	A			(E)		H		J		K		M		<b>Q</b>		<i>M. laxa</i>
76.	PO 98/12	(C)			(E)		H		J		K		(N)		<b>Q</b>		<i>M. laxa</i>
77.	PO 99/12	B			(D)		H		J		L		N		Q		<i>M. fructigena</i>
78.	PO 100/12	B			(D)		H		J		L		N		Q		<i>M. fructigena</i>
79.	PO 101/12	(C)			(D)		(G)		(I)		L		N		Q		<i>M. fructigena</i>
80.	PO 102/12	(C)			(D)		(G)		(I)		L		N		Q		<i>M. fructigena</i>
81.	PO 103/12	(C)			(D)		H		J		L		N		Q		<i>M. fructigena</i>
82.	PO 104/12	A			(E)		H		J		K		M		<b>Q</b>		<i>M. laxa</i>
83.	PO 105/12	B			(D)		H		J		L		N		Q		<i>M. fructigena</i>
84.	PO 106/12	B			(D)		H		J		L		N		Q		<i>M. fructigena</i>
85.	PO 107/12	A			(E)		H		J		K		M		<b>Q</b>		<i>M. laxa</i>
86.	PO 108/12	B			(D)		H		J		L		N		Q		<i>M. fructigena</i>
87.	PO 109/12	B			(D)		(G)		(I)		L		N		Q		<i>M. fructigena</i>
88.	PO 110/12	B			(D)		H		J		L		N		Q		<i>M. fructigena</i>
89.	PO 111/12	A			(E)		H		J		K		M		<b>Q</b>		<i>M. laxa</i>

Broj	Izolot	Boja kolonije <sup>1</sup>			Brzina rasta <sup>2</sup>		Sporulacija <sup>3</sup>		Sporulacija u koncentričnim krugovima <sup>4</sup>		Rub kolonije <sup>5</sup>		Rozete <sup>6</sup>		Režnjevi uz rozete <sup>7</sup>		Identifikacija PCR-om
		A siva	B žuta	C krem/bijela	D raste brzo	E raste umjereno	F raste sporo	G obilna	H oskudna	I prisutna	J nije prisutna	K valovit	L ravan	M prisutne	N nisu prisutne	O crni	
90.	PO 112/12	B			E		H		J		L		N		Q		<i>M. fructigena</i>
91.	PO 113/12	A			(E)		H		J		K		M		O		<i>M. laxa</i>
92.	PO 114/12	B			E		(G)		(I)		L		N		Q		<i>M. fructigena</i>
93.	<b>PO 115/12</b>	A			F		H		J		K		M		O		<b><i>M. laxa</i></b>
94.	PO 116/12	A			(E)		<b>G</b>		J		K		M		<b>Q</b>		<i>M. laxa</i>
95.	PO 117/12	B			E		H		J		L		N		Q		<i>M. fructigena</i>
96.	PO 118/12	B			(D)		H		J		L		N		Q		<i>M. fructigena</i>
97.	PO 119/12	A			(E)		H		J		K		M		<b>Q</b>		<i>M. laxa</i>
98.	PO 120/12	B			(D)		H		J		L		N		Q		<i>M. fructigena</i>
99.	PO 121/12	B			(D)		H		J		L		N		Q		<i>M. fructigena</i>
100.	PO 122/12	B			E		(G)		(I)		<b>K</b>		N		Q		<i>M. fructigena</i>
101.	PO 123/12	B			E		H		J		<b>K</b>		<b>M</b>		<b>O</b>		<i>M. fructigena</i>
102.	VŽ 79/12	A			F		H		J		K		M		O		<i>M. laxa</i>
103.	VŽ 80/12	(C)			(D)		H		J		L		N		Q		<i>M. fructigena</i>
104.	VŽ 81/12	(C)			(D)		H		J		L		N		Q		<i>M. fructigena</i>
105.	VŽ 82/12	<b>A</b>			(F)		(G)		J		<b>K</b>		<b>M</b>		<b>O</b>		<i>M. fructigena</i>
106.	VŽ 83/12	(C)			E		H		J		L		N		<b>O</b>		<i>M. fructigena</i>
107.	VŽ 84/12	A			(E)		H		J		K		M		O		<i>M. laxa</i>
108.	VŽ 85/12	B			(D)		H		J		<b>K</b>		<b>M</b>		<b>O</b>		<i>M. fructigena</i>
109.	VŽ 86/12	B			E		H		J		<b>K</b>		<b>M</b>		<b>O</b>		<i>M. fructigena</i>
110.	VŽ 87/12	A			(E)		H		J		K		M		<b>Q</b>		<i>M. laxa</i>
111.	VŽ 88/12	B			(D)		H		J		L		N		Q		<i>M. fructigena</i>
112.	VŽ 89/12	B			(D)		H		J		L		N		Q		<i>M. fructigena</i>

Broj	Izolat	Boja kolonije <sup>1</sup>			Brzina rasta <sup>2</sup>		Sporulacija <sup>3</sup>		Sporulacija u koncentričnim krugovima <sup>4</sup>		Rub kolonije <sup>5</sup>		Rozete <sup>6</sup>		Režnjevi uz rozete <sup>7</sup>		Identifikacija PCR-om
		A siva	B žuta	C krem/bijela	D raste brzo	E raste umjereno	F raste sporo	G obilna	H oskudna	I prisutna	J nije prisutna	K valovit	L ravan	M prisutne	N nisu prisutne	O crni	
113.	VŽ 90/12	B			(D)		H		J		L		N		Q		<i>M. fructigena</i>
114.	<b>BR 52/12</b>	A			(E)		H		J		K		M		O		<b><i>M. laxa</i></b>
115.	BR 53/12	A			F		H		J		K		M		O		<i>M. laxa</i>
116.	BR 54/12	A			(E)		H		J		K		M		<b>Q</b>		<i>M. laxa</i>
117.	BR 55/12	A			F		H		J		K		M		O		<i>M. laxa</i>
118.	<b>BR 56/12</b>	B			E		H		J		L		N		Q		<b><i>M. fructigena</i></b>
119.	BR 57/12	<b>A</b>			E		(G)		(I)		<b>K</b>		<b>M</b>		<b>O</b>		<i>M. fructigena</i>
120.	BR 58/12	B			(D)		H		J		L		N		Q		<i>M. fructigena</i>
121.	BR 59/12	A			(E)		H		J		K		M		<b>Q</b>		<i>M. laxa</i>
122.	<b>BR 60/12</b>	A			(E)		H		J		K		M		O		<b><i>M. laxa</i></b>
123.	BR 61/12	(C)			(D)		H		J		<b>K</b>		N		Q		<i>M. fructigena</i>
124.	BR 62/12	(C)			(D)		H		J		<b>K</b>		N		Q		<i>M. fructigena</i>
125.	BR 63/12	A			<b>D</b>		H		J		K		(N)		<b>Q</b>		<i>M. laxa</i>
126.	BR 64/12	A			F		H		J		K		M		<b>Q</b>		<i>M. laxa</i>
127.	<b>BR 65/12</b>	(C)			(D)		H		J		<b>K</b>		N		Q		<b><i>M. fructigena</i></b>
128.	BR 66/12	A			F		H		J		K		M		O		<i>M. laxa</i>
129.	BR 67/12	<b>A</b>			(F)		H		J		<b>K</b>		N		Q		<i>M. fructigena</i>
130.	BR 68/12	A			F		H		J		K		M		O		<i>M. laxa</i>
131.	BR 69/12	B			(D)		H		J		L		N		Q		<i>M. fructigena</i>
132.	BR 70/12	A			(E)		H		J		K		M		O		<i>M. laxa</i>
133.	BR 71/12	(C)			E		H		J		<b>K</b>		<b>M</b>		Q		<i>M. fructigena</i>

Broj	Izolat	Boja kolonije <sup>1</sup>			Brzina rasta <sup>2</sup>		Sporulacija <sup>3</sup>		Sporulacija u koncentričnim krugovima <sup>4</sup>		Rub kolonije <sup>5</sup>		Rozete <sup>6</sup>		Režnjevi uz rozete <sup>7</sup>		Identifikacija PCR-om
		A siva	B žuta	C krem/bijela	D raste brzo	E raste umjereno	F raste sporo	G obilna	H oskudna	I prisutna	J nije prisutna	K valovit	L ravan	M prisutne	N nisu prisutne	O crni	
134.	BR 72/12	A			(E)		H		J		K		M		O		<i>M. laxa</i>
135.	BR 73/12	B			(F)		H		J		K		N		Q		<i>M. fructigena</i>
136.	<b>BR 74/12</b>	<b>A</b>			(F)		H		J		<b>K</b>		N		Q		<b><i>M. fructigena</i></b>
137.	BR 76/12	A			(E)		H		J		K		M		O		<i>M. laxa</i>
138.	VT 17/12	(C)			(D)		(G)		(I)		L		N		Q		<i>M. fructigena</i>
139.	VT 18/12	<b>A</b>			(D)		H		J		<b>K</b>		N		Q		<i>M. fructigena</i>
140.	VT 19/12	B			(D)		(G)		(I)		L		N		Q		<i>M. fructigena</i>
141.	<b>VT 20/12</b>	<b>A</b>			(D)		H		J		<b>K</b>		N		Q		<b><i>M. fructigena</i></b>
142.	VT 21/12	<b>A</b>			(D)		H		J		<b>K</b>		N		Q		<i>M. fructigena</i>
143.	VT 23/12	B			(D)		(G)		(I)		L		N		Q		<i>M. fructigena</i>
144.	KC 30/12	<b>A</b>			E		H		J		L		N		Q		<i>M. fructigena</i>
145.	KC 31/12	A			(E)		H		J		K		M		<b>Q</b>		<i>M. laxa</i>
146.	KC 32/12	B			E		H		J		<b>K</b>		N		Q		<i>M. fructigena</i>
147.	KC 33/12	B			E		H		J		<b>K</b>		N		Q		<i>M. fructigena</i>
148.	KC 34/12	B			E		H		J		<b>K</b>		N		Q		<i>M. fructigena</i>
149.	KC 35/12	A			(E)		H		J		<b>L</b>		(N)		<b>Q</b>		<i>M. laxa</i>
150.	KC 36/12	<b>A</b>			E		H		J		<b>K</b>		<b>M</b>		<b>O</b>		<i>M. fructigena</i>
151.	KC 37/12	A			F		H		J		<b>L</b>		(N)		<b>Q</b>		<i>M. laxa</i>
152.	KC 38/12	A			(E)		H		J		K		(N)		<b>Q</b>		<i>M. laxa</i>
153.	KC 39/12	A			F		H		J		K		M		O		<i>M. laxa</i>
154.	DB 32/12	A			(E)		<b>G</b>		J		<b>L</b>		M		O		<i>M. laxa</i>

Broj	Izolot	Boja kolonije <sup>1</sup>			Brzina rasta <sup>2</sup>		Sporulacija <sup>3</sup>		Sporulacija u koncentričnim krugovima <sup>4</sup>		Rub kolonije <sup>5</sup>		Rozete <sup>6</sup>		Režnjevi uz rozete <sup>7</sup>		Identifikacija PCR-om
		A siva	B žuta	C krem/bijela	D raste brzo	E raste umjereno	F raste sporo	G obilna	H oskudna	I prisutna	J nije prisutna	K valovit	L ravan	M prisutne	N nisu prisutne	O crni	
155.	DB 33/12	A			(E)		H		J		K		(N)		O		<i>M. laxa</i>
156.	DB 34/12	A			<b>D</b>		H		J		K		M		<b>Q</b>		<i>M. laxa</i>
157.	DB 35/12	A			(E)		<b>G</b>		J		<b>L</b>		M		O		<i>M. laxa</i>
158.	DB 36/12	A			(E)		H		J		K		M		<b>Q</b>		<i>M. laxa</i>
159.	DB 37/12	A			<b>D</b>		H		J		K		(N)		<b>Q</b>		<i>M. laxa</i>
160.	DB 38/12	(C)			E		H		J		L		N		Q		<i>M. fructigena</i>
161.	DB 39/12	A			(E)		H		J		K		M		<b>Q</b>		<i>M. laxa</i>
162.	DB 40/12	A			<b>D</b>		H		J		K		M		<b>Q</b>		<i>M. laxa</i>
163.	ŽU 17/12	B			E		(G)		J		<b>K</b>		<b>M</b>		<b>O</b>		<i>M. fructigena</i>
164.	<b>ŽU 18/12</b>	<b>B</b>			(E)		H		J		K		M		O		<b>M. laxa</b>
165.	ŽU 19/12	B			(F)		H		J		<b>K</b>		<b>M</b>		<b>O</b>		<i>M. fructigena</i>
166.	ŽU 20/12	B			E		H		J		<b>K</b>		N		Q		<i>M. fructigena</i>
167.	ŽU 21/12	B			(F)		(G)		(I)		<b>K</b>		N		Q		<i>M. fructigena</i>
168.	ŽU 22/12	<b>A</b>			(D)		H		J		<b>K</b>		<b>M</b>		<b>O</b>		<i>M. fructigena</i>
169.	ŽU 23/12	(C)			E		H		J		L		N		Q		<i>M. fructigena</i>
170.	VD 2/13	A			D		G		(J)		L		N		Q		<i>M. fructicola</i>
171.	VD 3/13	A			D		G		(J)		L		N		Q		<i>M. fructicola</i>
172.	VD 4/13	A			D		G		(J)		L		N		Q		<i>M. fructicola</i>
173.	VD 5/13	A			D		G		(J)		L		N		Q		<i>M. fructicola</i>
174.	VD 6/13	A			D		G		(J)		L		N		Q		<i>M. fructicola</i>
175.	VD 7/13	A			D		G		(J)		L		N		Q		<i>M. fructicola</i>
176.	VD 8/13	A			D		G		(J)		L		N		Q		<i>M. fructicola</i>
177.	KC 42/13	(C)			(D)		H		J		<b>K</b>		<b>M</b>		Q		<i>M. fructigena</i>



Broj	Izolat	Boja kolonije <sup>1</sup>			Brzina rasta <sup>2</sup>			Sporulacija <sup>3</sup>			Sporulacija u koncentričnim krugovima <sup>4</sup>			Rub kolonije <sup>5</sup>			Rozete <sup>6</sup>			Režnjevi uz rozete <sup>7</sup>			Identifikacija PCR-om
		A siva	B žuta	C krem/bijela	D raste brzo	E raste umjereno	F raste sporo	G obilna	H oskudna	I prisutna	J nije prisutna	K valovit	L ravan	M prisutne	N nisu prisutne	O crni	P smeđi	Q nisu prisutni					
178.	KC 43/13	A			(E)			H		J		K		(N)			<b>Q</b>			<i>M. laxa</i>			
179.	KC 44/13	B			(D)			(G)		(I)		L		N			Q			<i>M. fructigena</i>			
180.	KC 45/13	B			(D)			H		J		L		N			Q			<i>M. fructigena</i>			
181.	KC 46/13	A			(E)			H		J		<b>L</b>		(N)			<b>Q</b>			<i>M. laxa</i>			
182.	KC 47/13	A			(E)			H		J		<b>L</b>		(N)			<b>Q</b>			<i>M. laxa</i>			
183.	KC 48/13	B			E			H		J		L		N			Q			<i>M. fructigena</i>			
184.	KC 49/13	B			(D)			H		J		L		N			Q			<i>M. fructigena</i>			
185.	KC 50/13	A			(E)			H		J		K		M			<b>Q</b>			<i>M. laxa</i>			
186.	KC 51/13	B			E			H		J		L		N			Q			<i>M. fructigena</i>			
187.	ZG 17/13	A			(E)			H		J		K		M			O			<i>M. laxa</i>			
188.	ZG 18/13	A			(E)			H		J		K		M			<b>Q</b>			<i>M. laxa</i>			
189.	ZG 19/13	A			(E)			H		J		K		M			O			<i>M. laxa</i>			
190.	ZG 20/13	A			(E)			H		J		K		M			<b>Q</b>			<i>M. laxa</i>			
191.	ZG 21/13	B			E			H		J		<b>K</b>		<b>M</b>			<b>O</b>			<i>M. fructigena</i>			
192.	ZG 22/13	B			E			H		J		<b>K</b>		<b>M</b>			Q			<i>M. fructigena</i>			
193.	ZG 23/13	B			E			H		J		<b>K</b>		<b>M</b>			<b>O</b>			<i>M. fructigena</i>			
194.	ZG 24/13	A			(E)			H		J		K		M			O			<i>M. laxa</i>			
195.	ZG 25/13	A			(E)			H		J		K		M			O			<i>M. laxa</i>			
196.	ZG 26/13	A			(E)			G		I		<b>K</b>		N			Q			<i>M. fructicola</i>			
197.	ZG 27/13	A			(E)			H		J		K		M			<b>Q</b>			<i>M. laxa</i>			
198.	ZG 28/13	A			F			H		J		K		M			O			<i>M. laxa</i>			
199.	ZG 29/13	A			(E)			H		J		K		M			O			<i>M. laxa</i>			
200.	ZG 30/13	B			(D)			H		J		L		N			Q			<i>M. fructigena</i>			

Broj	Izolat	Boja kolonije <sup>1</sup>			Brzina rasta <sup>2</sup>		Sporulacija <sup>3</sup>		Sporulacija u koncentričnim krugovima <sup>4</sup>		Rub kolonije <sup>5</sup>		Rozete <sup>6</sup>		Režnjevi uz rozete <sup>7</sup>			Identifikacija PCR-om
		A siva	B žuta	C krem/bijela	D raste brzo	E raste umjereno	F raste sporo	G obilna	H oskudna	I prisutna	J nije prisutna	K valovit	L ravan	M prisutne	N nisu prisutne	O crni	P smeđi	
201.	ZG 31/13	A			(E)		H		J		K		M				<b>Q</b>	<i>M. laxa</i>
202.	PL 1/13	A			(E)		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
203.	PL 2/13	A			D		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
204.	PL 3/13	A			(E)		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
205.	PL 4/13	A			D		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
206.	PL 5/13	A			(E)		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
207.	PL 6/13	A			D		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
208.	PL 7/13	A			D		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
209.	PL 8/13	(C)			E		H		J		L		N				Q	<i>M. fructigena</i>
210.	PL 9/13	A			D		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
211.	PL 10/13	(C)			E		H		J		L		N				Q	<i>M. fructigena</i>
212.	PL 11/13	A			D		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
213.	PL 12/13	A			D		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
214.	PL 13/13	A			D		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
215.	PL 14/13	A			D		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
216.	PL 15/13	A			D		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
217.	PL 16/13	(C)			<b>D</b>		H		J		K		(N)				<b>Q</b>	<i>M. laxa</i>
218.	PL 17/13	A			D		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
219.	NS 3/13	A			D		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
220.	NS 4/13	A			D		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
221.	NS 5/13	A			D		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
222.	NS 6/13	A			D		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
223.	NS 7/13	A			D		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>

Broj	Izolat	Boja kolonije <sup>1</sup>			Brzina rasta <sup>2</sup>		Sporulacija <sup>3</sup>		Sporulacija u koncentričnim krugovima <sup>4</sup>		Rub kolonije <sup>5</sup>		Rozete <sup>6</sup>		Režnjevi uz rozete <sup>7</sup>		Identifikacija PCR-om
		A siva	B žuta	C krem/bijela	D raste brzo	E raste umjereno	F raste sporo	G obilna	H oskudna	I prisutna	J nije prisutna	K valovit	L ravan	M prisutne	N nisu prisutne	O crni	
224.	NS 8/13	A			D		G		(J)		L		N		Q	<i>M. fructicola</i>	
225.	NS 9/13	A			D		G		(J)		L		N		Q	<i>M. fructicola</i>	
226.	NS 10/13	A			D		G		(J)		L		N		Q	<i>M. fructicola</i>	
227.	NS 11/13	A			D		G		(J)		L		N		Q	<i>M. fructicola</i>	
228.	NS 12/13	A			D		G		(J)		L		N		Q	<i>M. fructicola</i>	
229.	NS 13/13	A			D		G		(J)		L		N		Q	<i>M. fructicola</i>	
230.	NS 14/13	A			D		G		(J)		L		N		Q	<i>M. fructicola</i>	
231.	NS 15/13	A			D		G		(J)		L		N		Q	<i>M. fructicola</i>	
232.	NS 16/13	A			D		G		(J)		L		N		Q	<i>M. fructicola</i>	
233.	NS 17/13	A			D		G		(J)		L		N		Q	<i>M. fructicola</i>	
234.	NS 18/13	A			D		G		(J)		L		N		Q	<i>M. fructicola</i>	
235.	NS 19/13	A			D		G		(J)		L		N		Q	<i>M. fructicola</i>	
236.	NS 20/13	A			D		G		(J)		L		N		Q	<i>M. fructicola</i>	
237.	NS 21/13	A			D		G		(J)		L		N		Q	<i>M. fructicola</i>	
238.	NS 22/13	A			D		G		(J)		L		N		Q	<i>M. fructicola</i>	
239.	NS 23/13	A			D		G		(J)		L		N		Q	<i>M. fructicola</i>	
240.	NS 24/13	A			(E)		G		(J)		L		N		Q	<i>M. fructicola</i>	
241.	NS 25/13	B			(D)		H		J		L		N		Q	<i>M. fructigena</i>	
242.	NS 26/13	B			(D)		H		J		L		N		Q	<i>M. fructigena</i>	
243.	NS 27/13	A			(E)		G		(J)		L		N		Q	<i>M. fructicola</i>	
244.	NS 28/13	A			(E)		G		(J)		L		N		Q	<i>M. fructicola</i>	
245.	NS 29/13	A			(E)		G		(J)		L		N		Q	<i>M. fructicola</i>	
246.	NS 30/13	A			(E)		G		(J)		L		N		Q	<i>M. fructicola</i>	

Broj	Izolot	Boja kolonije <sup>1</sup>			Brzina rasta <sup>2</sup>		Sporulacija <sup>3</sup>		Sporulacija u koncentričnim krugovima <sup>4</sup>		Rub kolonije <sup>5</sup>		Rozete <sup>6</sup>		Režnjevi uz rozete <sup>7</sup>			Identifikacija PCR-om
		A siva	B žuta	C krem/bijela	D raste brzo	E raste umjereno	F raste sporo	G obilna	H oskudna	I prisutna	J nije prisutna	K valovit	L ravan	M prisutne	N nisu prisutne	O crni	P smeđi	
247.	NS 31/13	A			(E)		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
248.	NS 32/13	A			(E)		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
249.	NS 33/13	A			D		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
250.	NS 34/13	A			D		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
251.	NS 35/13	A			D		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
252.	NS 36/13	A			(E)		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
253.	NS 37/13	A			(E)		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
254.	NS 38/13	A			(E)		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
255.	NS 39/13	A			D		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
256.	NS 40/13	A			D		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
257.	NS 41/13	A			(E)		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
258.	NS 42/13	A			(E)		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
259.	NS 43/13	A			(E)		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
260.	NS 44/13	A			D		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
261.	NS 45/13	A			D		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
262.	NS 46/13	A			D		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
263.	NS 47/13	A			(E)		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
264.	NS 48/13	A			D		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
265.	NS 49/13	A			D		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
266.	NS 50/13	A			(E)		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
267.	NS 51/13	A			(E)		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
268.	NS 52/13	A			D		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
269.	NS 53/13	A			(E)		H		J		K		M				Q	<i>M. laxa</i>

Broj	Izolot	Boja kolonije <sup>1</sup>			Brzina rasta <sup>2</sup>		Sporulacija <sup>3</sup>		Sporulacija u koncentričnim krugovima <sup>4</sup>		Rub kolonije <sup>5</sup>		Rozete <sup>6</sup>		Režnjevi uz rozete <sup>7</sup>		Identifikacija PCR-om
		A siva	B žuta	C krem/bijela	D raste brzo	E raste umjereno	F raste sporo	G obilna	H oskudna	I prisutna	J nije prisutna	K valovit	L ravan	M prisutne	N nisu prisutne	O crni	
270.	ZD 124/13	A			(E)		H		J		K		M		O		<i>M. laxa</i>
271.	ZD 125/13	<b>A</b>			(D)		(G)		J		L		N		Q		<i>M. fructigena</i>
272.	ZD 126/13	(C)			(D)		H		J		L		N		Q		<i>M. fructigena</i>
273.	ZD 127/13	(C)			(D)		H		J		L		N		Q		<i>M. fructigena</i>
274.	ZD 128/13	<b>B</b>			F		<b>G</b>		<b>I</b>		K		M		O		<i>M. laxa</i>
275.	ZD 129/13	(C)			(D)		H		J		L		N		Q		<i>M. fructigena</i>
276.	ZD 130/13	(C)			E		H		J		L		N		Q		<i>M. fructigena</i>
277.	ZD 131/13	A			F		H		J		K		M		O		<i>M. laxa</i>
278.	ZD 132/13	(C)			E		H		J		L		N		Q		<i>M. fructigena</i>
279.	ZD 133/13	(C)			(D)		H		J		L		N		Q		<i>M. fructigena</i>
280.	ZD 134/13	A			F		H		J		K		M		<b>Q</b>		<i>M. laxa</i>
281.	ZD 135/13	A			F		H		J		K		M		<b>Q</b>		<i>M. laxa</i>
282.	ZD 136/13	A			F		H		J		K		M		<b>Q</b>		<i>M. laxa</i>
283.	ZD 137/13	(C)			(D)		H		J		L		N		Q		<i>M. fructigena</i>
284.	ZD 138/13	(C)			(D)		H		J		L		N		Q		<i>M. fructigena</i>
285.	ZD 139/13	A			F		<b>G</b>		<b>I</b>		K		M		O		<i>M. laxa</i>
286.	ZD 140/13	B			(D)		H		J		L		N		Q		<i>M. fructigena</i>
287.	ZD 141/13	B			E		H		J		L		N		Q		<i>M. fructigena</i>
288.	ZD 142/13	(C)			E		H		J		L		N		Q		<i>M. fructigena</i>
289.	ZD 143/13	(C)			E		H		J		L		N		Q		<i>M. fructigena</i>
290.	ZD 144/13	A			F		H		J		K		M		<b>Q</b>		<i>M. laxa</i>
291.	ZD 145/13	A			F		H		J		K		M		<b>Q</b>		<i>M. laxa</i>
292.	ZD 146/13	(C)			(F)		H		J		<b>K</b>		N		Q		<i>M. fructigena</i>

Broj	Izolot	Boja kolonije <sup>1</sup>			Brzina rasta <sup>2</sup>			Sporulacija <sup>3</sup>			Sporulacija u koncentričnim krugovima <sup>4</sup>			Rub kolonije <sup>5</sup>			Rozete <sup>6</sup>			Režnjevi uz rozete <sup>7</sup>			Identifikacija PCR-om
		A siva	B žuta	C krem/bijela	D raste brzo	E raste umjereno	F raste sporo	G obilna	H oskudna	I prisutna	J nije prisutna	K valovit	L ravan	M prisutne	N nisu prisutne	O crni	P smeđi	Q nisu prisutni					
293.	ZD 147/13	(C)			(D)			H		J		L		N			Q			<i>M. fructigena</i>			
294.	ZD 148/13	A			F			<b>G</b>		<b>I</b>		K		M			<b>Q</b>			<i>M. laxa</i>			
295.	ZD 149/13	A			F			H		J		K		M			O			<i>M. laxa</i>			
296.	ZD 150/13	A			F			H		J		K		M			O			<i>M. laxa</i>			
297.	ZD 151/13	A			(E)			H		J		K		M			<b>Q</b>			<i>M. laxa</i>			
298.	ZD 152/13	B			(D)			(G)		(I)		L		N			Q			<i>M. fructigena</i>			
299.	ZD 153/13	A			(E)			H		J		K		M			<b>Q</b>			<i>M. laxa</i>			
300.	VŽ 18/13	B			(D)			H		J		L		N			Q			<i>M. fructigena</i>			
301.	VŽ 19/13	B			(D)			H		J		L		N			Q			<i>M. fructigena</i>			
302.	VŽ 20/13	A			(E)			H		J		K		M			<b>Q</b>			<i>M. laxa</i>			
303.	VŽ 21/13	B			(D)			H		J		L		N			Q			<i>M. fructigena</i>			
304.	VŽ 22/13	B			(D)			H		J		L		N			Q			<i>M. fructigena</i>			
305.	VŽ 23/13	B			(D)			H		J		L		N			Q			<i>M. fructigena</i>			
306.	VŽ 24/13	A			(E)			G		I		<b>K</b>		N			Q			<i>M. fructicola</i>			
307.	VŽ 25/13	(C)			E			H		J		L		N			Q			<i>M. fructigena</i>			
308.	VŽ 26/13	B			E			H		J		L		N			Q			<i>M. fructigena</i>			
309.	VŽ 27/13	B			(D)			H		J		L		N			Q			<i>M. fructigena</i>			
310.	VT 22/13	B			(D)			H		J		L		N			Q			<i>M. fructigena</i>			
311.	VT 23/13	(C)			(F)			H		J		<b>K</b>		N			Q			<i>M. fructigena</i>			
312.	VT 24/13	(C)			(F)			H		J		<b>K</b>		N			Q			<i>M. fructigena</i>			
313.	VT 25/13	A			F			<b>G</b>		J		K		M			O			<i>M. laxa</i>			
314.	VT 26/13	(C)			(F)			H		J		<b>K</b>		N			Q			<i>M. fructigena</i>			
315.	BA 12/13	A			F			H		J		K		M			<b>Q</b>			<i>M. laxa</i>			

Broj	Izolat	Boja kolonije <sup>1</sup>			Brzina rasta <sup>2</sup>		Sporulacija <sup>3</sup>		Sporulacija u koncentričnim krugovima <sup>4</sup>		Rub kolonije <sup>5</sup>		Rozete <sup>6</sup>		Režnjevi uz rozete <sup>7</sup>			Identifikacija PCR-om
		A siva	B žuta	C krem/bijela	D raste brzo	E raste umjereno	F raste sporo	G obilna	H oskudna	I prisutna	J nije prisutna	K valovit	L ravan	M prisutne	N nisu prisutne	O crni	P smeđi	
316.	BA 13/13	A			F		H		J		K		M				Q	<i>M. laxa</i>
317.	BA 14/13	A			D		G		(J)		K		N				Q	<i>M. fructicola</i>
318.	BA 15/13	A			D		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
319.	BA 16/13	A			(E)		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
320.	BA 17/13	B			(D)		(G)		J		L		N				Q	<i>M. fructigena</i>
321.	BA 18/13	B			(D)		H		J		L		N				Q	<i>M. fructigena</i>
322.	BA 19/13	A			D		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
323.	BA 20/13	A			D		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
324.	BA 21/13	A			D		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
325.	BA 22/13	A			D		G		(J)		L		N				Q	<i>M. fructicola</i>
326.	BA 23/13	A			(E)		H		J		K		M				O	<i>M. laxa</i>
327.	BA 24/13	(C)			E		H		J		L		N				Q	<i>M. fructigena</i>
328.	BA 25/13	A			F		G		J		K		M				O	<i>M. laxa</i>
329.	BA 26/13	A			(E)		H		J		K		M				Q	<i>M. laxa</i>
330.	BA 27/13	A			(E)		H		J		K		M				O	<i>M. laxa</i>
331.	BA 28/13	A			(E)		G		(J)		K		N				Q	<i>M. fructicola</i>
332.	BA 29/13	A			(E)		H		J		K		M				Q	<i>M. laxa</i>
333.	BA 30/13	A			(E)		H		J		K		M				O	<i>M. laxa</i>
334.	BA 31/13	A			(E)		H		J		K		M				O	<i>M. laxa</i>
335.	OS 63/13	B			E		H		J		K		M				Q	<i>M. fructigena</i>
336.	OS 64/13	A			(E)		H		J		K		M				Q	<i>M. laxa</i>
337.	OS 65/13	A			(E)		H		J		K		M				Q	<i>M. laxa</i>
338.	OS 66/13	A			(E)		H		J		K		M				Q	<i>M. laxa</i>

Broj	Izolat	Boja kolonije <sup>1</sup>			Brzina rasta <sup>2</sup>		Sporulacija <sup>3</sup>		Sporulacija u koncentričnim krugovima <sup>4</sup>		Rub kolonije <sup>5</sup>		Rozete <sup>6</sup>			Režnjevi uz rozete <sup>7</sup>			Identifikacija PCR-om
		A siva	B žuta	C krem/bijela	D raste brzo	E raste umjereno	F raste sporo	G obilna	H oskudna	I prisutna	J nije prisutna	K valovit	L ravan	M prisutne	N nisu prisutne	O crni	P smeđi	Q nisu prisutni	
339.	OS 67/13	B			(F)		H		J		<b>K</b>		<b>M</b>				Q		<i>M. fructigena</i>
340.	OS 69/13	A			<b>D</b>		H		J		K		M				O		<i>M. laxa</i>
341.	OS 70/13	A			(E)		H		J		K		M				O		<i>M. laxa</i>
342.	OS 71/13	A			(E)		H		J		K		M				<b>Q</b>		<i>M. laxa</i>
343.	OS 72/13	A			(E)		H		J		K		M				<b>Q</b>		<i>M. laxa</i>
344.	OS 73/13	A			F		<b>G</b>		J		K		M				O		<i>M. laxa</i>
345.	PO 118/13	B			(D)		H		J		L		N				Q		<i>M. fructigena</i>
346.	PO 119/13	B			(D)		H		J		L		N				Q		<i>M. fructigena</i>
347.	PO 120/13	B			(D)		H		J		L		N				Q		<i>M. fructigena</i>
348.	PO 121/13	B			(D)		H		J		L		N				Q		<i>M. fructigena</i>
349.	PO 122/13	B			E		H		J		L		N				Q		<i>M. fructigena</i>
350.	PO 123/13	A			(E)		H		J		K		M				<b>Q</b>		<i>M. laxa</i>
351.	PO 124/13	<b>A</b>			E		H		J		<b>K</b>		<b>M</b>				Q		<i>M. fructigena</i>
352.	PO 125/13	A			(E)		H		J		K		M				O		<i>M. laxa</i>
353.	PO 126/13	B			E		H		J		L		<b>M</b>				Q		<i>M. fructigena</i>
354.	PO 127/13	A			(E)		G		(J)		L		N				Q		<i>M. fructicola</i>
355.	PO 128/13	A			F		H		J		K		M				O		<i>M. laxa</i>
356.	PO 129/13	A			(E)		G		(J)		L		N				Q		<i>M. fructicola</i>
357.	PO 130/13	B			E		H		J		L		N				Q		<i>M. fructigena</i>
358.	PO 131/13	A			F		H		J		K		M				O		<i>M. laxa</i>
359.	PO 132/13	A			(E)		H		J		K		M				O		<i>M. laxa</i>
360.	VRG 1/16	A			D		G		(J)		L		N				Q		<i>M. fructicola</i>
361.	VRG 3/16	A			D		G		(J)		L		N				Q		<i>M. fructicola</i>



<sup>1</sup> Boja kolonije: lice Petrijeve zdjelice sive boje (A), žute (B) ili krem/bijele (C).

<sup>2</sup> Brzina rasta: prosječan promjer kolonije > 80 mm – raste brzo (D), 70–80 mm – raste umjereno (E) ili < 70 mm – raste sporo (F).

<sup>3</sup> Sporulacija: obilna (G) ili oskudna (H).

<sup>4</sup> Sporulacija u koncentričnim krugovima: prisutna (I) ili nije prisutna (J).

<sup>5</sup> Rub kolonije: naličje Petrijeve zdjelice valovit (K) ili ravan (L).

<sup>6</sup> Rozete: prisutne (M) ili nisu prisutne (N).

<sup>7</sup> Režnjevi: crni režnjevi ili krugovi uz rozete (O), crni točkasti dijelovi ili smeđi režnjevi ili krugovi (P) ili nisu prisutni (Q).

\* Morfološko obilježje atipično za vrstu identificiranu PCR-om označeno je podebljanim crvenim slovima te je atipični izolat označen sivom bojom. Izolati za koje je analizom sekvenci potvrđena identifikacija PCR-om dodatno su označeni podebljanim slovima.

Sinoptički ključ za identifikaciju određene *Monilinia* vrste je sljedeći:

*M. laxa*: A, (C), (E), F, H, J, K, M, (N), O.

*M. fructigena*: B, (C), (D), E, (F), (G), H, (I), J, L, N, Q.

*M. fructicola*: A, D, (E), G, I, (J), L, (M), N, (P), Q.

Slova u zagradi označavaju obilježje koje nije često prisutno kod određene *Monilinia* vrste, ali se može pojaviti kod pojedinih izolata.