Molekularna identifikacija gljiva izoliranih iz bolesnog drva vinove loze u Hrvatskoj

Lendarić, Josip

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:598873

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**



Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Josip Lendarić

MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA GLJIVA IZOLIRANIH IZ BOLESNOG DRVA VINOVE LOZE U HRVATSKOJ

DIPLOMSKI RAD

ZAGREB, 2016.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET
Fitomedicina

JOSIP LENDARIĆ

MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA GLJIVA IZOLIRANIH IZ BOLESNOG DRVA VINOVE LOZE U HRVATSKOJ

DIPLOMSKI RAD

Mentor: izv. prof. dr. sc. Tihomir Miličević

Zagreb, 2016.

Ovaj diplomski rad je ocijenjen i obranjen dana _____

s ocjenom _____ pred Povjerenstvom u sastavu:

1. izv. prof. dr. sc. Tihomir Miličević _____
2. izv. prof. dr. sc. Aleksandar Mešić _____
3. doc. dr. sc. Marko Karoglan _____

SAŽETAK

MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA GLJIVA IZOLIRANIH IZ BOLESNOG DRVA VINOVE LOZE U HRVATSKOJ

Bolesti drva vinove loze, koje uzrokuju fitopatogene gljive sve više dobivaju na važnosti zbog značajnih šteta koje nanose vinovoj lozi. U Hrvatskoj postoji mali broj istraživanja bolesti drva vinove loze. Tijekom 2013., 2014. i 2015. godine sakupljeni su uzorci drva vinove loze iz 5 vinograda na lokalitetima koji su obuhvaćali Dalmaciju, Središnju Hrvatsku i Slavoniju a koji su pokazivali simptome koji se povezuju sa gljivičnim bolestima drva vinove loze. Iz uzoraka su dobivene čiste kulture gljiva te su grupirane prema svojim kulturalnim i morfološkim karakteristikama. Iz svake od navedenih grupa izolata, odabrani su reprezentativni izolati koji su podvrgnuti analizi molekularnim metodama s ciljem njihove identifikacije do razine vrste. Navedenim reprezentativnim izolatima izolirana je ukupna genomska DNA, te su metodom MSP-PCR, uporabom početnice M13 i korištenjem horizontalne gel elektroforeze, dobiveni DNA fingerprint profili. Na temelju analize navedenih DNA fingerprint profila, dio izolata bilo je moguće identificirati do razine vrste temeljem usporedbe njihovih DNA fingerprint profila s odgovarajućim profilima otprije identificiranih vrsta poznatih patogena drva vinove loze. Također, navedena analiza omogućila je provjeru pouzdanosti grupiranja izolata prema morfološkim karakteristikama, a unutar navedenih grupa, prema podudarnosti DNA fingerprint profila, bilo je moguće dodatno razlučiti podgrupe unutar kojih su odabrani reprezentativni izolati za daljnju identifikaciju na temelju molekularnih markera ITS i EF1-α. Identifikacija izolata na temelju navedenih molekularnih markera provedena je metodom PCR korištenjem parova početnica ITS5/ITS4, odnosno EF728/EF986. Produkti PCR reakcije su sekvencirani, a dobivene DNA sekvence uspoređene su sa odgovarajućim sekvencama referentnih izolata u međunarodnoj banci gena GenBank korištenjem metode BLAST a po potrebi provedena i njihova filogenetska analiza. Na temelju dokaza dobivenih kombinacijom navedenih metoda, izolati su identificirani, a utvrđene su sljedeće vrste: *Diplodia mutila*, *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata*, *Phomopsis ampelina*, *Diaporthe eres*, *Sordaria fimicola*, *Valsa leucostoma*, *Schizophyllum commune*, *Stereum hirsutum*, *Kalmusia variispora*.

Ključne riječi: Bolesti drva vinove loze, molekularna identifikacija, *Vitis vinifera*, MSP-PCR, DNA fingerprinting

SUMMARY

MOLECULAR IDENTIFICATION OF FUNGI ISOLATED FROM DISEASED GRAPEVINE WOOD IN CROATIA

Grapevine trunk diseases caused by fungi are gaining importenance due to significant damage which thay inflict on grapevines. There is small number of researches on grapevine trunk diseases in Croatia. During 2013., 2014. and 2015. samples from five regions, encompassing Dalmatia, Central Croatia and Slavonia, whych exhibited simptoms associated with fungal grapevine trunk diseases, have been collected. From the samples, clean cultures of fungi have been obtained and grouped based on their cultural and morfological characteristics. From each of those groups, representative isolates have been chosen for analisis with molecular methods, and to be identified up to species level. From those representative isolates, complete genomic DNA has been isolated and with method MSP-PCR and primer M13, thrue visualisation by horizontal gel electrophoresis, DNA fingerprint profiles have been obtained. Based on analisis of those DNA fingerprint profiles, for part of isolates, identification up to the level of species was possible due to comparison of their DNA fingerprint profiles with adequate profiles already identified species of known grapevine trunk pathogens. Furthermore, mentioned analisis provided reliability check for grouping based on cultural nad morfological characteristics, and inside those groups, per compatibility of DNA fingerprint profiles, further distinction of subgroups was possible and inside whych representative isolates have been chosen for further identification based on molecular markers ITS and EF1-α. Identification of isolates based on molecular markers has been conducted with method PCR by using pairs of primers ITS5/ITS4, or EF728/EF986. Products of PCR reaction have been sequenced and obtained DNA sequences have been compared to corresponding sequences of reference isolates in international gene bank GenBank with method BLAST and if neaded phylogenetic analisis. Based on evidence obtained in combination of mentioned method, isolates have been identified, those species were: *Diplodia mutila*, *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriate*, *Phomopsis ampelina*, *Diaporthe eres*, *Sordaria fimicola*, *Valsa leucostoma*, *Schizophyllum commune*, *Stereum hirsutum*, *Kalmusia variispora*.

Key words: Grapevine trunk diseases, molecular identification, *Vitis vinifera*, MSP-PCR, DNA fingerprinting

Sadržaj:

1. Uvod……...…….1
2. Pregled literature……...……..2
2.1. Bolesti drva vinove loze……...2
2.2. Molekularne metode identifikacije gljiva……....5
2.3. DNA Fingerprinting ……5
3. Materijali i metode……..8
4. Rezultati i rasprava……18
4.1. Sakupljanje uzoraka drva vinove loze i izolacija gljiva u čistu kulturu……....18
4.2. Analiza i grupiranje izolata prema morfološkim obilježjima……....18
4.3. Identifikacija izolata molekularnim metodama……19
4.3.1. Molekularna identifikacija izolata iz Grupe 1 –Botryosphaeriaceae ……20
4.3.2. Molekularna identifikacija izolata iz grupe 2- Diaporthaceae ……..25
4.3.3. Identifikacija izolata iz Grupe 3- Ostale ……29
4.4. Ostale gljive…….……..36
5. Zaključci…….……...37
6. Literatura……...38
7. Dodaci……...47
8. Životopis Autora……..48

1. UVOD

Vinova loza je važna kultura u svijetu i Hrvatskoj, pa tako na primjer njena proizvodnja, koja se mjeri u tonama, prelazi 6 milijuna u Francuskoj i SAD-u, a 8 milijuna u Italiji (FAOstat), te stoga predstavlja važan ekonomski aspekt navedenih država. U Hrvatskoj vinova loza osim tradicijske vrijednosti ima ekonomsku vrijednost iz razloga što je domaća potrošnja velika a uz to se jedan dio i izvozi (Mirošević i Karoglan Kontić, 2008). Vinova loza kao višegodišnja kultura stvara kompleksan ekosustav, kako u svojem neposrednom okolišu tako i u samim organima biljke (Maceljski i sur., 2006; Ciglar, 1998). Tako u drvu i na površini vinove loze živi veliki broj raznih organizama od kojih se gljive smatraju najznačajnije. Gljive na vinovoj lozi dolaze kao, saprofiti, uspostavljaju endofitski odnos sa biljkom ili dolaze kao jedne od mnogobrojnih patogena organizama čijem napadu je vinova loza podložna. Do sada je na ili u vinovoj lozi pronađeno više od 750 taksona (Fungal database, 2016). Od opasnijih fitopatogenih gljiva na vinovoj lozi su one koje uzrokuju bolesti drva vinove loze, a koje smanjuju prirod, uzrokuju prerano sušenja biljke i propadanja čitavih vinograda, stoga ne iznenađuje da se ovim gljivama, u svijetu i Hrvatskoj pridaje sve veća pozornost. Različiti autori (Ammad i sur. 2014; Alves i sur. 2004a,b; Arzanlou i Narmani, 2015; Berraf-Tebbal i sur., 2011) opisuju simptome bolesti drva vinove loze kao smeđe zone na poprečnom presjeku krakova i debla, smeđe linije na uzdužnom presjek, „V“ nekroze na poprečnom presjeku, skraćivanje internodija, kloroze i nekroze listova, rak rane, odumiranja, izbjeljenje i pucanje kore rozgve. Navedeni simptomi tek su djelomično specifični za pojedine bolesti drva te se simptomatologija ne može koristiti za pouzdano utvrđivanje etiologije. Stoga za pouzdanu identifikaciju mnogih vrsta uzročnika bolesti drva vinove loze potrebno je koristiti molekularne metode identifikacije i po mogućnosti kombinirati ih sa kulturološkim i morfološkim metodama identifikacije (Urbez-Torres, 2011; Kaliterna, 2013). Glavna molekularna metoda koja se koristi za identifikaciju gljiva izoliranih iz drva vinove loze je metoda na bazi molekularnih markera čija analiza se temelji na lančanoj reakciji polimerazom (PCR), sekvenciranju odsječaka dobivenih DNA dotičnih markera te popratnim bioinformatičkim metodama (Kaliterna, 2013). Navedena molekularna metoda identifikacije relativno je skupa metoda što je posebno naglašeno kada se radi s većim brojem izolata, stoga se kao pomoćna metoda u identifikaciji patogenih gljiva sve češće koristi i metoda DNA fingerprinting koja koja daje prikaz različitosti odnosno sličnosti među genotipovima čime se može izbjeći dupliciranje analize izolata (Udayanga i sur., 2011.) pa time i smanjiti vrijeme i trošak potreban za identifikaciju izolata gljiva.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Bolesti drva vinove loze

Prema ICGTD-u pod pojmom „bolesti drva vinove loze“ (eng. *grapevine trunk diseases*) u nastavku teksta skraćeno GTD trenutno se smatra kompleks od 6 gljivičnih bolesti različite etiologije i simptomatologije. To su sljedeće bolesti:

1. **Botriosferijska sušenja vinove loze** (uzročnici gljive iz porodice Botryosphaeriaceae)
2. **Crna noga vinove loze** (uzročnici gljive iz roda *Cylindrocarpon*)
3. **Eutipoza vinove loze** (uzročnici gljive iz roda *Eutypa*)
4. **Eska vinove loze** (uzročnici gljive iz rodova *Phaeomoniella, Phaeoacremonium* i *Fomitiporia*)
5. **Petrijeva bolest vinove loze** (uzročnik *Phaeomoniella chlamydospora)*
6. **Fomopsijska sušenja i odumiranja vinove loze** (uzročnici gljive iz porodice Diaporthaceae).

2.1.1. Botriosferijska sušenja vinove loze

Botryosphaeriaceae obuhvaćaju spektar morfološki raznolikih gljiva koje mogu biti patogeni, endofiti ili saprofiti većinom na drvenastim domaćinima. Nalazimo ih u svim geografskim i klimatskim područjima svijeta. Iz porodice Botryosphaeriaceae poznata su 18 roda i 114 vrsta koji su paraziti biljaka (Phillips i sur., 2013). Najvažniji rodovi iz porodice Botryosphaeriaceae su *Diplodia, Botryosphaeria, Neofusicoccum, Dothiorella* i *Lasiodiplodia* (Ramirez-Suero, i sur., 2014). Nađene vrste prisutne u drvu vinove loze u Hrvatskoj su *Botryosphaeria dothidea, Diplodia seriata, Dothiorella sarmentorum, Lasiodiplodia theobromae, Neofusicoccum parvum*, čija se parazitacija manifestira u obliku simptoma Botriosferijskog sušenja vinove loze, a to su simptomi nekroze drvenastih dijelova biljke, rak rane, izbjeljivanje kore rozgve, odumiranje pupova i mladica, sušenje i propadanje trsova (Kaliterna, 2013).

2.1.2. Crna noga vinove loze

Simptomi se dijele na one koji se pojavljuju u rasadniku i one u vinogradu. Simptomi crne noge na vinovoj lozi u rasadniku obuhvaćaju crna obezbojenja i gumozne inkluzije u korijenu kao i tamno smeđe ili crne pruge u vaskularnom tkivu mladih trsova. Drugi simptomi na korijenu obuhvaćaju smanjenje biomase korijena i korijenovih dlačica sa upalim

nekrotičnim lezijama. Simptomi crne noge na vinovoj lozi u vinogradu obuhvaćaju tamne nekroze debla blizu korijena koja se može proširiti na stablo ali i dublje u korijen. Vrsta koja se povezuje sa crnom nogom vinove loze je *Cylindrocarpon destructans* (Halleen i sur., 2006).

2.1.3. Eutipoza vinove loze

Simptomi bolesti Eutipoze vinove loze čiji je najčešći uzročnik vrsta *Eutypa lata* manifestira se u obliku zakržljalih, cik-cak rasta izboja i odumiranja ogranaka ili cijelih biljaka. Listovi oboljelih izboja su mali, često žuti, uvijenih rubova, smežurani, pjegavi i osušeni na rubovima (Halleen i sur., 2010). Osim vrste *Eutypa lata,* druge vrste iz porodice Diatripaceae kao što su, *Eutypella vitis*, *Diatrype stigma*, *Diatrype whitmanensis*, *Cryptosphaeria pullmanensis*, *Cryptovalsa ampelina*, *Eutypella microtheca*, *Eutypella citricola*, *Dyatripella vulgaris*, *Eutypella leprosa* i druge (Bertsch i sur., 2013). Eutipoza vinove loze poznata je i u Hrvatskoj a uzročnik *Eutypa lata* je jedini koji je sa njom povezan (Cvjetković, 2010).

2.1.4. Eska vinove loze

Eska postaje sve veći problem u zadnja tri desetljeća i danas predstavlja veliku zabrinutost u svim vinskim zemljama (Hofstetter i sur., 2012). Mugnai i sur. (1999) opisuju simptome eske kao kronične i akutne. Kronični se pojavljuju na biljkama starima 8 - 10 godina, unutar debla i debljih grana, u obliku bijele truleži koja postepeno mijenja tvrdo drvo u mekanu, krhku i spužvastu masu. Nekada trulež prilazi i dolazi do površine uzrokujući pukotine na kori, ponekad se razvija ispod mjesta cijepa no nikad na korijenu. Drugi tipovi propadanja drva se mogu pojaviti prije ili uz bijelu trulež; tamne pjege na poprečnom ili pruge na uzdužnom presjeku, rozo smeđe do tamno crveno smeđe površine često se razvijaju iz crnih pjega, u središtu ili na rubu nekrotičnog tkiva. Simptomi na listovima počinju kao svijetlozelene ili klorotične nepravilne pjege između žila ili na rubovima lista. Pjege se šire i spajaju, djelom nekrotiziraju i na kraju ostavljaju uski zeleni dio oko žila. Nekrotični dio poprima prvo žuto-smeđu ili crveno-smeđu boju tzv. „tigrove šare“. U proljeće izboji zaostaju u rastu i lignifikaciji. Početkom ljeta može doći do sušenja izboja ili cijelog ogranka. Na bobicama se mogu razviti sićušne tamno smeđe ili ljubičaste pjege, manje ili više obilno na pokožici bobice. Rjeđe, pjege prekrivaju cijelu bobicu koja poprima smeđu ili sivo - ljubičastu boju. Nadalje, Cvjetković (2010) opisuje mladenačko apoplektično venuće – mladenačka eska, koja se javlja na čokotima starima 1 – 3 godine. Simptomi na listovima

identični su klasičnoj „eski“ no u čokotu izostaje žućkasta trulež spužvaste konzistencije umjesto koje provodne snopove začepljuje masa koja po boji i konzistenciji podsjeća na katran.

Mogućih uzročnika i članova kompleksa „eska“ ima mnogo. Armengol i sur. (2001) i Hofstetter i sur. (2012) suglasni su sa: *Cylindrocarpon* spp., *Fomitiporia* spp. *Phaeoacremonium* spp., *Phaeomoniella* spp i *Stereum hirsutum*.

2.1.5. Petrijeva bolest vinove loze

Petrijeva bolest vinove loze, je propadanje mladih trsova vinove loze uzrokovana vrstama *Phaeomoniella chlamydospora* i *Phaeoacremonium aleophilum*, koja se manifestira u obliku tamnih pruga po uzdužnom presjeku stabla vinove loze (Abreo i sur., 2011).

2.1.6. Fomopsijska sušenja i odumiranje vinove loze

Opasnost fomopsijskog sušenja i odumiranja vinove loze je u perzistentnoj zarazi koja se teško kontrolira a patogena tj. gljiva tijekom tog vremena oslabljuje biljku i dovodi do preranog odumiranja trsa zaražene biljke. Simptomi se očituju u obliku izbjeljivanja rozgve, kora postaje srebrnkasta a piknidi i piknospore na njoj počinju se formirati kada mladice počnu odrvenjavati (Cvjetković, 2010). Najčešće vrste prisutne na vinovoj lozi u Hrvatskoj su: *Phomopsis ampelina, Diaporthe eres i Diaporthe neotheicola* (Kaliterna, 2013), dok su u svijetu, osim *P. ampelina*, značajne i *Diaporthe perjuncta, Diaporthe australafricana, Phomopsis amygdali* i druge (Niekerk i sur., 2005; Schilder i sur., 2005; Amponsah, 2010).

2.1.7. Suvremena istraživanja GTD-a

Novija istraživanja gljiva koje uzrokuju GTD bolesti u velikoj su mjeri povezana s razvojem metoda molekularne biologije (Block i sur., 2013), zbog toga što se navedene metode kod identifikacije patogenih gljiva temelje na informaciji u njihovom genomu tj. u molekuli DNA koja je stabilna i praktički nepromjenjiva (Udayanga i sur., 2011), za razliku od klasičnih metoda identifikacije koje se baziraju na morfološkim osobinama tj. fenotipu ispitivanih gljiva koji je jako varijabilan i ovisi o čimbenicima u okolišu te se smatra manje pouzdanim za identifikaciju gljiva do nižih taksonomskih kategorija, kao što je vrsta (Kepley i sur., 2015; Verkley i sur., 2014).

2.2. Molekularne metode identifikacije gljiva

Molekularne metode identifikacije, kao što je spomenuto u prethodnom pod poglavlju (2.1.7.) su mnogo preciznije jer je informacija sadržana u molekuli DNA. Molekularne metode identifikacije se baziraju na analizi informacija u molekuli DNA korištenjem metoda kao što su PCR, sekvenciranje i bioinformatička obrada (BLAST (eng. Basic local alignment search tool) i filogenetska analiza). Za kvalitetno provođenje navedenih metoda analize DNA, istu je potrebno izolirati iz ispitivanog organizma, te je stoga bilo potrebno razviti različite metode izolacije ukupne genomske DNA iz stanice gljiva od kojih se klasično koriste one pomoću organskih otapala (fenol, kloroform, itd.) i različitih pufera (CTAB pufer, i dr.), a u novije vrijeme i pomoću komercijalnih kitova za izolaciju DNA (Motkova i Vytrasova, 2011; Hallen i sur., 2003). Molekularni markeri koriste se da bi se izolirana DNA „skratila“ na čitljive i interspecijski specifične fragmente DNA, tako je za gljive često korištena regija unutarnje prepisujuće razmaknice ribosomske DNA (eng. Internal Transcribed Spacier, ITS)(Verkley i sur., 2014; Udayanga i sur., 2011; Kepley i sur., 2015), koju Schoch i sur. (2012) nazivaju univerzalnim bar-kodom za gljive, no dok je za identifikaciju većine gljiva dovoljan molekularni marker ITS, drugi molekularni markeri poput, beta tubulina i EF1-α (dio gena translacijskog elongacijskog faktora 1 alfa) se smatraju neophodnima za razlučivanje pripadnika unutar važne porodice uzročnika GTD, porodice Botryosphaeriaceae (Phillips i sur. 2008). Molekularni markeri umnažaju se metodom PCR korištenjem specifičnih početnica, a dobivenom PCR produktu potrebno je utvrditi slijed nukleotida sekvenciranjem. Najčešće korištene metode sekvenciranja su tzv. Sangerova metoda ili u novije vrijeme tzv. „Next Gen“ sekvenciranje (Wikipedia, 2016). Tako dobivene sekvence molekularnih markera podvrgavaju se obradi bioinformatičkim metodama poput metode BLAST (Altschul i sur., 1990) i/ili filogenetske analize na temelju više statističkih metoda poput metode Neighbour Joining (Saitou i Nei, 1987), Maximum Parsimony (Swofford, 2003) i Maximum Likelihood (Takamura i sur., 2004)), a s ciljem njihove usporedbe s odgovarajućim sekvencama referentnih vrsta iz međunarodne banke gena Gen Bank.

2.3. DNA Fingerprinting

Metode DNA fingerprinting se široko koriste za molekularnu karakterizaciju i pomažu u donošenju zaključaka o filogenetskim odnosima organizama (Paplomatas, 2004). Metode se općenito baziraju na uporabi odgovarajućih početnica kao što su GTG5 (Alves i sur., 2004b) i M13 (Berraf-Tebbal i sur., 2011) prilikom metode PCR što rezultira PCR produktom koji se

sastoji od smjese DNA odsječaka različite duljine, odnosno molekularne mase tzv. linija (Hamann i sur., 1995), a dobiven PCR produkt se vizualizira metodom horizontalne gel elektroforeze, a svoju primjenu prvo dobiva u kriminalističkoj forenzici i antropologiji (Jeffreys, 1987; Bieber i sur., 2006). DNA fingerprinting analizira dio genetske informacije, sadržane u nukleinskoj kiselini. Ciljani geni se umnažaju PCR-om, a umnoženi fragmenti se kasnije razdvajaju po veličini ili varijabilnosti sekvence (Ranjard i sur., 2001). Fragmenti DNA, metodom horizontalne elektroforeze, a uz korištenje DNA bojila kao što su su etidij bromid (Adams i sur., 2002) i Gel Red (Biotium, Hayward, CA, USA)(Berraf-Tebbal i sur., 2011). Metode DNA fingerprintinga dizajnirane su da bi omogućile brzu usporedbu uzoraka, identificirajući bilo kakve sličnosti ili razlike u rasporedu ili različitosti linija tj. gena (Valášková i Baldrian, 2009). Soll (2000) uvjetuje efikasan DNA fingerprint sistem koji bi trebao 1) identificirati iste sojeve u različitim izolatima, 2) identificirati mikroevolucijske promjene u soju, 3) grupirati osrednje povezane izolate i 4) identificirati posve nepovezane izolate.

2.3.1. MSP PCR Fingerprint

U konvencionalnom DNK fingerprintingu, hipervarijabilnost i ponovljivost sekvenci (minisateliti ili mikrosateliti DNK) se otkriva pomoću hibridizacijskih sondi tj. početnica. U MSP (MicroSatelite-Primed) pristupu, početnice komplementarne sa mikrosatelitima, tj. tandem nizovima kraktih sekvenca motiva (uglavnom 2-4 nukleotida), služe kao jedna početnica. Ako se ponove komplementarni motivi tj. mikrosateliti unutar udaljenosti koju je moguće prepisati, od jednog do drugog mikrosatelita, sekvence između se umnažaju, što je temelj tzv. tehnika MSP-PCR ili interrepeat PCR (Meyer i sur., 1993). Jedna mikrosatelna početnica (npr. $(CA)_8$, $(CT)_8$, $(GT)_8$, $(GAC)_5$, $(GTG)_5$, $(GACA)_5$ ili $(TGTC)_5$) se često koristi za usmjeravanje umnažanja među-ponavljajućih regija. S druge strane početnica bi se mogla koristiti u vezi sa drugim mikrosatelitnim početnicama. Produkt reakcije ispadnu sekvence od 200 – 3500 parova baza. Jedinstveni i kombinirani MSP-PCR uzorci iako kompleksni, otkrivaju nisku razinu genetske različitosti, tj. razdvaja vrste i daje kompleksne genetske DNA fingerprintove ali ima niski kapacitet za razlikovanje izolata koji u mikologiji često budu klonovi iste jedinke (Alves i sur., 2004b).

Korist ovog pristupa proizlazi iz svoje jednostavnosti, ponovljivosti, visokog broja otkrivenog polimorfizma, male količine potrebnog DNA, brzina i lakoća izvođenja (Abd-Elsalam i sur., 2009). U slučaju ponovljivosti ove metode među laboratorijima, podaci iz

različitih laboratorija mogli bi biti uspoređivani i sakupljani u opću banku podataka (Soll, 2000).

Na temelju pregledane literature doneseni su sljedeći ciljevi istraživanja:

1. Sakupit uzorke drva vinove loze
2. Izolirati gljive u čistu kulturu
3. Grupirati izolate gljiva prema fenotipu (morfološkim i kulturalnim obilježjima) i genotipu (pomoću metode DNA fingerprintinga)
4. Identificirati do razine roda ili vrste (ovisno o njihovom pretpostavljenom značaju kao biljnih patogena) korištenjem molekularne metode bazirane na analizi molekularnih markera ITS i/ili EF1-α i popratne bioinformatilčke analize
5. U ovisnosti o utvrđenim vrstama gljiva donijeti zaključke o mogućoj etiološkoj povezanosti pojedinih utvrđenih vrsta s opaženim simptomima bolesnog drva vinove loze.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Sakupljanje uzoraka drva vinove loze

Tijekom 2013., 2014. i 2015. godine, pregledani su vinogradi na lokalitetima Split, Ilok, Zagreb, Plešivica i Vrgorac. Prikupljeni su uzorci drva vinove loze (stablo, krakovi i rozgva) koji su pokazivali simptome parazitacije gljivama patogenima drva vinove loze. Prikupljeni uzorci su označeni i dopremljeni u laboratorij na obradu.

3.2. Izolacija gljiva u čistu kulturu

Uzorci rozgve vinove loze sa simptomom, izbijeljena kora te pojavom crnih piknida, odrezani su na komade dužine 7-10 cm. Uzorci su oprani pod mlazom vode nakon čega su površinski sterilizirani. Proces površinske sterilizacije obuhvaćao je kupanje fragmenata 10 sekundi u 70 % etanolu nakon čega je slijedilo potapanje u 2 % natrijev hipoklorit (NaHCl) u trajanju od 2 minute, nakon čega su uzorci ispirani u destiliranoj vodi, dva puta po 2 minute. Potom su stavljeni u Petrijevu zdjelicu na vlažan filtar papir na sobnu temperaturu da bi se potaknula pojava piknida i sporulacija. Nakon dva dana inkubacije konidijski eksudat u obliku cirusa prenesen je na hranjivu podlogu PDA (eng. Potato Dextrose Agar) čime je dobiven izolat gljive u čistoj kulturi.

Uzorci stabla i krakova usitnjeni su na manje fragmente simptomatskog drva pomoću vrtlarskih škara čija oštrica je između svakog uzorka sterilizirana 70 % etanolom i plamenom. Fragmenti su površinska sterilizirani na način kako je opisano za uzorke rozgve nakon čega su osušeni u laminaru pomoću strujanja sterilnog zraka. Tako osušeni uzorci su u sterilnim uvjetima laminara nacijepljeni na hranjivu podlogu PDA s dodatkom streptomicin sulfata (50 µg/mL, Krka d.o.o., Slovenija) (PDA-Strep). Nacjepljivanje je provedeno tako da je dio fragmenta drva, na granici bolesnog i zdravog tkiva, prislonjen uz površinu hranjive podloge. Uzorci su inkubirani na 25°C u mraku, a kada su se pojavile hife gljiva, sterilno su precijepljene na novu hranjivu podlogu PDA, čime je dobivena monohifalna čista kultura.

3.3. Analiza i grupiranje izolata prema morfološkim obilježjima spora i kolonija na PDA

Izolatima gljiva analizirana su morfološka obilježja i to obilježja kolonija na PDA (oblik, boja, zračni micelij i brzina rasta kolonija) odnosno obilježja spora (boja, oblik i

veličina). Da bi se potaknula sporulacija izolata, nacijepljeni su na prethodno pripremljene hranjive podloge, tzv. „vodeni agar“ (WA), kojemu su dodane dvostruko autoklavirane grančice komorača (*Foeniculum vulgare*) (WA+foeniculum) ili dvostruko autoklavirane iglice crnog bora (*Pinus nigra*) (WA+pinus) te su kultivirani pri sobnoj temperaturi na laboratorijskoj klupi u trajanju od najmanje tri tjedna. Pri pojavi spora, iste su analizirane svjetlosnim mikroskopom. Kao pomoć prilikom navedenih morfoloških analiza korišteni su determinacijski ključevi i odgovarajuća pomoćna literatura za determinaciju gljiva (Crous i sur. 2009; Richard 1998). Svi izolati, prema sličnosti analiziranih morfološkim obilježjima raspoređeni su u grupe. Iz svake utvrđene grupe izolata odabrani su reprezentativni izolati koji su podvrgnuti daljnjoj identifikaciji molekularnim metodama.

3.4. Analiza izolata gljiva i njihova identifikacija uporabom molekularnih metoda

Da bi se dobila točna slika o taksonomskoj pripadnosti pripadnika svake od grupa izolata dobivenih kako je opisano u poglavlju 3.3., provedena je molekularna identifikacija. Ona se sastojala od analize DNA fingerprint profila izolata metodom MSP-PCR, a za odabrane reprezentativne izolate iz pojedinih izolata, i dodatnom analizom molekularnih markera ITS i/ili EF1-α te popratnim bioinformatičkim analizama. Određeni izolati gljiva, izolirani iz drva vinove loze i identificirani u okviru istraživanja, Kaliterna (2013) korišteni su kao pozitivne kontrole i kao referentni izolati poznatih vrsta gljiva patogena drva vinove loze, te su korišteni za direktnu usporedbu s ispitivanim izolatima u ovom istraživanju. Za potrebe obiju molekularnih analiza, bilo je potrebno izolatima gljiva prvo izolirati ukupnu genomsku DNA.

3.4.1. Izolacija ukupne genomske DNA

Izolati odabrani za analizu molekularnim metodama, kultivirani su na PDA 5 do 7 dana na optimalnoj temperaturi u mraku. Nakon završetka kultivacije, po sedam komadića kolonizirane hranjive podloge, sa samog ruba kolonije, precijepljeno je u Petrijeve zdjelice promjera 9 cm s hranjivom podlogom PDA čija površina je prethodno prekrivena folijom sa mikroporama, te su inkubirani u mračnoj komori na sobnoj temperaturi. Za svaki izolat, sakupljeno je po 50 μg micelija koji je izrastao na površini folije, nakon čega je stavljen u tubice od 2 mL (Eppendorf, AG, Hamburg, Germany).

U svaku od tubica dodano je 50 µg autoklaviranih staklenih kuglica promjera 425-600 µm (Sigma Aldrich, SAD), nakon čega su, kao što je opisano kod Santos i sur. (2009), tubice potopljene u tekući dušik na 5 min pa prebačene na led do sljedećeg koraka. U svaku od tubica dodano je 250 µL fenola (Sigma, Aldrich SAD), 250 µL kloroforma (Kemika, Zagreb) i 500 µL pufera za lizu. Pufer za lizu prethodno je pripremljen, a sadržavao je sljedeće komponente (Sigma-Aldrich, SAD): 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA, 2 % Triton X-100, 1 % SDS i 1 % PVP (dodaje se puferu za lizu neposredno prije uporabe pufera u izolaciji DNA). Tubice s navedenom smjesom vorteksirane su 20 min pri 2000 okretaja u minuti, a potom centrifugirane pri 12500 rpm, 30 minuta. Mikropipetom prikupljeno je 300-400 µL supernatanta koji je sačinjavala vodena faza s otopljenom DNA i RNA te prenijeto u novu tubicu od 1,5 mL gdje su dodatkom jednakog volumena hladnog izopropanola (-20°C)(Kemika, Zagreb), uz blago miješanjem izokretanjem tubica, DNA i RNA oborene iz vodene otopine. Tubice su potom ponovno centrifugirane pri 12500 rpm, 15 min na 4°C, čime se DNA staložila na dna tubica te se mogla vidjeti kao bijeli do svjetlo žuti talog. Supernatant je potom odbačen pažljivim izlijevanjem, a talog je ispran s 1 mL 70 % etanola. Tubice su još jednomu centrifugirane na 12500 rpm, 10 min pri 4°C. Nakon centrifugiranja, supernatan je ponovo uklonjen, a talog je osušen na zraku ili u zračnoj struji sterilne komore do nestanka posljednjih kapljica etanola. Osušeni talog DNA (i RNA) otopljen je u 50 µL TE pufera (pH 8.0, Promega, Madison, SAD) s dodatkom otopine RNaze-A (50µg/mL, Sigma-Aldrich, SAD) i inkubiran na 55°C, 15 min s ciljem razgradnje zaostale RNA.

3.4.2. Analiza DNA fingerprint profila izolata gljiva metodom MSP-PCR

Izolirana ukupna genomska DNA izolata gljiva korištena je u procesu dobivanja specifičnih DNA fingerprint profila metodom MSP-PCR. Temeljem preliminarnih pokusa, od dviju početnica M13 i GTG5, odabrana je početnica M13 zbog toga što su elektroforetski DNA fingerprint profili s početnicom GTG5 bili slabije jasnoće u odnosu na iste dobivene s početnicom M13 (M13: 5' –GAG GGT GGC GGT TCT - 3').

3.4.2.1. MSP-PCR korištenjem početnice M13

Za MSP-PCR je korišten PCR kit Emerald Amp® MAX PCR MasterMix (Takara BIO INC, Japan). Reakcijska smjesa sadržavala je: 12,5 µL PCR reakcijske smjese iz navedenog PCR kita, otopine, 0,8 µL početnice M13 (0,8 µM), 1 % (V/V) dimetil sulfoksida (Merck, Darmstadt, Germany), 2 µL DNA predloška koncentracije 50 ng/µL te vode molekularne

čistoće do konačnog volumena od 25 µL po reakciji. Reakcija umnažanja modificirana je prema Berraf-Tebbal i sur. (2011), a odvijala se u termocikleru Mastercycler (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) pri temperaturama kojih su se vrijednosti i trajanje mijenjali u koracima prema sljedećem redoslijedu: nakon početnog zagrijavanja na 95°C u trajanju od 3 minuta slijedilo je 40 ciklusa umnažanja, od kojih je svaki uključivao prvi korak na 93°C u trajanju od 30 sekundi, drugi korak na 53°C u trajanju od 60 sekundi i treći korak na 72°C u trajanju od 2 minute. Nakon posljednjeg ciklusa umnažanja slijedilo je završno produljenje na 72°C u trajanju od 10 minuta.

3.4.2.2. Horizontalna gel elektroforeza

Produkti PCR reakcije razdvojeni su korištenjem horizontalne gel elektroforeze (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, SAD). Elektroforetsku otopinu i otapalo za pripremu 2 %-tnog agaroznog gela činio je 1x TAE pufera. Elektroforeza se odvijala u električnim polju jačine 80V u trajanju od 4 sata (Abdollahzadeh i sur. 2013). Razvučeni produkti PCR reakcije, tj. DNA fragmenti različitih duljina, činilu su DNA fingerprint profil koji je bilo potrebno vizualizirati bojanjem gela u otopini etidij bromida (0,5 µg/mL) 15 min uz odbojavanje u dH_2O 15 minuta. Gelovi su potom fotografirani pod UV svijetlom transiluminatora (Bio Rad, Laboratories, Inc. UK). Profili su poravnati uporabom Windows alata za obradu slika te međusobno uspoređeni vizualnim pregledom te po potrebi i pomoću softvera PyELPH (http://pyelph.software.informer.com/1.4/) za analizu DNA fingerprint profila te su na temelju navedenoga doneseni zaključci o njihovoj, kako međusobnoj sličnosti tako i sličnosti s DNA fingerprint profilima korištenih referentnih izolata. Doneseni zaključci o sličnostima DNA fingerprint profila dodatno su provjereni i nadopunjeni temeljem podudarnosti DNA fingerprint profila s morfološkim obilježjima pojedinih izolata. Na temelju svega navedenog, neke izolate bilo je moguće identificirati do razine vrste, ili je bilo moguće unutar pojedinih grupa razlučiti pojedine podgrupe izolata koje bi dalje služile za nastavak molekularne identifikacije. Iz navedenih podgrupa u nastavku su odabrani reprezentativni izolati koji su korišteni u analizi molekularnih markera ITS i/ili EF1-α.

3.4.3. Umnažanje molekularnih markera ITS i EF1-α

Iz svake podgrupe izolata koje su dobivene kako je opisano u pod poglavlju 3.4.2.2. odabrani su reprezentativni izolati prema izgledu njihovih DNA fingerprint profila, te su podvrgnuti analizi molekularnih markera ITS i/ili EF1-α s ciljem konačne identifikacije do

taksonomske razine roda ili vrste. Za umnažanje dotičnih molekularnih korišteni su parovi početnica ITS5 / ITS4:
ITS 5: 5' –GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG- 3'
ITS 4: 5' – TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3' (White i sur., 1990).

Odnosno EF1-α F728 / EF1-α R986:
EF1α, 728F: 5' -CAT CGA GAA GTT CGA GAA GG -3'
EF1α, 986R: 5' -TAC TTG AAG GAA CCC TTA CC – 3' (Carbone i Kohn, 1999).

Početnice ITS5 i ITS4 korištene su za svaki od izolata, a njima je umnožena unutarnja prepisujuća razmaknica jezgrine ribosomske DNA uključujući njenu 5.8s regiju (regija genoma unutar raspona ITS1–5.8S–ITS2). Početnice EF1-α F728 i EF1-α R986 služile su za umnažanje dijela gena translacijskog elongacijskog faktora 1 alfa (eng. Translation elongation factor 1-alpha, EF1-α), a korištene su samo za one izolate za koje se sumnjalo da pripadaju gljivama iz porodice Botryosphaeriaceae, što je neophodno za njihovu točnu identifikaciju.
PCR reakcijska smjesa za umnažanje molekularnog markera ITS pripremljena je u vodi molekularne čistoće do volumena od 50 µL, a sadržavala je: 25 µL reakcijske smjese iz PCR kita Emerald Amp® MAX PCR MasterMix (Takara BIO INC, Japan), 1 % DMSO (Merck, Njemačka), 12,5 pmol svake od početnica i 50 ng DNA predloška.
PCR reakcijska smjesa za umnažanje molekularnog markera EF1-α pripremljena je u vodi molekularne čistoće do volumena od 50 µL, a sadržavala je: 25 µL reakcijske smjese iz PCR kita Emerald Amp® MAX PCR MasterMix (Takara BIO INC, Japan), 1 % DMSO(Merck, Njemačka), 12,5 pmol svake od početnica i 50 ng DNA predloška.
Reakcija umnažanja ITS regije odvijala se u termocikleru Mastercycler (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) pri temperaturama kojih su se vrijednosti i trajanje mijenjali u koracima prema sljedećem rasporedu: nakon početnog zagrijavanja na 95°C u trajanju od 10 minuta slijedilo je 35 ciklusa umnažanja, od kojih je svaki uključivao prvi korak na 94°C u trajanju od 30 sekundi, drugi korak na 53°C u trajanju od 30 sekundi i treći korak na 72°C u trajanju od 60 sekundi. Nakon posljednjeg ciklusa umnažanja slijedilo je završno produljenje na 72°C u trajanju od 10 minuta.
Reakcija umnažanja EF1-α regija odvijala se u istom uređaju pri različitim uvjetima reakcije kako slijedi: nakon početnog zagrijavanja na 95°C u trajanju od 3 minuta slijedilo je 35 ciklusa umnažanja, od kojih je svaki uključivao prvi korak na 95°C u trajanju od 30 sekundi, drugi korak na 55°C u trajanju od 30 sekundi i treći korak na 72°C u trajanju od 60 sekundi.

Nakon posljednjeg ciklusa umnažanja slijedilo je završno produljenje na 72°C u trajanju od 5 minuta.

3.4.3.1. Sekvenciranje i bioinformatička analiza molekularnih markera ITS i EF1-α

Produkti PCR reakcija pročišćeni su i sekvencirani u firmi Macrogen (Macrogen Inc. Amsterdam, Nizozemska) korištenjem automatskog sekvencera ABI3730XL (Applied Biosystems, SAD). Obrada dobivenih sekvenci i filogenetska analiza, odrađena je uz pomoć skupa programskih alata MEGA, verzija 6 (Tamura i sur., 2013), te djelomično i programa Bioedit Sequence Alignment Editor za analizu kromatograma. Poravnatim sekvencama pojedinih izolata određene su konsenzus sekvence u smjeru 5' prema 3' te su u tzv. FASTA formatu pohranjene u tekstualnu datoteku. Molekularna identifikacija izolata gljiva provedena je prvo usporedbom konsenzus sekvenci ITS i/ili EF1-α regije pojedinog izolata s odgovarajućim sekvencama referentnih izolata pohranjenih u međunarodnoj bazi podataka GenBank (http://WWW.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). Usporedba je provedena uz pomoć programa BLAST (Basic Logical Alignment Search Tool) na internet adresi http://www.ncbi.nlm.nih.gov/**BLAST**/, a na temelju postotka sličnosti sa odgovarajućim sekvencama referentnih izolatima iz baze podataka GenBank doneseni su zaključci o vjerojatnoj pripadnosti pojedinih izolata određenoj vrsti ili rodu. Za dodatnu analizu dijela izolata provedena je filogenetska analiza konstruiranjem filogenetskih stabala, a korištena je metoda Maximum likelihood. U filogenetsku analizu uključene su odgovarajuće sekvence molekularnih markera ITS i/ili EF1-α referentnih izolata uzetih iz baze podataka GenBank, a njihov popis prikazan je tablicama 1.1, 1.2 i 1.3. U slučaju izolata koji su pripadali u porodicu Botryosphaeriaceae, filogenetska analiza provedena je na kombiniranoj sekvenci ITS + EF1-α dobivenoj spajanjem pojedinačnih sekvenci molekularnih markera ITS i EF1-α pojedinog izolata Kaliterna (2013). Parametri za metodu Maximum Likelihood postavljeni su prema Phillips i sur. (2012), a bili su: „Substitution type“=Nucleotide; „Model/Method“=General time reversable model; „Rates among sites“=Gamma distribution with invariant sites (G+I); „No of discret Gamma categories“=6; Gap/Missing Data treatment“=Complete Deletion; „ML Heuristic Method“=Make Initial Tree Automatically (Default-NJ/BioNJ); „Branch Swap Filtar“=Very strong.

Tablica 1.1. Popis korištenih izolata i pripadajućih ITS sekvenci iz baze podataka GenBank za gljive iz porodice Diaporthaceae.

Vrsta Gljive	***Izolat***	***Biljka domaćin***	***Porijeklo***	***Referenca***	***GenBank broj***
Dp. ambigua	CBS 114015	*Pyrus communis*	Južnoafr. Rep.	Gomes i sur. (2013)	KC343010
Dp. ambigua	CBS 123211	*Foeniculum vulgare*	Portugal	Gomes i sur. (2013)	KC343013
Dp. ampelina	CBS 114867	*Vitis vinifera*	Turska	Gomes i sur. (2013)	KC343017
Dp. ampelina	CBS 267.80	*Vitis vinifera*	Italija	Gomes i sur. (2013)	KC343018
Dp. ampelina	CBS 111888	*Vitis vinifera*	SAD	Gomes i sur. (2013)	KC343016
Dp. ampelina	33R1	*Vitis vinifera*	Hrvatska	Kaliterna(2013)	JQ671052
Dp. ampelina	17R14	*Vitis vinifera*	Hrvatska	Kaliterna(2013)	JQ671052
Dp. ampelina	13R11	*Vitis vinifera*	Hrvatska	Kaliterna(2013)	JQ671033
Dp. ampelina	46R3	*Vitis vinifera*	Hrvatska	Kaliterna(2013)	JQ671033
Dp. ampelina	44R4	*Vitis vinifera*	Hrvatska	Kaliterna(2013)	JQ671041
Dp. ampelina	54R4	*Vitis vinifera*	Hrvatska	Kaliterna(2013)	JQ671041
Dp. ampelina	TMZ7.3	*Vitis vinifera*	Hrvatska	Kaliterna(2013)	JQ671051
Dp. ampelina	43R2	*Vitis vinifera*	Hrvatska	Kaliterna(2013)	JQ671049
Dp. ampelina	4R12	*Vitis vinifera*	Hrvatska	Kaliterna(2013)	JQ671049
Dp. ampelina	LJBK10.2	*Vitis vinifera*	Hrvatska	Kaliterna(2013)	JQ671069
Dp. ampelina	18R13	*Vitis vinifera*	Hrvatska	Kaliterna(2013)	JQ671069
Dp. foeniculaceae	54R1	*Vitis vinifera*	Hrvatska	Kaliterna(2013)	JQ663433
Dp. foeniculaceae	T504	*Vitis vinifera*	Hrvatska	Kaliterna(2013)	JQ663434
Dp. foeniculaceae	CBS 123208	*Foeniculum vulgare*	Portugal	Gomes i sur. (2013)	KC343104
Dp. foeniculaceae	CBS 123209	*Foeniculum vulgare*	Portugal	Gomes i sur. (2013)	KC343105
Dp. foeniculaceae	CBS 187.27	*Camellia sinensis*	Italija	Gomes i sur. (2013)	KC343107
Dp. foeniculaceae	CBS 111553	*Foeniculum vulgare*	Španjolska	Gomes i sur. (2013)	KC343101
Dp. amygdali	CBS 126679	*Prunus dulcis*	Portugal	Gomes i sur. (2013)	KC343022
Dp. amygdali	CBS 111811	*Vitis vinifera*	Južnoafr. Rep.	Gomes i sur. (2013)	KC343019
Dp. australafricana	CBS 111886	*Vitis vinifera*	Australija	Gomes i sur. (2013)	KC343038
Dp. australafricana	CBS 113487	*Vitis vinifera*	Južnoafr. Rep.	Gomes i sur. (2013)	KC343039
Dp. viticola	CBS 113201	*Vitis vinifera*	Portugal	Gomes i sur. (2013)	KC343234
Dp. viticola	CBS 114011	*Vitis vinifera*	Portugal	Gomes i sur. (2013)	KC343235
Dp. eres	CBS 439.82	*Cotoneaster sp.*	Škotska	Gomes i sur. (2013)	KC343090
Dp. eres	CBS 101742	*Fraxinus sp.*	Nizozemska	Gomes i sur. (2013)	KC343073
Dp. eres	CBS 109767	*Acer campestre*	Austrija	Gomes i sur. (2013)	KC343075
Dp. eres	CBS 287.74	*Sorbus aucuparia*	Nizozemska	Gomes i sur. (2013)	KC343084
Dp. eres	*55R1*	*Vitis vinifera*	Hrvatska	Kaliterna(2013)	JQ663438
Dp. eres	*ZVD5.1*	*Vitis vinifera*	Hrvatska	Kaliterna(2013)	JQ663437
Dp. ambigua	CBS 114015	*Pyrus communis*	Južnoafr. Rep.	Gomes i sur. (2013)	KC343010
Dp. ambigua	CBS 123211	*Foeniculum vulgare*	Portugal	Gomes i sur. (2013)	KC343013
Dp. kyushuensis	STE-U 2675	*Vitis vinifera*	Tajvan	Mostert i sur. (2001)	AF230749
Dp. novem	*CBS 127270*	*Glycine max*	*Hrvatska*	Gomes i sur. (2013)	KC343156
Dp. helianthi	CBS 592.81	*Helianthus annuus*	Srbija	Gomes i sur. (2013)	KC343115
Dp. helianthi	CBS 344.94	*Helianthus annuus*	Nizozemska	Gomes i sur. (2013)	KC343114
Diaporthella corylina	CBS 121124[b]	*Corylus sp.*	Kina	Gomes i sur. (2013)	KC343004

Podcrtani izolati odabrani su kao vanjska grupa.

Tablica 1.2. Popis korištenih izolata i pripadajućih ITS sekvenci iz baze podataka GenBank za gljive iz porodice Bothryiosphaeriaceae.

Vrsta gljive	**Izolat**	**Biljka domaćin**	**Porijeklo**	**Referenca**	**GenBank ITS**	**GenBank EF1a**
D. seriata	T256	*Vitis vinifera*	Hrvatska	Kaliterna(2013)	KF923332	KF923337
D. seriata	T67	*Vitis vinifera*	Hrvatska	Kaliterna(2013)	KF923336	KF923340
D. seriata	T89	*Vitis vinifera*	Hrvatska	Kaliterna(2013)	KF923335	KF923339
D. seriata	T331	*Vitis vinifera*	Hrvatska	Kaliterna(2013)	KF923334	KF923338
D. seriata	**CAP205**	*Olea europaea*	Italija	Lazzizera i sur. (2008)	EU392289	EU392266
D. seriata	**CAP220**	*Olea europaea*	Italija	Lazzizera i sur. (2008)	EU392294	EU392271
D. scrobiculata	**CBS113423**	*Pinus greggii*	Meksiko	Alves i sur. (2006)	DQ458900	DQ458885
D. scrobiculata	**CBS109944**	*Pinus greggii*	Meksiko	Alves i sur. (2006)	DQ458899	DQ458884
D. bulgarica	**IRAN1530C**	*Malus domestica*	Iran	Phillips i sur. (2012)	JX152582	JX152578
D. bulgarica	**IRAN1548C**	*Malus domestica*	Iran	Phillips i sur. (2012)	JX152584	JX152580
D. rosulata	CBS116470	*Prunus africana*	Etiopija	Phillips i sur. (2008)	EU430265	E U 4 30267
D. rosulata	**CBS116472**	*Prunus africana*	Etiopija	Phillips i sur. (2008)	EU430266	EU430268
D. mutilla	**CBS230.30**	*Phoenix dactylifera*	USA	Phillips i sur.(2008)	DQ458886	DQ458869
D. mutilla	**CBS112553**	*Vitis vinifera*	Portugal	Phillips i sur.(2008)	AY259093	AY573219
D. cipressi	**CBS 261.85**	*Cupressus sempervirens*	Izrael	Alves i sur. (2006)	DQ458894	DQ458879
D. pinea	**CBS 393.84**	*Pinus nigra*	Nizozemska	Alves i sur. (2006)	DQ458895	DQ458880
D. pinea	**CBS 109725**	*Pinus patula*	Indonezija	Alves i sur. (2006)	DQ458896	DQ458881
D. africana	**CBS 120835**	*Prunus persica*	Južnoafr. Rep.	Damm i sur. (2007)	EF445343	EF445382
D. africana	CBS 121104	*Prunus persica*	Južnoafr. Rep.	Damm i sur. (2007)	EF445344	EF445383
D. malorum	**CBS 124130**	*Malus sylvestris*	Bugarska	Phillips i sur. (2012)	GQ923865	GQ923833
D. malorum	CBS 124253	*Malus sylvestris*	Portugal	Phillips i sur. (2012)	GQ923867	GQ923835
D. intermedia	CBS 112556	*Malus sylvestris*	Portugal	Phillips i sur. (2012)	AY259096	GQ923851
D. intermedia	IRAN1559C	-	Iran	Phillips i sur. (2012)	JX152585	JX152581
D. pseudoseriata	**UY107**	*Myrcianthes cisplatensis*	Urugvaj	Perez i sur. (2010)	EU080914	EU863178
D. pseudoseriata	**CBS124907**	*Hexachlamis edulis*	Urugvaj	Perez i sur. (2010)	EU080922	EU863179
D. pseudoseriata	**UY1263**	*Myrciaria tenella*	Urugvaj	Perez i sur. (2010)	EU080933	EU863182
D. alatafructa	**CBS 124932**	*Pterocarpus angolensis*	Južnoafr. Rep.	Mehl i sur. (2011)	FJ888461	FJ888445
D. alatafructa	**CBS 124933**	*Pterocarpus angolensis*	Južnoafr. Rep.	Mehl i sur. (2011)	FJ888478	FJ888446
B. rhodina	**CBS 164.96**	-	Nova Gvineja	Phillips i sur. (2005)	AY640255	AY640258
L. theobromae	**CBS 124.13**	-	SAD	Alves i sur. (2006)	DQ458890	DQ458875

Podcrtani izolati odabrani su kao vanjska grupa.

Tablica 1.3. Popis korištenih izolata i pripadajućih ITS sekvenci iz baze podataka GenBank za gljive iz porodice Valsaceae (1/2).

Vrsta gljive	izolat	Biljka domaćin	porijeklo	referenca	GenBank ITS
C. schulzeri	256-1	*Malus pumila*	Kurdistan	Fotouhifar i sur. (2010)	EF447397
C. schulzeri	56	*Malus pumila*	Zapadni Azerbejđan	Fotouhifar i sur. (2010)	EF447390
C. schulzeri	167-1	*Crataegus pseudoheterophylla*	Farski otoci	Fotouhifar i sur. (2010)	EF447395
C. schulzeri	319	*Malus pumila*	Razavi Khorasan	Fotouhifar i sur. (2010)	EF447400
C. schulzeri	143	*Colutea sp.*	Farski otoci	Fotouhifar i sur. (2010)	EF447393
C. succulus	246-1	*Pyrus communis*	Kermanshah	Fotouhifar i sur. (2010)	EF447389
V. ceratosperma	246	*Pyrus communis*	Kermanshah	Fotouhifar i sur. (2010)	EF447409
C. kantschavelii	287-2	*Populus deltoides*	Hamadan	Fotouhifar i sur. (2010)	EF447367
V. salicina	257	*Salix excelsa*	Kurdistan	Fotouhifar i sur. (2010)	EF447417
V. salicina	257-1	*Salix excelsa*	Kurdistan	Fotouhifar i sur. (2010)	EF447364
V. salicina	138-1	*Populus alba*	Farski otoci	Fotouhifar i sur. (2010)	EF447363
V. ambiens-subsp. Ambiens	295	*Robinia pseudoacacia*	Hamadan	Fotouhifar i sur. (2010)	EF447371
C. rosarum	218	*Rosa canina*	Lorestan	Fotouhifar i sur. (2010)	EF447387
V. ambiens-subsp. Ambiens	264	*Amygdalus communis*	Kurdistan	Fotouhifar i sur. (2010)	EF447369
V. ambiens-subsp. Ambiens	279-2	*Juglans regia*	Kurdistan	Fotouhifar i sur. (2010)	EF447370
C. intermedia	171	*Quercus brantii*	Farski otoci	Fotouhifar i sur. (2010)	EF447366
V. sordida	54	*Salix aegyptiaca*	Zapadni Azerbejđan	Fotouhifar i sur. (2010)	EF447418
C. aurora	50	*Salix aegyptiaca*	Zapadni Azerbejđan	Fotouhifar i sur. (2010)	EF447307
C. chrysosperma	226	*Armeniaca vulgaris*	Lorestan	Fotouhifar i sur. (2010)	EF447323
C. chrysosperma	331	*Olea sativa*	Mazandaran	Fotouhifar i sur. (2010)	EF447338
C. chrysosperma	225	*Robinia pseudoacacia*	Lorestan	Fotouhifar i sur. (2010)	EF447322
C. chrysosperma	304	*Malus pumila*	Hamadan	Fotouhifar i sur. (2010)	EF447331
C. chrysosperma	184	*Salix sp.*	Farski otoci	Fotouhifar i sur. (2010)	EF447317
C. chrysosperma	321	*Platanus orientalis*	Razavi Khorasan	Fotouhifar i sur. (2010)	EF447337
C. chrysosperma	215	*Ligustrum latifolium*	Lorestan	Fotouhifar i sur. (2010)	EF447320
V. ceratosperma	287	*Populus deltoides*	Hamadan	Fotouhifar i sur. (2010)	EF447410
L. persoonii	313	*Rosa canina*	Razavi Khorasan	Fotouhifar i sur. (2010)	EF447376
L. persoonii	209-2	*Vitis vinifera*	Markazi	Fotouhifar i sur. (2010)	EF447373
L. persoonii	198	*Persica vulgaris*	Markazi	Fotouhifar i sur. (2010)	EF447372
L. persoonii	216-2	*Armeniaca vulgaris*	Kurdistan	Fotouhifar i sur. (2010)	EF447374
L. persoonii	261	*Armeniaca vulgaris*	Lorestan	Fotouhifar i sur. (2010)	EF447375
C. translucens	35	*Celtis australis*	Istični Azerbejđan	Fotouhifar i sur. (2010)	EF447403
C. translucens	138-2	*Populus alba*	Farski otoci	Fotouhifar i sur. (2010)	EF447404
C. translucens		*Salix sp.*	Švicarska	Fotouhifar i sur. (2010)	AF191182
V. cipri strain	CBS 118555	*Olea europaea*	Južna Afrika	Fotouhifar i sur. (2010)	DQ243790
V. cipri	163	*Morus alba*	Farski otoci	Fotouhifar i sur. (2010)	EF447411
C. nivea	99	*Populus deltoides*	Chaharmahaal i Bakhtiari	Fotouhifar i sur. (2010)	EF447377
C. cincta	147	*Malus pumila*	Farski otoci	Fotouhifar i sur. (2010)	EF447348
C. cincta	209-1	*Vitis vinifera*	Markazi	Fotouhifar i sur. (2010)	EF447354

Tablica 1.3. Nastavak sa predhodne stranice (2/2).

C. cincta	292-1	*Armeniaca vulgaris*	Hamadan	Fotouhifar i sur. (2010)	EF447360
C. cincta	156-1	*Malus pumila*	Farski otoci	Fotouhifar i sur. (2010)	EF447351
C. cincta	155	*Juglans regia*	Farski otoci	Fotouhifar i sur. (2010)	EF447350
C. cincta	37	*Amygdalus communis*	Istični Azerbejđan	Fotouhifar i sur. (2010)	EF447344
C. cincta	329	*Crataegus azarolus*	Semnan	Fotouhifar i sur. (2010)	EF447362
C. cincta	270-1	*Cydonia oblonga*	Kurdistan	Fotouhifar i sur. (2010)	EF447358
L. cinctum	156	*Malus pumila*	Farski otoci	Fotouhifar i sur. (2010)	EF447405
C. sacchari	125	*Saccharum officinarum*	Khuzestan	Fotouhifar i sur. (2010)	EF447388
C. sacchari		*Saccharum officinarum*	Taiwan	Fotouhifar i sur. (2010)	DQ996044
Cytospora pruinosa	163-1	*Morus alba*	Farski otoci	Fotouhifar i sur. (2010)	EF447379
Cytospora pruinosa	239	*Fraxinus excelsior*	Kermanshah	Fotouhifar i sur. (2010)	EF447380
Cytospora pruinosa	271	*Fraxinus excelsior*	Kurdistan	Fotouhifar i sur. (2010)	EF447381
C. atrocirrhata	81	*Populus nigra*	Zanjan	Fotouhifar i sur. (2010)	EF447306
C. atrocirrhata	22	*Salix excelsa*	Ardabil	Fotouhifar i sur. (2010)	EF447305
Phomopsis vaccinii	ATCC 18451	*Vaccinium macrocarpon*	Wisconsin	Fotouhifar i sur. (2010)	AF317579

Podcrtani izolati odabrani su kao vanjska grupa.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Sakupljanje uzoraka drva vinove loze i izolacija gljiva u čistu kulturu

Tijekom 2013., 2014. i 2015. godine na pregledanih pet lokaliteta iz 3 vinogradarske regije Republike Hrvatske, ukupno je sakupljeno 68 uzoraka drva vinove loze koji su pokazivali simptome bolesti drva vinove loze, i to nekroze drva, rak rane i izbjeljivanje rozgve. Iz navedenih uzoraka izolirano je ukupno 244 izolata gljiva (Tablica 2.). Istovjetne vrste izolirane iz jednog uzorka na jednom od lokaliteta, tretirane su kao jedan nalaz dotične vrste u tom uzorku.

Tablica 2. Pregled broja sakupljenih uzoraka i izoliranih izolata gljiva po lokalitetu iz tri vinogradarske regije Hrvatske.

Vinogradarska regija	Lokalitet	Broj uzoraka	Broj izolata
Istočna kontinentalna Hrvatska	Ilok	20	121
Zapadna kontinentalna Hrvatska	Plešivica	8	23
	Zagreb	7	16
Primorska Hrvatska	Vrgorac	17	33
	Split	16	39

4.2. Analiza i grupiranje izolata prema morfološkim obilježjima

Na temelju analize morfoloških obilježja izolata korištenjem identifikacijskih ključeva za determinaciju gljiva Richard (1998) te i opisa kod različitih autora (Kaliterna i sur., 2011; Kaliterna, 2013; Gomes i sur., 2013; Urbez-Torres, 2011; Crous i sur., 2009; Adams i sur., 2005) svi izolati su podijeljeni u 3 grupe: Grupa 1- Botryosphaeriaceae (67 –izolata), Grupa 2- Diaporthaceae (83 –izolata) i Grupa 3- Ostale (94 –izolata).

Izolate iz Grupe 1- Botryosphaeriaceae karakterizirale su brzorastuće kolonije, na naličju Petrijeve zdjelice kolonije stare do oko 7 dana bile su maslinasto zelene boje, a potom tamno modre do crne boje. Kolonije je karakterizirao gusti zračnim micelij koji je nekada dodirivao poklopac Petrijeve zdjelice. Konidije, koje su se formirale na hranjivim podlogama WA-Faeniculum i WA-Pinus, ali tek iznimno i na PDA, su bile relativno velike, bezbojne ili smeđe pigmentirane, sa ili bez septi.

Izolate iz Grupe 2- Diaporthaceae karakterizirale su relativno sporastuće kolonije sa slabo do srednje razvijenim zračnim micelijem, bijele do žuto-bijele ili bijelo-sive boje s vidljivim zonama rasta, a na hranjivoj podlozi PDA javljale su se stromatične strukture na kojima su se formirali piknidi s cirusima ili kapljicama eksudata.

U Grupu 3- Ostale grupirani su svi oni izolati koji se svojim morfološkim karakteristikama nisu mogli svrstati u jednu od prethodnih dviju grupa.

Iz navedenih grupa odabrani su reprezentativni izolati koji su potom podvrgnuti daljnjim molekularnim metodama identifikacije uz iznimku izolata iz podgrupe *Neofusiccocum parvum* koje je bilo moguće pouzdano identificirati samo na temelju morfoloških karakteristika (vidi poglavlje 4.3.1.1. str 20).

4.3. Identifikacija izolata molekularnim metodama

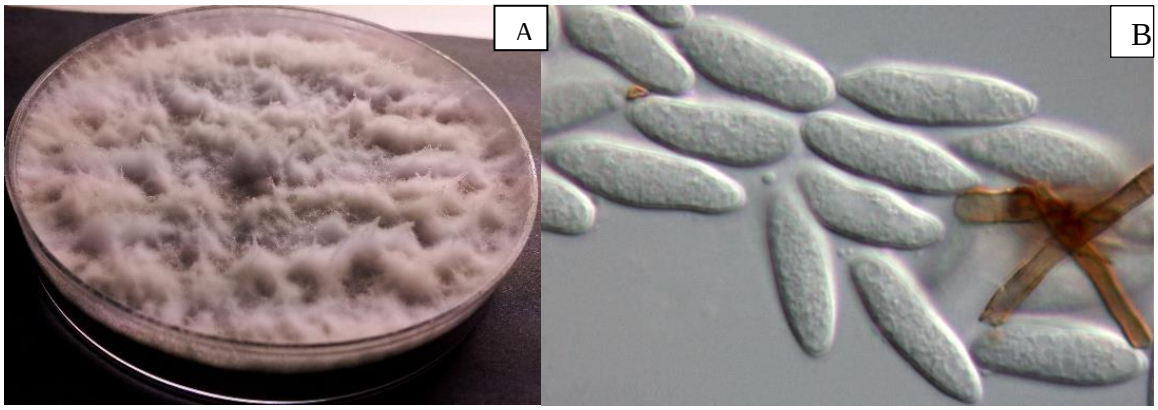
Reprezentativnim izolatima iz triju grupa, analizirani su DNA fingerprint profili dobiveni metodom MSP-PCR na temelju čega je bilo moguće sve izolate iz navedenih grupa podijeliti u podgrupe. Izolate iz četiriju podgrupa bilo je moguće identificirati do razine vrste budući su se njihovi DNA fingerprint profili podudarali s profilima referentnih izolata otprije identificiranih vrsta (vidi str. 9., podpoglavlje 3.4 u Materijalima i metodama). Analiza sličnosti DNA fingerprint profila izolata iz različitih podgrupa pokazala je da su ti profili konzistentni s opaženim morfološkim karakteristikama dotičnih izolata. Također, tijekom navedene analize unutar DNA fingerprint profila utvrđeno je postojanje varijabilnosti u položaju i intenzitetu dijela linija, koja je vizualnom procjenom, a po potrebi i uz pomoć softverskog alata PyElph, procijenjena na 10 – 20 % (rezultati nisu prikazani). Navedena varijabilnost pripisana je intraspecijskoj varijaciji izolata unutar pojedinih podgrupa odnosno utvrđena podudarnost linija od 80 % i više, uzimana je kao zadovoljavajuća potvrda pripadnosti pojedinoj podgrupi (Alves i sur. 2007).

Između izolata iz podgrupa koje nisu uključivale referentne izolata otprije identificiranih vrsta, odabrani su reprezentativni izolati kojima su dodatno analizirani molekularni markeri ITS i/ili EF1-α. Izuzetak su izolati iz podgrupa *Diplodia mutila* i *Phomopsis ampelina* kojima je po jedan izolat također podvrgnut analizi molekularnih markera s ciljem dodatne potvrde njihovog taksonomskog statusa.

4.3.1. Molekularna identifikacija izolata iz Grupe 1 –Botryosphaeriaceae

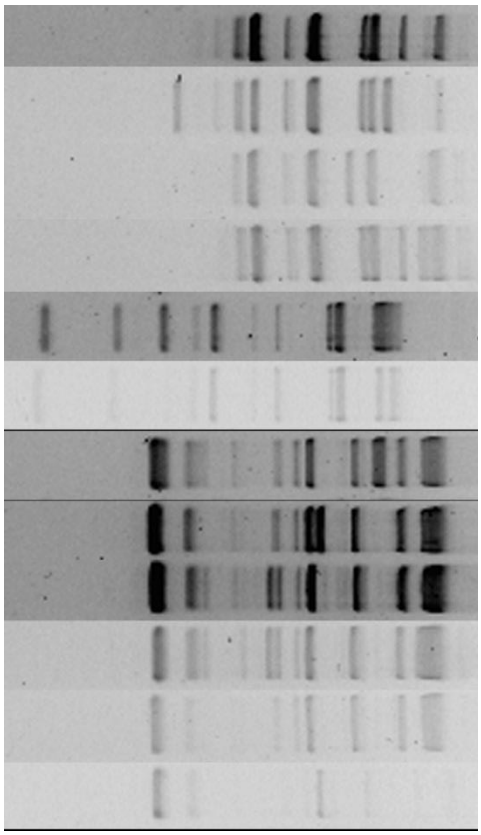
4.3.1.1. Podgrupa *N. parvum*

Od ukupnog broja izolata gljiva u ovom istraživanju, za njih 14 iz Grupe 1 koji su sakupljeni na lokalitetu Split, odnosno istom lokalitetu na kojem je Kaliterna (2013) dokazao prisustvo gljive *Neofusicoccum parvum* u drvu vinove loze, pokazalo se da se u potpunosti podudaraju prema morfološkim karakteristikama kolonija i spora s opisima za *N. parvum* iz dotičnog istraživanja. Zbog činjenice da u Hrvatskoj do sada na vinovoj lozi nije pronađena nijedna vrsta iz roda *Neofusicoccum* koja bi zbog sličnog fenotipa mogla biti zamijenjena s vrstom *N. parvum*, a i osobito zato što se radi o manjem, već istraženom lokalitetu, zaključeno je da u navedenom slučaju neće biti potrebna molekularna identifikacija, te da navedenih 14 izolata sačinjava jednu homogenu podgrupu unutar Grupe 1 i pripada vrsti *N. parvum* (Slika 1.)



Slika 1. Kolonija na PDA (A) i konidije (B) vrste *N. parvum.*

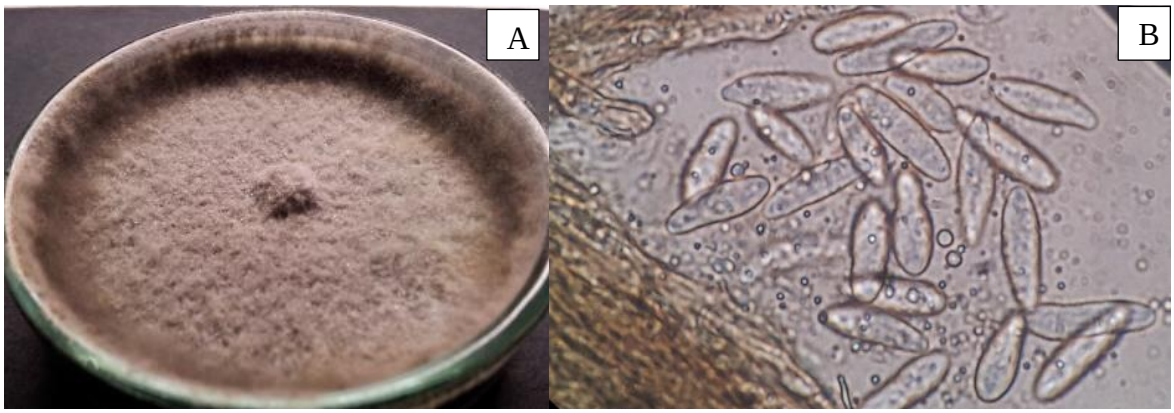
Vrsta *N. parvum* u svijetu je poznati i vrlo virulentan patogen vinove loze (Urbez-Torres, 2011). Od svih uzorkovanih lokaliteta u ovom istraživanju, *N. parvum* izoliran je samo na lokalitetu Split i to iz većine uzoraka drva. Zbog relativno malog broja uzorkovanih lokaliteta u ovom istraživanju ne mogu se donositi ozbiljni zaključci o rasprostranjenosti vrste *N. parvum* u Hrvatskoj, ali ovaj nalaz potvrda je opažanju iz istraživanja Kaliterne (2013) koje rasprostranjenost vrste *N. parvum* u Hrvatskoj karakterizira kao neujednačeno i vezanim za lokalna „žarišta“. Svakako je potrebno dodatnim istraživanjima proširiti spoznaje o epidemiologiji ovog važnog patogena na vinovoj lozi u Hrvatskoj.



Slika 2. DNA fingerprint profili izolata iz Grupe 1- Botryosphaeriaceae.

4.3.1.2. Podgrupa *Botryosphaeria dothidea*

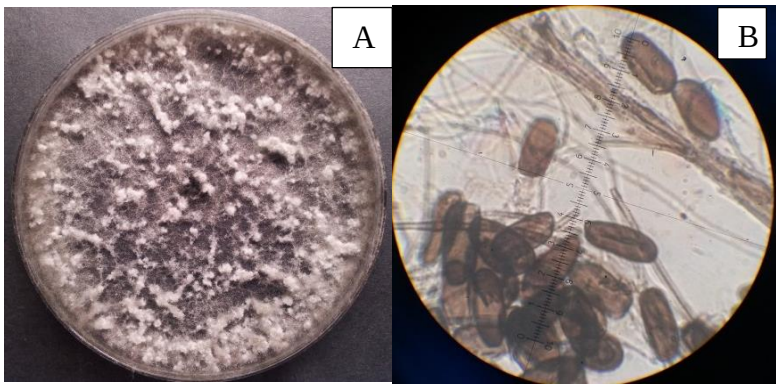
DNA fingerprint profili izolata IL17.1A i IL3.1 iz ovog istraživanja podudarali su se s DNA fingerprint profilima izolata T232, T89, T331 i T318 koji su prema Kaliterni (2013) referentni izolati za Hrvatsku za vrstu *Botryosphaeria dothidea*. Navedenom podudarnošću dokazana je pripadnost izolata IL17.1A i IL3.1 podgrupi, odnosno vrsti *B. dothidea* (Slika 2.) Također, svojim morfološkim karakteristikama, izolati IL17.1A i IL3.1 su odgovarali opisima ove vrste kod Phillips-a (2002) i Kaliterne (2013)(Slika 3.). *Botryosphaeria dothidea* poznata je u svijetu kao srednje jaki patogen vinove loze (Urbez-Torres, 2011; Phillips i sur., 2013; Kaliterna, 2013). U ovom istraživanju, izolati ove vrste izolirani su samo na jednom lokalitetu (Vrgorac 1), a prethodno je ovu vrstu na vinovoj lozi, također u Vrgoračkom vinogorju pronašao Kaliterna (2013).



Slika 3. Kolonija na PDA (A) i spore (B) gljive *B. dothidea*.

4.3.1.3. Podgrupa *Diplodia seriata*

DNA fingerprint profil izolata VL4 iz ovog istraživanja podudarao se s DNA fingerprint profilima izolata CBS 116741, T87 i T301, koji su prema Kaliterni (2013) referentni za vrstu *D. seriata* u Hrvatskoj. Time je dokazana pripadnost dotičnog izolata podgrupi, odnosno vrsti *D. seriata* (Slika 2.). Morfološkim karakteristikama izolat VL4 bio je također konzistentan s opisima drugih autora (Chebil i sur. 2014; Urebez-Torres, 2011) (Slika 4.). *Diplodia seriata* poznati je patogen vinove loze u svijetu (Phillips i sur., 2013, Ammad i sur., 2014), a po virulentnosti ga svrstavaju u slabe do srednje jake patogene, a također i kao patogene slabosti (Urbez-Torres, 2011; Kaliterna, 2013). U ovom istraživanju, izolati ove vrste izolirani su sa svih lokaliteta osim Plešivice, a u svijetu i Hrvatskoj ovo je također najzastupljenija vrsta iz porodice Botryosphaeriaceae na vinovoj lozi (Urbez-Torres, 2011; Kaliterna, 2013).

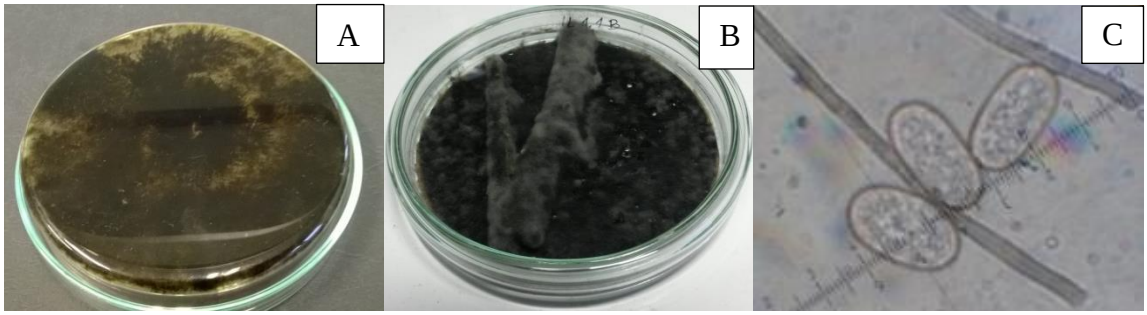


Slika 4. Kolonije na PDA (A) i na WA+Foeniculum (B) vrste *Diplodia seriata*.

4.3.1.4. Podgrupa *Diplodia mutila*

DNA fingerprint profil izolata IL1.1b iz ovog istraživanja podudarao se s DNA fingerprint profilom referentnog izolata za vrstu *D. mutila* iz banke gena CBS 230.30 (Phillips i sur. 2012). Time je dokazana pripadnost dotičnog izolata podgrupi, odnosno vrsti *D. mutila*

(Slika 2.). Morfološke karakteristike izolata IL1.1b bile su u skladu s opisima referentnih izolata za vrstu *D. mutila* (Slika 5.) (Alves i sur. 2004a; Abdollahzadeh i sur. 2012; Phillips i sur. 2013). *Diplodia mutila* poznata je vrsta na vinovoj lozi u svijetu, manje je zastupljena od vrsta *D. seriata, B. dothidea* i *N. parvum*, a po virulentnosti spada u srednje jake patogene (Urbez-Torres, 2011). U ovom radu, izolat IL1.1b predstavlja prvi nalaz vrste *D. mutila* na vinovoj lozi u Hrvatskoj, te je s ciljem dodatne molekularne karakterizacije navedenog izolata provedena dodatna analiza molekularnih markera ITS i EF1-a.

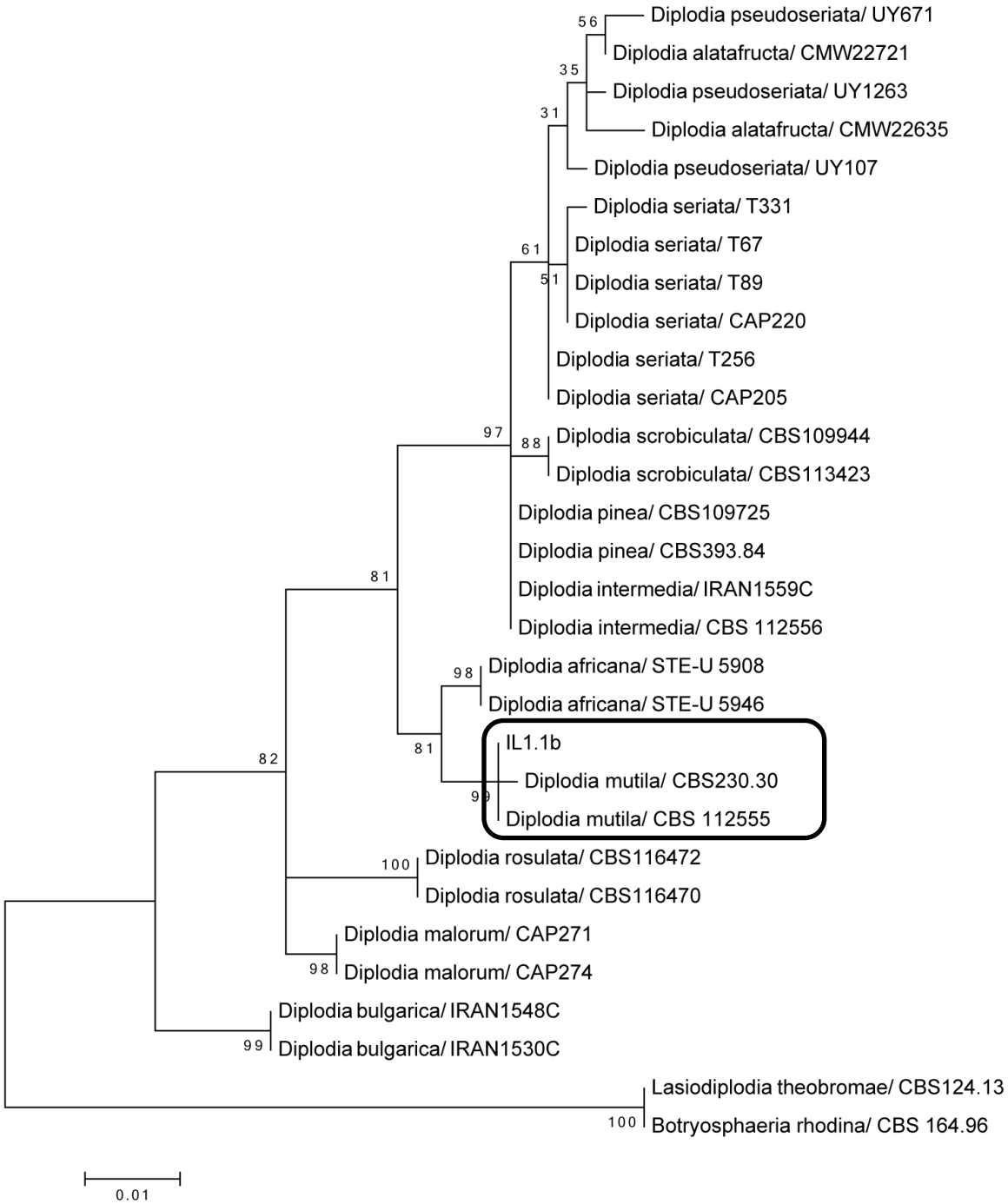


Slika 5. Naličje kolonije na PDA (A) kolonija na WA-foeniculum(B), konidije (C) vrste D. mutila.

U okviru navedene analize, produkt PCR-a s početnicama ITS5 i ITS4 bila je ITS sekvenca od 542 parova baza, s postotkom homologije od 98 % s odgovarajućom sekvencom referentnog izolata za vrstu *D. mutila* CBS 112553 (GenBank AY259093). Produkt PCR-a s početnicama EF1a-728F i EF1a-986R bila je EF1a sekvenca od 271 parova baza, identična odgovarajućoj sekvenci navedenog referentnog izolata CBS112553 (GenBank AY573219.1). Visok stupanj homologije izolata IL1.1b s navedenim referentnim izolatom za vrstu *D. mutila* potvrdio je rezultat identifikacije na temelju analize njegovog DNA fingerprint profila.

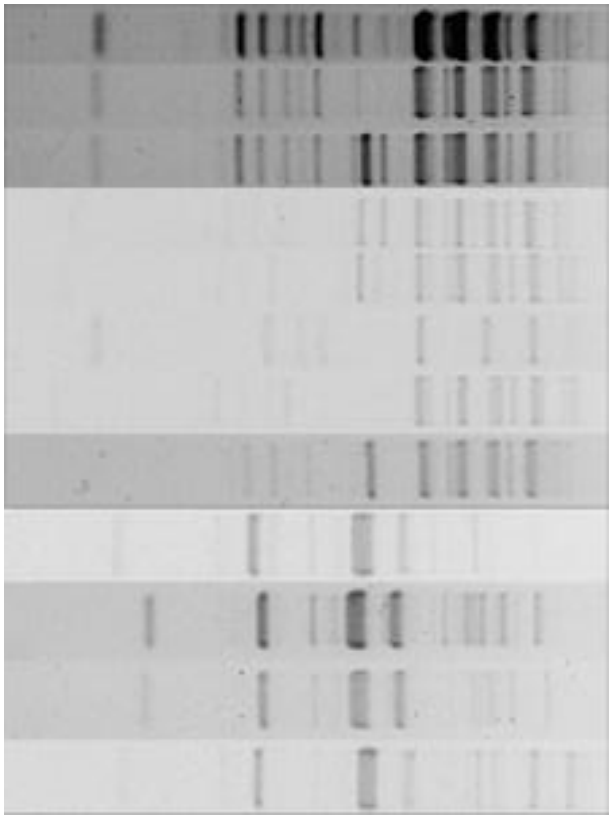
U svrhu konačne potvrde taksonomske pripadnosti izolata IL1.1b, provedena je filogenetska analiza njegove kombinirane ITS i EF1-α sekvence pri čemu je navedena sekvenca uspoređena s odgovarajućim ITS+EF1-α sekvencama referentnih izolata vrsta iz roda *Diplodia*, ranije nađenima na vinovoj lozi u svijetu i/ili Hrvatskoj. Rezultat filogenetske analize, bilo je jedno filogenetsko stablo (Slika 6.) na kojem se vidi da se izolat IL1.1b grupirao s izolatima za vrstu *Diplodia mutila* u dobro podržanom ogranku s bootstrap vrijednošću od 99 %, čime je potvrđen raniji zaključak da navedeni izolat doista pripada vrsti *Diplodia mutila*. U Europi ova je vrsta utvrđena još na vinovoj lozi u Portugalu i Mađarskoj (Urbez-Torres, 2011), ali nije pronađena u Hrvatskoj u istraživanju Kaliterne (2013), no autor je sugerirao da je za nalaz vjerojatno potrebno povećati broj ukupno analiziranih uzorka u

Hrvatskoj, što je ovim istraživanjem potvrđeno. Kako bi se ovaj prvi nalaz vrste *D. mutila* na vinovoj lozi u Hrvatskoj moga objaviti u znanstvenim časopisima kao „First report“, potrebno je dodatno provesti i testove patogenosti s izolatom IL1.1b.



Slika 6. Prikaz filogenetskog stabla dobivenog metodom Maximum likelihood baziranog na analizi poravnatih sekvenci (ITS + EF1-α) izolata LF1.1b i referentnih izolata iz banke gena GenBank za različite vrste iz roda *Diplodia.* Vrsta *Lasiodiplodia theobromae* uzeta je kao vanjska grupa. Brojevi iznad pojedinih ogranaka predstavljaju postotak od 1000 bootstrap ponavljanja.

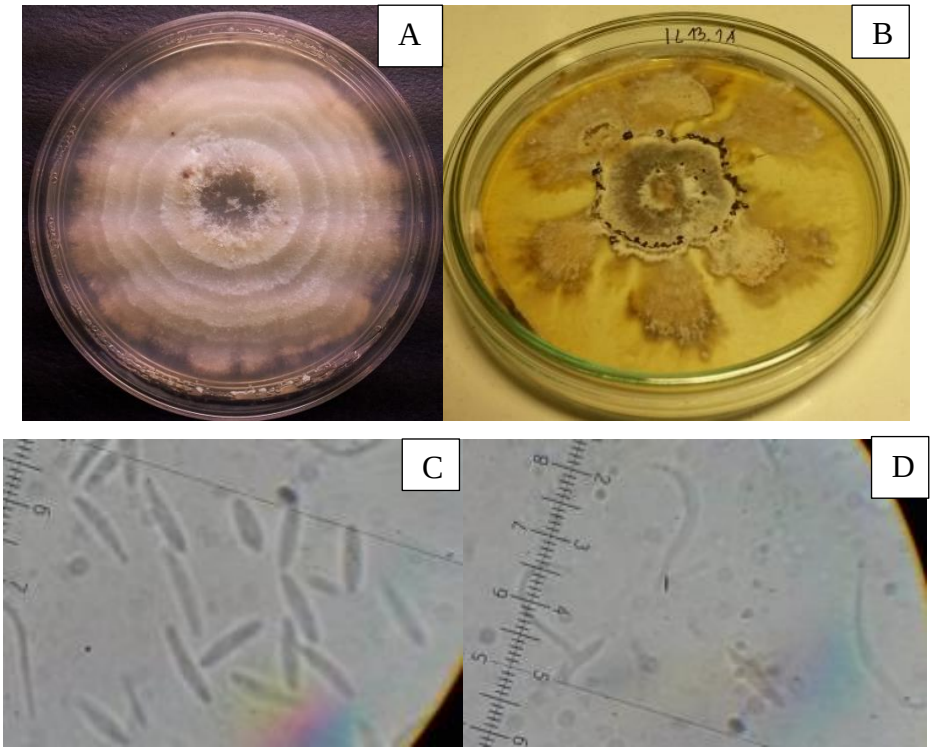
4.3.2. Molekularna identifikacija izolata iz grupe 2- Diaporthaceae



Slika 7. DNA fingerprint profili izolata iz Grupe 2- Diaporthaceae.

4.3.2.1. Podgrupa *Phomopsis ampelina* (sinonim *Phomopsis viticola*)

DNA fingerprint profili izolata VR4b, IL9.2bb, VR2 i IL13.1a iz ovog istraživanja poklapali su se DNA fingerprint profilima referentnih izolata za vrstu *P. ampelina* (sinonim *Phomopsis viticola*) 17R14, 44R4, 46R3 i 4R12 (Slika 7.), koji su uzeti kao referentni za Hrvatsku, a dokazani su u istraživanju Kaliterne (2013). Poklapanjem DNA fingerprint profila dokazane je pripadnost nepoznatih izolata VR4b, IL9.2bb, VR2 i IL13.1a podgrupi za vrstu *P. ampelina*. Također morfološke karakteristike navedenih izolata su se podudarale s opisima izolata vrste *P. ampelina* kod Kaliterne (2013) (Slika 8.). Zbog dodatne provjere njegove taksonomske pripadnosti, izolat IL9.2bb podvrgnut je i analizi molekularnog markera ITS.



Slika 8. Kolonije na PDA (A i B), α konidije (C) i β konidije (D) vrste *P. ampelina.*

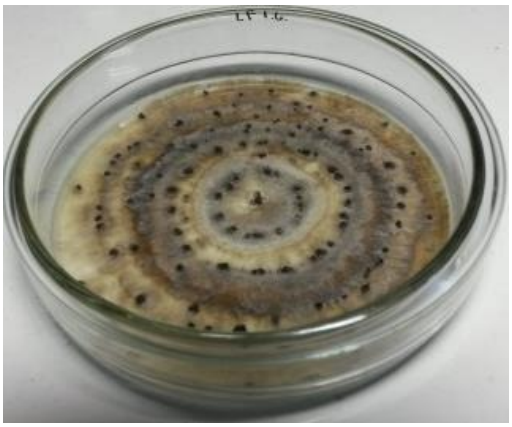
U okviru navedene analize, produkt PCR-a s početnicama ITS5 i ITS4 bila je ITS sekvenca od 568 parova baza, s postotkom homologije od 99 % s odgovarajućom sekvencom referentnog izolata CBS 114016 (GenBank AF230751) za vrstu *P. ampelina*.

Navedena ITS sekvenca uključena je u filogenetsku analizu pri čemu je uspoređena s odgovarajućim ITS sekvencama referentnih izolata različitih vrsta iz roda *Diaporthe/Phomopsis* nađenima na vinovoj lozi u svijetu i Hrvatskoj. Rezultat filogenetske analize bilo je jedno filogenetsko stablo (Slika 10.) na kojem se vidi da se izolat IL9.2bb grupirao s izolatima za vrstu *Phomopsis ampelina* u dobro podržanom ogranku s bootstrap vrijednošću od 100 %, čime je potvrđen raniji zaključak da navedeni izolat doista pripada vrsti *Phomopsis ampelina*.

Vrsta *P. ampelina* prisutna je u svim vinogradarskim regijama svijeta, te je poznati patogen na vinovoj lozi u svijetu (Gomes i sur., 2013; Urbez-Torres, 2013) kao i u Hrvatskoj gdje je utvrđena kao značajni patogen drva vinove loze (Kaliterna i sur., 2012; Kaliterna 2013), stoga ne iznenađuje da je i u ovom istraživanju pronađena na svim lokalitetima (Prilog 1, Tablica 3.).

4.3.2.2. Podgrupa *Diaporthe eres*

DNA fingerprint profili izolata LF2.2, LF3.2, LF1.5 i LF1.1, unutar grupe 2 - Diaporthaceae, formirali su podgrupu jasno odvojenu od podgrupe *Phomopsis ampelina* (Slika 7.). Također i prema morfološkim karakteristikama navedeni izolati nedvojbeno su pripadali rodu *Diaporthe/Phomopsis* (Slika 9.). Iz navedene podgrupe, kao reprezentativan, odabran je izolat LF1.1 koji je podvrgnut analizi molekularnog markera ITS.

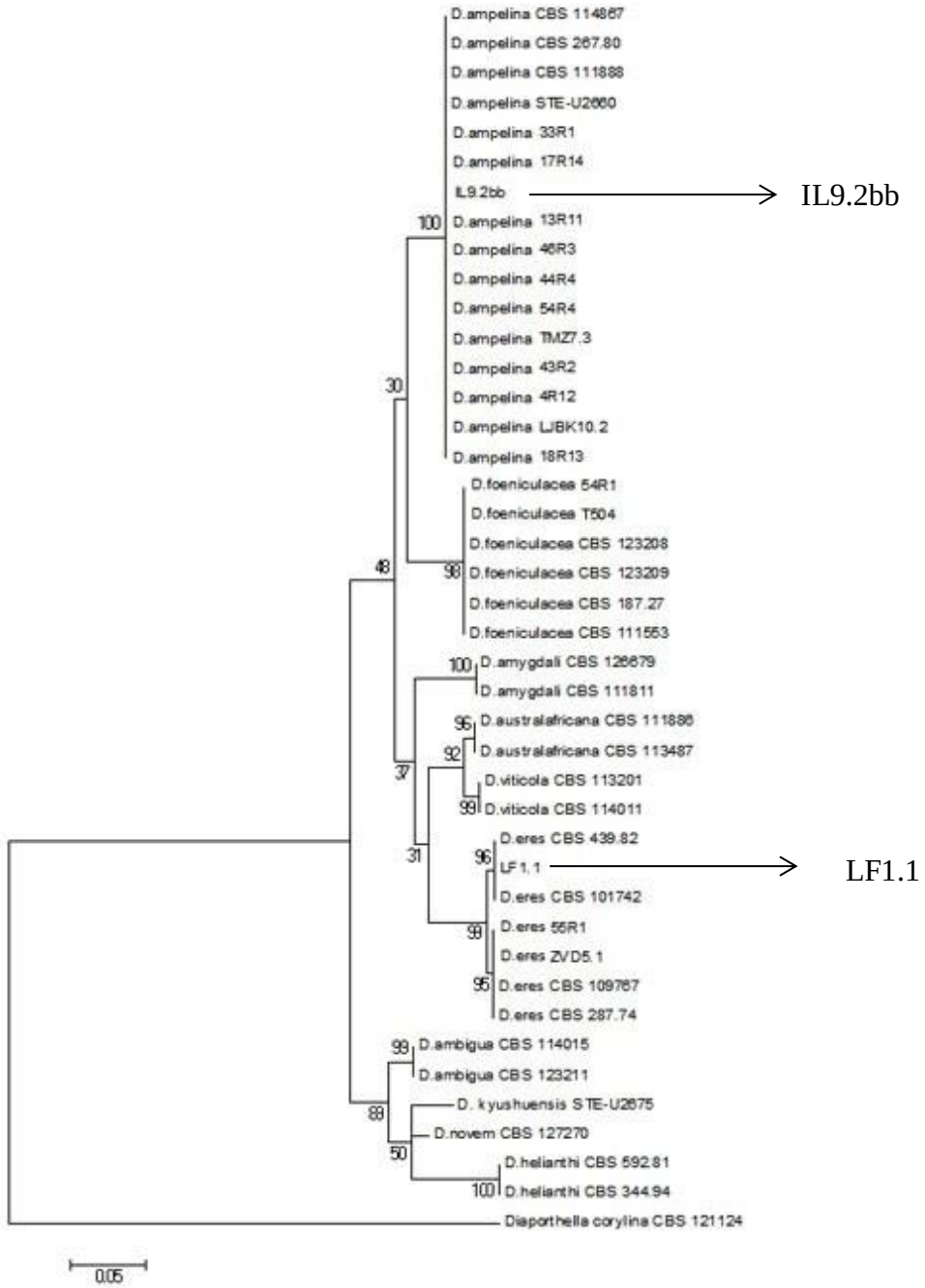


Slika 9. Kolonija vrste *Dp. eres* na PDA.

U okviru navedene analize, produkt PCR-a s početnicama ITS5 i ITS4 bila je ITS sekvenca od 588 parova baza, s postotkom homologije od 99 % s odgovarajućom sekvencom referentnog izolata CBS 109767 (GenBank KC343075.1) za vrstu *Dp. eres*.

Navedena ITS sekvenca izolata LF1.1 uključena je u filogenetsku analizu pri čemu je uspoređena s odgovarajućim ITS sekvencama referentnih izolata različitih vrsta iz roda *Diaporthe/Phomopsis* nađenima na vinovoj lozi u svijetu i Hrvatskoj. Rezultat filogenetske analize bilo je jedno filogenetsko stablo (Slika 10.) na kojem se vidi da se izolat LF1.1 grupirao s izolatima za vrstu *Diaporthe eres* u dobro podržanom ogranku s bootstrap vrijednošću od 99 %. Na temelju ukupne molekularne analize izolata LF2.2, LF3.2, LF1.5 i LF1.1 zaključeno je da oni nedvojbeno pripadaju vrsti *Diaporthe eres.* Kaliterna i sur. (2012), prvi opisuju vrstu *Diaporthe eres* kao patogena vinove loze u Hrvatskoj i svijetu. Međutim, morfološke karakteristike kolonije na PDA izolata iz podgrupe *Diaporthe eres* u ovom istraživanju ne podudaraju se s opisima iz navedenog istraživanja u Hrvatskoj, a razlike su prije svega u tamnijoj boji kolonije uz znatno izraženije prstenaste zone rasta nego što je to bio slučaj kod Kaliterne i sur. (2012) (Slika 9.). Objašnjenje za navedeno opažanje proizlazi iz činjenice da je unutar vrste *Dp. eres,* prisutna vrlo velika varijabilnost po pitanju morfoloških karakteristika (Castlebury i sur. 2002). Ta vrsta je srednje jaki patogen, a znatno je slabije

zastupljena na vinovoj lozi od vrste *P. ampelina* (Kaliterna i sur., 2012; Kaliterna, 2013), što je potvrđeno i u ovom istraživanju s obzirom da je vrsta izolirana na samo jednom lokalitetu (Zagreb). Osim u Hrvatskoj, ova vrsta dolazi na vinovoj lozi i u Sjedinjenim Američkim Državama (Baumgartner i sur., 2013).



Slika 10. Prikaz filogenetskog stabla napravljenog metodom Maximum likelihood baziranog na analizi poravnatih sekvenci (ITS) izolata IL9.2bb, LF1.1 i referentnih izolata iz banke gena GenBank za različite vrste iz roda *Diaporthe/Phomopsis*. Vrsta *Diaporthella corylina* uzeta je kao vanjska grupa. Brojevi iznad pojedinih ogranaka predstavljaju postotak 1000 bootstrap ponavljanja.

4.3.3. Identifikacija izolata iz Grupe 3- Ostale

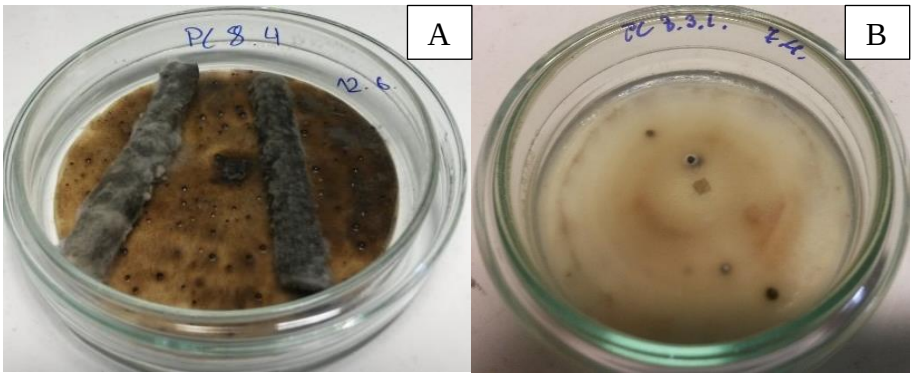
Na temelju molekularne, a potpomognuto i morfološkom analizom izolata iz Grupe 3 - Ostali, bilo ih je moguće grupirati u pet podgrupa.

4.3.3.1. Podgrupa *Valsa*/ *Cytospora*

Izolati iz ove podgrupe formirali su smeđe kolonije koje su sporulirale na PDA i WA-Foeniculumu (Slika 11.A i B i Slika 12.A). U piknidima su uočene prozirne jednostanične spore kobasičastog blika (Slika 12.B). Analiza DNA fingerprint profila reprezentativnih izolata (PL8.4, VR8c) iz ove grupe pokazala je da se dotični profili ne grupiraju s onima ostalih izolatima u ovom istraživanju te je za navedene izolate provedena analiza molekularnog markera ITS.

4.3.3.1.1. *Valsa leucostoma* (anamorf *Cytospora leucostoma*)

Morfološke karakteristike kolonije i konidija poklapale su se opisu kod Adams-a i sur. (2006) (Slika 11.) a DNA fingerprint profil izolata PL8.4 nije se poklopio sa ni jednim dostupnim DNA fingeprint profilom te je provedena daljnja molekularna analiza.



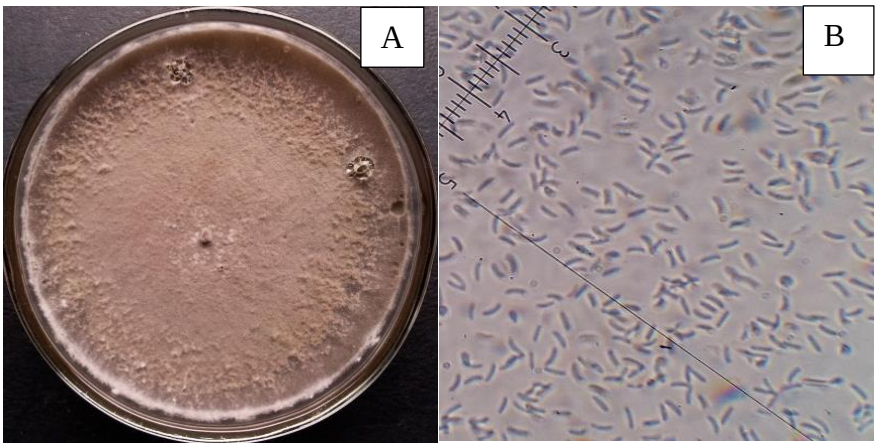
Slika 11. Kolonija na WA-foeniculum (A) i na PDA (B) vrste *V.leucostoma.*

U okviru navedene analize izolata PL8.4, produkt PCR-a s početnicama ITS5 i ITS4 bila je sekvenca od 541 parova baza, s postotkom homologije od 97 % s odgovarajućom referentnom sekvencom izolata SApeach (GenBank AF191180) (Adams i sur., 2006) za vrstu *Valsa leucostoma* (sinonim *Leucostoma persoonii*). Za dodatnu potvrdu taksonomskog statusa bilo je potrebno provesti filogenetsku analizu. Rezultat filogenetske analize bilo je jedno filogenetsko stablo (Slika 13.) iz kojega se vidi da je izolat PL8.4 u dobro podržanom ogranku s bootstrap vrijednošću od 81%, na temelju čega je donesen zaključak da izolat PL8.4 doista

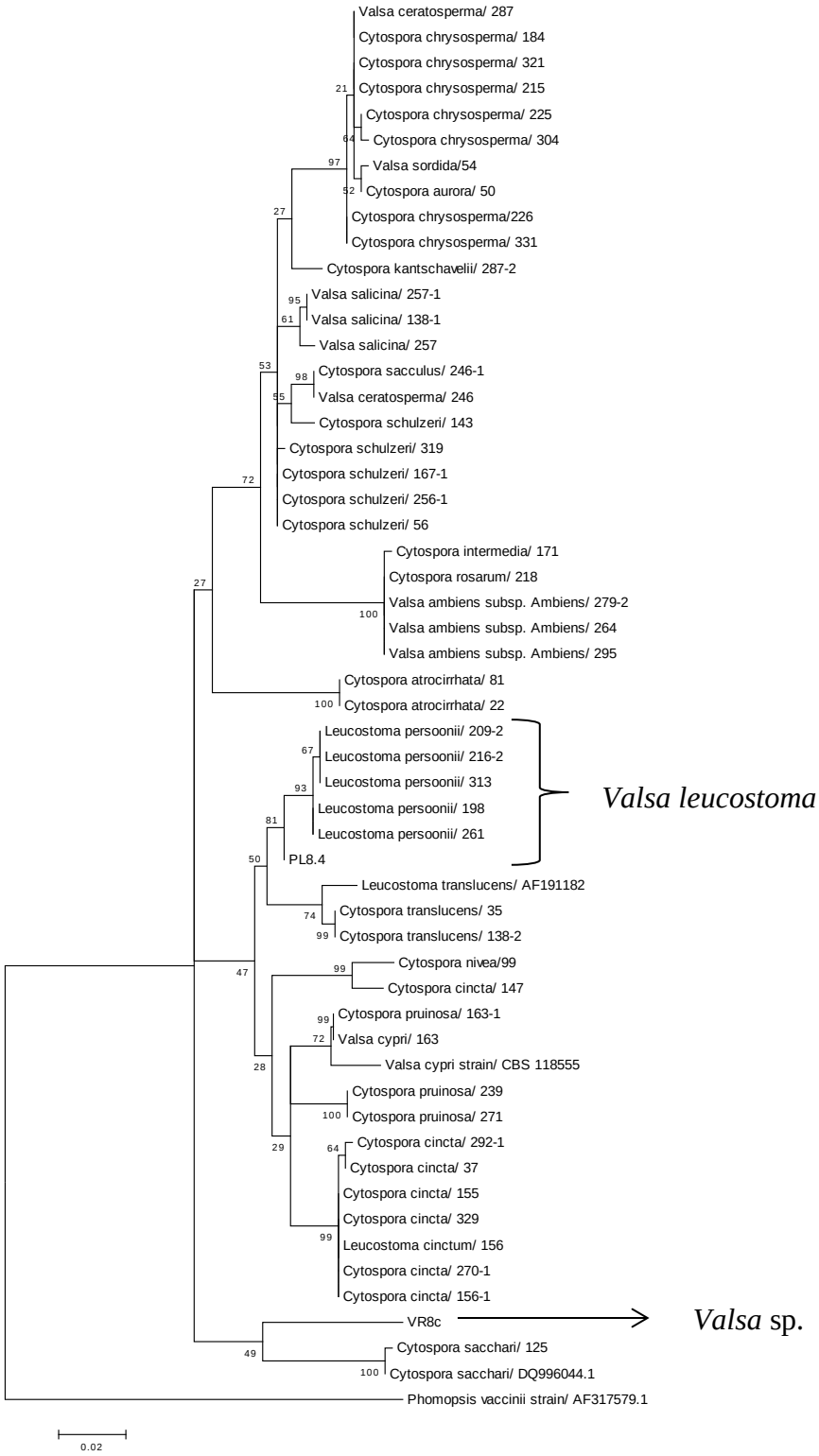
pripada vrsti *Valsa leucostoma.* Također, morfološke karakteristike kolonije na PDA i konidija poklapale su se opisima za vrstu *V. leucostoma* kod Adams-a i sur. (2006).

4.3.3.1.2. *Valsa* sp.

U okviru navedene analize izolata VR8c, produkt PCR-a s početnicama ITS5 i ITS4 bila je sekvenca od 575 parova baza, za koju je BLAST analiza pokazala da dotični izolat pripada rodu *Valsa*/*Cytospora,* no zbog niskog postotka homologije s vrstama iz tog roda, nije se mogao donijeti zaključak o pripadnosti pojedinoj vrsti. Stoga je bilo potrebno provesti filogenetsku analizu. Rezultat filogenetske analize bilo je jedno filogenetsko stablo (Slika 13.) iz kojega se vidi da izolat VR8c dijeli određenu srodnost s vrstom *Cytospora sacharri,* ali zaključak je uvjetan zbog toga što bootstrap vrijednost na dotičnom ogranku filogenetskog stabla iznosi samo 49 % što se ne smatra pouzdanim. Također, morfološke karakteristike izolata VR8c poklapale su se s opisima za rod *Valsa* (Adams i sur., 2006). Zbog svega navedenog donesen je zaključak da izolat VR8c na temelju provedenih analiza nije moguće identificirati dalje od taksonomske razine roda, odnosno roda *Valsa* sp.



Slika 12. Kolonija na PDA (A) i konidije (B) vrste *Valsa* sp.



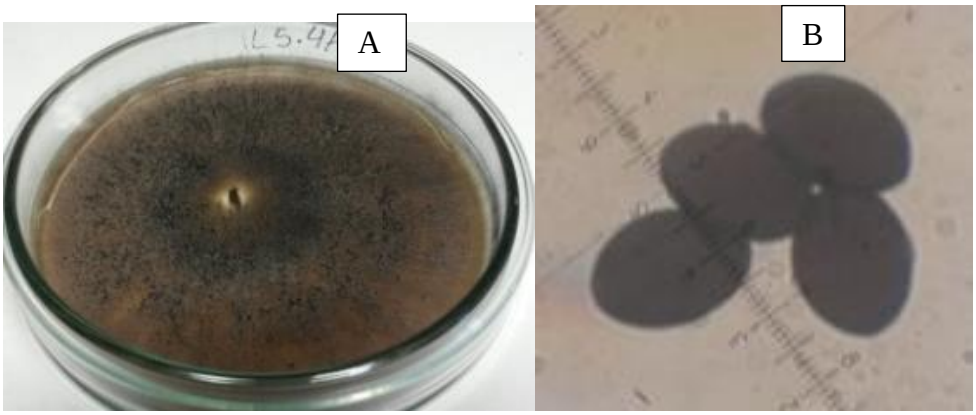
Slika 13. Prikaz filogenetskog stabla napravljenog metodom Maximum likelihood baziranog na analizi poravnatih sekvenci (ITS) izolata PL8.4 i VR8c i referentnih izolata iz banke gena GenBank za različite vrste iz roda *Valsa*/*Cytospora*. Vrsta *Phomopsis vaccinii* uzeta je kao vanjska grupa. Brojevi iznad pojedinih ogranaka predstavljaju postotak 1000 bootstrap ponavljanja, a prikazane su samo vrijednosti veće od 50%.

4.3.3.1.3. Značaj vrsta iz roda *Valsa/Cytospora*

Cytospora sp. (anamorf vrsta *Valsa sp*.) uključuju važne uzročnike rak rana (Adams i sur., 2006), koji napadaju grane, mladice i korijenje mnogih drvenastih vrsta u svijetu, a poznato je da mogu dovesti do brzog odumiranja odraslog drveća (Kepley i sur., 2015). Patogen se širi prvo korom i ksilemom, a do kraja patogeneze može prorasti tkivo sve do srži (Biggs, 1986). Arzanlou i sur. (2015) opisuju simptome parazitacije ovih gljiva kao tipične simptome propadanja. Simptomi uključuju zakržljali rast, odumiranje i klorozu i nekrozu lišća. Unutarnji simptomi pojavljuju se u različitim razinama promjene boje drva na poprečnom presjeku. Na vinovoj lozi, zabilježene su sljedeće vrste iz porodice Valsaceae, roda *Valsa*/ *Cytospora*: *Valsa vitis, Cytospora ampelina, Cytospora chrysosperma, Cytospora cincta, Cytospora vitis* (Fungal Database, 2016). Vrsta *Valsa leucostoma* već je pronađena na vinovoj lozi u Iranu (Fotouhifar i sur., 2010), no ovo bi bio prvi nalaz ove vrste na vinovoj lozi u Hrvatskoj, i to na jednom lokalitetu u ovom istraživanju (Pleševica, Tablica 3. u Dodatku 1). U budućim istraživanjima trebalo bi provesti testove patogenosti s izolatima ove vrste s ciljem utvrđivanja njihove virulentnosti na vinovoj lozi. Za izolat identificiran kao *Valsa* sp. potrebno je provesti detaljniju karakterizaciju morfologije i provesti molekularnu analizu temeljenu na dodatnim molekularnim markerima kako bi se ustanovilo radi li se možda o novoj vrsti. Općenito, zbog malog broja nalaza ove vrste, kako u svijetu tako i ovom istraživanju, možemo zaključiti da ova vrsta nema veliki značaj kao patogen vinove loze.

4.3.3.2. Podgrupa *Sordaria fimicola*

Izolati iz ove podgrupe na PDA formirali su smeđe kolonije sa slabo razvijenim zračnim micelijem što je bilo popraćeno formiranjem nakupina crnih peritecija u kojima su se nalazili askusi s tamno smeđim jednostaničnim askosporama, elipsoidalnog oblika (Slika 14.) Prema opisima kod Kavak-a (2012) zaključeno je da vrsta ima obilježja roda *Sordaria* koji je član porodice Sordariaceae (Indeks Fungorum, 2016). DNA fingerprint profil reprezentativnog izolata (IL5.4a) iz ove podgrupe nije se grupirao s onima iz drugih podgrupa pa je stoga izolat podvrgnut analizi molekularnog markere ITS.



Slika 14. Kolonija izolata IL5.4a na PDA (A) i askospore (B) identificirane kao *Sordaria fimicola*.

U okviru navedene analize, produkt PCR-a s početnicama ITS5 i ITS4 bila je ITS sekvenca od 607 parova baza koja je potom uspoređena metodom BLAST sa referentnom sekvencom iz banke gena. Utvrđena je homologija od 100 % ITS sekvence izolata IL5.4a s izolatom CBS 508.50 (Cai i sur., 2006) iz Banke gena (GenBank AY681188)koji pripada vrsti *Sordaria fimicola*.

S obzirom na visok postotak homologije ITS sekvence izolata IL5.4a s referentnim izolatom iz banke gena, isti je identificiran kao *Sordaria fimicola* koja pripada porodici Sordariaceae, redu Sordariales, razredu Sordariomycetes (Indeks Fungorum, 2016) u kojoj se nalazi velik broj vrsta gljiva koje se koriste kao modelni organizam za razna biološka, biokemijska, ekološka, genetska i evolucijska istraživanja (Cai i sur., 2006), a i vrlo su važne vrste u saprofitskoj mikoflori. *Sordaria fimicola* rasprostranjena je po cijelom svijetu no najčešće se nalaze i povezuju s ekskrementima domaćih životinja. Nalaze se i na širokom rasponu domaćina, od *Hordeum vulgare* do *Zea mays* (Kavak, 2012). Na drvenastim kulturama pronađene na boru (Botella, 2010) te na hrastu, jeli i smreki (Fungal Database, 2016.). U ovom istraživanju nađena je na samo jednom lokalitetu (Tablica 3. u Dodatku 1.), a pošto je član saprofitske faune, nalaz nije od velike važnosti s fitopatološkog aspekta, no doprinosi jasnijoj slici o bioraznolikosti mikoflore u drvu vinove loze.

4.3.3.3. Podgrupa *Stereum hirsutum*

Kolonije izolata gljiva iz ove podgrupe bile su bijelo žute boje sa slabo razvijenim zračnim micelijem. Pojava propagativnih organa kao ni sporulacija na PDA nisu uočeni. DNA fingerprint profil reprezentativnog izolata (IL5.4a) iz ove podgrupe nije se grupirao s onima iz drugih podgrupa pa je stoga izolat podvrgnut analizi molekularnog markere ITS.

U okviru navedene analize, produkt PCR-a s početnicama ITS5 i ITS4 bila je ITS sekvenca od 659 parova baza koja je potom uspoređena metodom BLAST sa odgovarajućom sekvencom iz banke gena. Utvrđena je homologija od 99 % ITS sekvence izolata IL19.2a s izolatom oak16 (GenBank FN539063.1) (Partfitt i sur., 2010) iz Banke gena koji pripada vrsti *Streum hirsutum.*

S obzirom na utvrđen visok postotak homologije, zaključeno je da izolat IL19.2a pripada vrsti *Stereum hirsutum.* Vrsta *St. hirsutum* je gljiva truležnica iz porodice Stereaceae, reda Russulales, razreda Basidiomycetes, (Indeks Fungorum, 2016) s kojom se povezuju simptomi bijele truleži (Cloete i sur., 2014), a na vinovoj lozi dio je uzročnika u okviru eska kompleksa bolesti (Hofstatter i sur., 2012; Mugna i sur., 1999). U ovom istraživanju pronađena je samo na lokalitetu Ilok (Tablica 3. u Dodatku 1.).

4.3.3.4. Podgrupa *Schizophyllum commune*

Kolonije izolata gljiva iz ove podgrupe bile su bijele boje sa slabo razvijenim zračnim micelijem. Pojava propagativnih organa kao ni sporulacija na PDA nisu uočeni (Slika 15.). DNA fingerprint profil reprezentativnog izolata (IL9.2ba) iz ove podgrupe nije se grupirao s onima iz drugih podgrupa pa je stoga izolat podvrgnut analizi molekularnog markere ITS. U okviru navedene analize, produkt PCR-a s početnicama ITS5 i ITS4 bila je ITS sekvenca od 622 parova baza koja je potom uspoređena metodom BLAST sa sekvencama iz Banke gena. Utvrđena je homologija od 99 % ITS sekvence izolata IL19.2a s izolatom 0511TES8H2 iz Banke gena (GenBank LN808959.1) koji pripada vrsti *Schizophyllum commune* (Dominguez-Monino, 2014). Također, morfološke karakteristike izolata iz ove podgrupe bile su identične opisu kod Takemoto-a i sur. (2010) za vrstu *Sch. Commune*

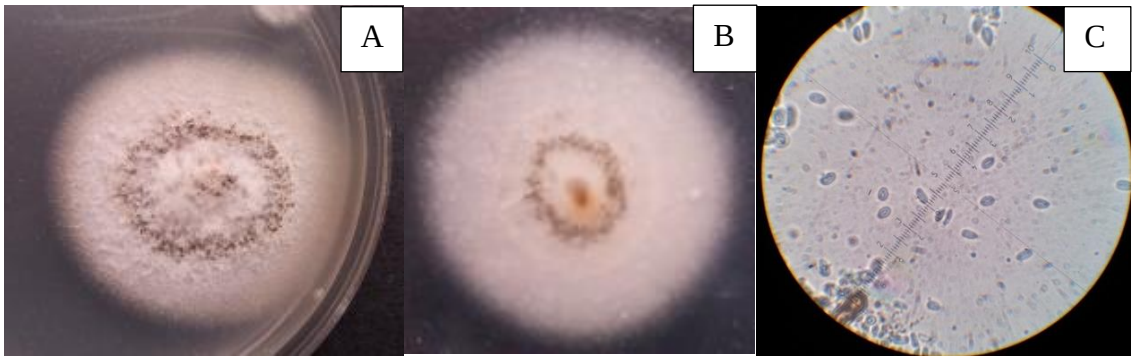


Slika 15. Kolonija vrste *Sch. commune* na PDA izolat 9.2ba.

Na temelju proveden analiza, dotični izolat je identificiran kao vrsta *Schizophyllum commune.* Ova vrsta spada također u gljive truležnice i kozmopolit je iz porodice Schizophyllaceae, reda Agaricales, razreda Basidiomycetes, (Indeks Fungorum, 2016). Gljive ove vrste uzrokuju trulež drva na živom drveću koje uključuju voćne i ornamentalne vrste. Bazidiospore koje se šire zrakom lako ulaze kroz rane od rezidbe, oštećenja od hladnoće i sunca (Takemoto i sur., 2010). Bazidiokarp je sigurni znak prisutnosti ove gljive koji se može pojaviti i na hranjivoj podlozi (Urbez-Torres i sur., 2013). Iako je u svijetu češća na drveću poput vrsta *Paulownia tomentosa* (Paclt, 2008) i *Quercus* sp. (Lim i sur., 2005), dolazi i na vinovoj lozi pri čemu se u literaturi navode nalazi u Grčkoj (Zervakis i sur., 1998). U ovom istraživanju utvrđena ja na lokalitetu Ilok (Tablica 3. u Dodatku 1.).

4.3.3.5. Podgrupa *Kalmusia variispora*

Morfološke karakteristike kolonija na PDA i konidija bile su identične opisu kod Verkley-a i sur. (2014)(Slika 26.) za vrstu *Kalmusia variispora*, no kako se DNA fingerprint profil izolata SZ2.2, reprezentativnog za ovu podgrupu razlikovao od onih kod drugih grupa, pristupilo se daljnjoj molekularnoj identifikaciji.



Slika 16. Kolonije na PDA (A i B) i konidije (B) vrste *Kalmusia variispora.*

U okviru analize molekularnog markera ITS, produkt PCR-a s početnicama ITS5 i ITS4 bila je ITS sekvenca od 574 parova baza koja je potom uspoređena metodom BLAST sa referentnom sekvencom iz banke gena. Utvrđen je postotak homologije od 99 % s ITS sekvencom izolata CBS121517 iz Banke gena (GenBank JX496030.1) (Verkley i sur. 2014) koji je identificiran kao vrsta *Kalmusia variispora*, pa je zaključeno da istoj vrsti pripada i izolat SZ2.2 iz ovog istraživanja. Vrsta pripada u porodicu gljiva Montagnulaceae, red Pleosporales, razred Dothideomycetes.

Verkley i sur. (2014) pretpostavljaju da je ovaj rod široko rasprostranjen te da je slab patogen na širokim spektru domaćina. Isti autor navodi prisutnost ove vrste na vinovoj lozi u Siriji. U ovom istraživanju *K. variispora* nađena je na samo na lokalitetu Split (Tablica 3. u Dodatku 1.) te predstavlja prvi nalaz ove vrste na vinovoj lozi u Hrvatskoj. U daljnjim istraživanjima trebalo bi utvrditi patogeni potencijal izolata ove vrste identificiranih u ovom istraživanju.

4.4. Ostale gljive

Među ostalim vrstama nađenima tijekom ovog istraživanja, pronađene su i saprofitne vrste *Alternaria* sp. (por. Pleosporaceae), *Penicilium* sp. (por. Trichocomaceae), *Aspergilus* sp. (por. Diatrypaceae) i *Fusarium* sp (por. Nectriaceae). Cijeloviti popis vrsta i izolata nađenih po lokalitetima se nalazi u Dodatku 1 (Tablica 3.).

5. ZAKLJUČCI

1. Iz uzoraka simptomatskog drva vinove loze izolirane su gljive iz porodica Botryosphaeriaceae, Diaporthaceae, Valsaceae, Sordariaceae, Schizophyllaceae, Stereaceae, Montagnulaceae, Trichocomaceae, Pleosporaceae, Diatrypaceae i Nectriaceae.
2. Ukupno je identificirano 16 različitih taksona od kojih je njih 11 identificirano do razine vrste, što je potvrda velike bioraznolikosti mikoflore drva vinove loze.
3. Iz porodice Botryosphaeriaceae potvrđene su vrste od prije poznate na vinovoj lozi u Hrvatskoj i to vrste *Diplodia seriata, Botryosphaeria dothidea* i *Neofusicoccum parvum*, a po prvi puta na vinovoj lozi u Hrvatskoj utvrđena je vrsta *Diplodia mutila*.
4. Iz porodice Diaporthaceae utvrđene su vrste od prije poznate na vinovoj lozi u Hrvatskoj i to vrste *Phomopsis ampelina* i *Diaporthe eres.*
5. Kao značajni novi nalazi na vinovoj lozi u Hrvatskoj utvrđene su potencijalno patogene vrste iz roda *Valsa (Valsa leucostoma i Valsa* sp.) i roda *Kalmusia,* a potvrđeno je prisustvo vrste iz roda *Stereum* (*S. hirsutum*) koja može biti dio uzročnika u eska kompleksu bolesti.
6. Metoda DNA fingerprintinga pokazala se kao dobar alat za brzo i jeftino grupiranje većeg broja izolata iste vrste u podgrupe, čime je bilo moguće znatno smanjiti broj potrebnih sekvenciranja.
7. Na temelju zastupljenosti patogenih vrsta gljiva po pojedinim lokalitetima, možemo zaključiti da su na lokalitetu Split uočeni simptomi bolesti drva najvjerojatnije povezani s vrstama *D. seriata, N. parvum* i *P. ampelina.* Na lokalitetu Vrgorac to su vrste *D. seriata, B. dothidea* i *P. ampelina.* Na lokalitetu Zagreb isto vrijedi za vrste *D. seriata, Dp. eres* i *P. ampelina,* a na lokalitetu Pleševica za vrste *P. ampelina* i/ili *Valsa leucostoma*. Za lokalitet Ilok, kao vjerojatni uzročnici opaženih simptoma bolesti drva vinove loze utvrđene su vrste *D. seriata* i *P. ampelina,* te na jednom uzorku i vrsta *D. mutila.*
8. Potrebna su daljnja istraživanja bioraznolikosti, patogenosti i rasprostranjenosti vrsta gljiva povezanih s bolestima dva vinove loze kako bi se dobila jasnija slika svih uzroka bolesti drva vinove loze u Hrvatskoj.

6. LITERATURA

Abd-Elsalam, K. A., Guo, J.-R., Moslem, M. A., Bahkali, A. H., Verreet, J.-A. (2009). Suitability of intergenic spacer or internal transcribed spacer microsatellite-primed PCR for the identification of Rhizoctonia solani and some phytofungi. Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology 17: 383-397.

Abdollahzadeh, J., Hosseini, F., Javadi, A. (2014). New records from *Bothryosphaeriaceae* (*Ascomycota*) for mycobiota of Iran. Mycologia Iranica 1(1): 43-51.

Abreo, E., Martinez, S., Bettucci, L., Lupo, S. (2011). *Phaeomoniella chlamidospora* and *Phaeoacremonium* spp. In grapevines from Uruguay. Phytopathol. Mediterr. 50 (supplement): 77-85.

Adams, G. C., Roux, J., Wingfield, M. J. (2006). *Cytospora* species (*Ascomycota*, *Diaporthales*, *Valsaceae*): Introduced and native pathogens of trees in South Africa. Australasian Plant Pathology 35: 521-548.

Adams, G. C., Wingfield, M. J., Common, R., Roux, J. (2005). Phylogenetic relationships and morphology of *Cytospora* species and related teleomorphs (*Ascomycota*, *Diaporthales*, *Valsaceae*) from *Eucalyptus*. Studies in mycology 52.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, E. W., Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215, 403-410.

Alves, A., Correia, A., Luque, J., Phillips, A. J. L. (2004a). *Bothryosphaeria corticola*, sp. nov. on *Quercus* species, with notes and description of *Bothryosphaeria stevensii* and its anamorph, *Diplodia mutila.* Mycologia 96(3): 598-613.

Alves, A., Henriques, I., Fragoeiro, S., Santos, C., Phillips, A. J. L., Correia, A. (2004b). Applicability of rep-PCR genomic fingerprinting to molecular discrimination of members of the genera *Phaeoacremonium* and *Phaeomoniella. Plant pathology* 53: 629-534.

Alves, A., Correia, A., Phillips, A.J.L. (2006). Multiple gene genealogies and morphological data support *Diplodia cupressi* sp. nov., previously recognized as *D. pinea* f. sp. *cupressi*, as a distinct species. Fungal Diversiy 23: 1-15.

Alves, A., Phillips, A. J. L., Henriques, I., Correia, A. (2007). Rapid differentiation of species of *Botryosphaeriaceae* by PCR fingerprinting. Research in Microbiology 158; 112-121.

Ammad, F., Benchabane M., Toumi M., Belkacem, N., Guesmi, A., Ameur, C., Lecomte, P., Merah, O. (2014). Occurance of Botryosphaeriaceae species associated with grapevine dieback in Algeria. Turk J Agric For 38: 865-876.

Amponsah, N. T. (2010). Epidemiology of botryosphaeriaceous species associated with grapevines in New Zeland. Doctoral thesis.

Armengol, J., Vicent, A., Torne, L., Garcia-Figueres, F., Garcia-Jimenez, J. (2001). Fungi associated with esca and grapevine declines in Spain: a three-year survey. Phytopthol. Mediterr. 40: 325-329.

Arzanlout, M., Narmani, A. (2015). ITS sequence dna and morphology differentiate *Cytospora chrysosperma* associated with trunk disease of grapevine in northern Iran. Journal of Plant Protection Research 55.

Baumgartner, K., Fujiyoshi, P. T., Travadon, R., Castlebury, L. A., Wilcox, W. F., Rolshausen, P. E. (2013). Characterization of Species of *Diaporthe* from Wood Cankers of Grape in Eastern North American Vineyards. Plant disease 97, 7: 912-920.

Berraf-Tebbal, A., Bouznad, Z., Santos, M. J., Coelho, M. A., Peros, J. P., Phillips, A. J. L. (2011). *Phaeoacremonium* species associated with Eutypa dieback and esca of grapevines in Algeria. Phytopathol. Mediterr. 50: 86-97

Bertsch, C., Ramirez-Suero, M., Magnin-Robert, M., Larignog, P., Chong, J., Abou-Mansour, E., Spagnolo, A., Clement, C., Fontaine, F. (2013). Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. Plant Pathology 62(2): 243-265.

Bieber, R. F., Brenner, C. H., Lazer, D. (2006). Finding criminals through DNA of their relatives. Science 312: 1315-1316.

Biggs, A. R. (1986). Comparative anatomy and host response of two peach cultivars inoculated with *Leucostoma cincta* and *L. persoonii*. 76: 905-912.

Block, K. L., Rolshausen, P. E., Cantu, D. (2013). In search of solutions to grapevine trunk diseases through „crowd-sourced" science. Frontiers in plant science 4: 394.

Botella, L., Diez J. J. (2010). Phylogenic diversity of fungal endophytes in Spanish stands of *Pinus halepensis*. Fungal diversity.

Cai, L., Jeewon, R., Hyde, K. D. (2006). Phylogenetic investigations of Sordariaceae based on multiple gene sequences and morphology. Mycological reserch 110: 137-150.

Carbone, I., Kohn, L.M. (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. Mycologia 91: 553-556.

Castlebury, L.A., Rossman, A.Y., Jaklitsch, W.J., Vasilyeva, L.N. (2002). A preliminary overview of the Diaporthales based on large subunit nuclear ribosomal DNA sequences. mycologia 94(6): 1017-1032.

Chebil, S., Fersi, R., Yakoub, A., Chenenaoui, S., Chattaoui, M., Melki, I., Zemni, H., Rhouma, A., Durante, G., Zacchi, E., Mliki, A. (2014). First report of *Bothryosphaeria dothidea, Diplodia seriata*, and *Neofusicocum luteum* Associated with canker and dieback of grapevines in Tunnisia. 98(3).

Ciglar, I. (1998). Integrirana zaštita voćnjaka i vinograda. Zrinski d.d. Čakovec.

Cloete, M., Fischer, M., Mostert, L., Halleen, F. (2014). A novel *Fomitiporia* species associated with esca on grapevine in South Africa. Mycol Progress 13: 303-311.

Crous, P. W., Verkley, G. J. M., Groenewald, J. Z., Samson, A. R. (2009). Fungal biodiversity. CBS-KNAW Utrecht

Cvjetković, B. (2010). Mikoze i pseudomikoze voćaka i vinove loze. Zrinski d.d. Čakovec. 460-479.

Damm, U., Crous, P.W., Fourie, P.H. (2007). Botryosphaeriaceae as potential pathogens of prunus species in South Africa, with descriptions of *Diplodia africana* and *Lasiodiplodia plurivora* sp. nov.. Mycologia 99 (5): 664-680.

Dominguez-Monino,I. (2014) Evaluaciony control de comunidades microbianas en cuevas turisticas. Thesis Instituto de Recursos Naturales y Agrobiologia.Consejo Superior de Investigaciones Cientificas

Fotouhifar, K., Hedjaroude, G., Leuchtmann, A. (2010). ITS rDNA phylogeni of Iranian strains of *Cytospora* and associated teleomorphs. Mycologia 102(6): 1369-1382.

Gomes, R. R., Glienke, C., Videira, S. I. R., Lombard, L., Groenewald, J. Z. (2013). *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. Persoonia 31: 1-41.

Halleen, F., Fourie, P. H., Crous, P. W. (2006). A review of black foot disease of grapevine. Phytopathol. Mediterr. 45: 55-67.

Halleen, F., Fourie, P. H., Lombard, P. J. (2010). Protection of pruning wounds against *Eutypa lata* by biological and chemical methods. S. Afr. J. EnoL Vitic., VoL 31: No. 2,2.

Hallen, H. E., Watling, R., Adams, G. C. (2003). Taxonomy and toxicity of *Conocybe lactea* and related species. *Mycobiological Research* 107: 969-979.

Hamann, A., Zink, D., Nagl, W., (1995) Microsatelite fingerprinting in the genus *Phaseolus.* Genome 38: 507-515.

Hofstetter, V., Buyck, B., Croll, D., Viret, O., Couloux, A., Gindro, K. (2012). What if esca disease of grapevine were not a fungal disease? Fungal diversity 54: 51-67.

Jeffreys, A. J. (1987). "Highly variable minisatellites and DNA fingerprints". Biochemical Society Transactions 15 (3): 309-17.

Kaliterna, J., Miličević, T., Cvjetković, B. (2011). Bolesti vinove loze uzrokovane fitopatogenim gljivama iz porodice *Botryiosphaeriaceae*. Glasilo biljne zaštite 6: 424-430.

Kaliterna, J., Miličević, T., Cvjetković, B. (2012). Grapevine trunk diseases associated with fungi from the *Diaporthaceae* family in Croatian vineyards. Arh Hig Rada Toksikol 63: 471-479.

Kaliterna, J. (2013). Identifikacija, patogenost i rasprostranjenost vrsta gljiva iz porodica Bothryosphaeriaceae i Diaporthaceae na vinovoj lozi u Hrvatskoj. Doktorski rad.

Kavak, H. (2012). Some biological parameters of *Sordaria fimicola*. Pak. J. Bot. 44(3): 1079-1082.

Kepley, J. B., Reeves, F. B., Jacobi, W. R., Adams, G. C. (2015). Species associated with cytospora canker on populus tremuloides. Mycotaxon 130: 783-805.

Lazzizera, C., Frisullo, S., Alves, A., Lopes, J., Phillips, A.J.L. (2008). Phylogeny and morphology of Diplodia species on olives in southern Italy and description of *Diplodia olivarum* sp. nov. Fungal Divers. 31: 63-72.

Lim, Y. W., Lee, J. S., Kim, K. M., Jung, H. S. (2005). Wood-rotting fungal flora of Kanghwa island. Mycobiology 22(4): 167-172.

Maceljski, M., Cvjetković, B., Ostojić, Z., Barić, B. (2006). Štetočinje vinove loze. Zrinski d.d. Čakovec.

Mehl, J.W., Slippers, B., Roux, J., Wingfield, M.J. (2011). Botryosphaeriaceae associated with *Pterocarpus angolensis* (kiaat) in South Africa. Mycologia 103 (3): 534-553.

Meyer, W., Mitchell, T. G., Freedman, E. Z., Vilgalys, R. (1993). Hybridization Probes for Conventional DNA Fingerprinting Used as Single Primers in the Polymerase Chain Reaction To Distinguish Strains of *Cryptococcus neoformans*. Journal of Clinical Microbiology 31: 2274-2280.

Mirošević, M., Karoglan Kontić, J. (2008). Vinogradarstvo. Nakladni zavod globus, Zagreb.

Motkova, P. i Vytrasova, J. (2011). Comparison of methods for isolating fungal DNA. Czech J. Food Sci. 29 special issue: S76-S85.

Mugnai, L., Graniti, A., Surico, G. (1999). Esca (black measles) and brown wood-streaking: Two old and elusive diseases of grapevines. Plant Diseases 83(5): 404-418.

Niekerk, J. M., Groenewald, J. Z., Farr, D. F., Fourie, P. H., Halleen, F., Crous, P.W. (2005). Reassessment of *Phomopsis* species on grapevines. Australasian plant pathology, 34:27-39.

Paclt, J. (2008). *Basidiomycetes* inhabiting the ornamental tree *Paulownia* (*Scrophulariaceae*). Őster. Z. Pilzk. 18.

Paplomatas, E. J. (2004) Molecular diagnostics for soilborne fungal pathogens. *Phytopathol. Mediterr.* 43: 213-220.

Partfitt, D., Hunt, J., Dockrell, D., Rogers, H. J., Boddy, L. (2010). Do all trees carry the seeds of their own destruction? PCR reveals numerous wood decay fungi latently present in sapwood of a wide range of angiosperm trees. Fungal Ecol 3 (4), 338-346

Perez, C.A., Wingfield, M.J., Slippers, B., Altier, N.A., Blanchette, R.A. (2010). Endophytic and canker-associated Botryosphaeriaceae occurring on non-native *Eucalyptus* and native *Myrtaceae* trees in Uruguay. Fungal Diversity 41 (1): 53-69.

Phillips, A. J. L. (2002). *Bothryosphaeria* species associated with diseases of grapevines in Portugal. Phytopathol. Mediterr. 41: 3-18 .

Phillips, A.J.L., Alves, A., Correia, A., Luque, J. (2005). Two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella anamorphs*. Mycologia 97: 513-529.

Phillips, A. J. L., Alves, A., Pennycook, S. R., Johnston, P. R., Ramaley, A., Akulov, A., Crous, P. W. (2008). Resolving the phylogenetic and taxonomic status of dark-spored teleomorph genera in the Botryosphaeriaceae. Persoonia 21: 29-55.

Phillips, A. J. L., Lopes, J., Abdollahzadeh, J., Bobev, S., Alves, A. (2012). Resolving *Diplodia* complex on apple and other *Rossaceae* hosts. Persoonia 29, 29-38.

Phillips, A. J. L., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M. J., Groenewald, J. Z., Crous, P. W. (2013). The *Botriosphaeriaceae*: genera and species known from culture. Studies in mycologia 76: 51-167.

Ramirez-Suero, M., Benard-Gellon, M., Ching, J., Laloue, H., Stempien, E., Abou-Mansour, E., Fontaine, F., Larignon, P., Mazet-Kieffer, F., Farine, S., Bertsch, C. (2014). Extracellular compounds produced by fungi associated with Botryosphaeria dieback induce differential defense gene expression patterns and necrosis in *Vitis vinifera* cv. Chardonnay cells. *Springer-Verlag Wien*, [Online]. 22. travanj, Dostupno na Internet stranici https://www.springer.com/gp/

Ranjarad, L., Poly, F., Lata, J.-C., Mougel, C., Thioulouse, J., Nazaret, S. (2001). Characterization of Bacterial and Fungal Soil Communities by Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis Fingerprints: Biological and Methodological Variability. Applied and Enviornmental, Microbiology 67: 4479-4487.

Richard, T. H. (1998.). Illustrated genera of Ascomycetes. Vol I,II

Santos, J. M. i Phillips, A. J. L. (2009). Resolving the complex of Diaporthe (Phomopsis) species occuring on *Foeniculum vulgare* in Portugal. Fungal diversity 34: 111-125.

Saitou, N., Nei, M. (1987). The neighbour-joining method – a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Bio Evol 4: 406-425

Schilder, A. M. C., Erincik, O., Castlebury, L., Rossman, A., Ellis, M. A. (2005). Characterization of *Phomopsis* spp. Infecting grapevines in the great lakes region of North America. Plant Disease 89, 7: 755-762

Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., Fungal Barcoding Consortium. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcoding marker for Fungi. PNAS, 109, 16: 6241-6246.

Soll ,D. R. (2000). The ins and outs of DNA fingerprinting the infectuous fungi.Clinical, microbiological reviews, 12: 332-370.

Swofford, D. L., (2003.). PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony. Version 4.0 Beta 10. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates

Verkley, G. J. M., Dukik, K., Renfurm, R., Göker, M., Stielov, J.B. (2014). Novel genera and species of coniothyrium-like fungi in *Montagnulaceae* (*Ascomycota*). Persoonia 32: 25-51.

Takamoto, S., Nakamura, H., Erwin, Imamura, Y., Shimane, T. (2010). Review: *Schizophyllum commune* as a ubiquitous plant parasite. JARQ 44(4): 357-364.

Takamura, K., Nei, K., Kumar, S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbour-joining method. PNAS 101: 11030-11035

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol Biol Evol 30(12):2725-9

Udayanga, D., Liu, X., McKenzie E. H. C., Chukeatirote, E., Bahkali, A. H. A., Hyde, K. D. (2011). The genus Phomopsis: biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens. Fungal Diversity 50: 189-225

Urbez-Torres, J. R. (2011). The status of Botryosphaeriaceae species infecting grapevines. Reviev. Phytopathol. Mediterr. 50: S5-S45

Urbez-Torres, J. R., Peduto, F., Vossen, P. M., Krueger, W. H., Gubler, W. D. (2013). Olive twig and branch dieback: Etiology, incidence and distribution in california. Plant Dis. 97: 231-244.

Valášková, V., Baldrian, P. (2009). Denaturing gradient gel electrophoresis as a fingerprinting method for the analysis of soil microbial communities. Plant soil environ. (10): 413-423.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J.W., (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. U: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky J.J, White T.J, editors. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. New York, Academic Press: 315-322.

Zervakis, G., Dimou, D., Balis, C. (1998). A check-list of the Greek macrofungi including hosts and biogeographic distribution: I. Basidiomycotina. Mycotaxon 66: 273-336.

http://faostat3.fao.org pristupljeno 23.2.2016.
https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/fungushost/fungushost.cfm pristupljeno 24.2.2016.
https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/ pristupljeno 24.2.2016.
http://www.indexfungorum.org/names/names.asp pristupljeno 29.6.2016.

7. DODACI

Tablica 3. Prikaz broja izolata dotičnih vrsta izoliranih sa lokaliteta u ovc

Lokalitet	Split	Vrgorac	Zagreb	Plešivica	Ilok
Diplodia seriata	23	4	1	0	22
Diplodia mutila	0	0	0	0	1
Botryosphaeria dothidea	0	2	0	0	0
Neofusiccocum parvum	14	0	0	0	0
Phomopsis ampelina	6	14	5	15	37
Diaporthe eres	0	0	7	0	0
Valsa leucostoma	0	0	0	1	0
Valsa sp.	0	2	0	0	0
Stereum hirsutum	0	0	0	0	1
Schizophylum commune	0	0	0	0	1
Sordaria fimicola	0	0	0	0	3
Kalmusia variispora	1	0	0	0	0
Aspergilus sp.	0	2	0	0	0
Alternaria sp.	0	14	1	1	19
Penicilium sp.	0	1	0	0	0

8. ŽIVOTOPIS AUTORA

Rođen 11. Srpnja 1991. g. u Zagrebu. Krenuo u osnovnu školu Malešnica 1998. g. Tijekom osnovnoškolskog obrazovanja pohađa i likovu školu Studija Tanay. 2006. g. završava osnovnu školu, iste godine upisuje srednju Drvodjeljsku školu u Zagrebu, smjer Šumarski tehničar. 2010. g. Tijekom srednjoškolskog obrazovanja pohađa tečaj Japanskog jezika u Učilištu za strane jezike Suvag. Sudjeluje na državnom natjecanju tehničkih Šumarskih i Drvodjeljskih škola. Završava srednju školu i upisuje prvu godinu preddiplomskog studija Zaštite bilja na Sveučilišta u Zagrebu, Agronomskom Fakultetu. 2013. g. završava preddiplomski studij i upisuje diplomski studij Fitomedicine na istom fakultetu. Adekvatno se služi Engleskim jezikom.