

# Identifikacija gljiva povezanih sa sušenjem šipka (*Punica granatum L.*) u Dalmaciji

---

Piškurić, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:254908>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-18**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET

Identifikacija gljiva povezanih sa sušenjem šipka  
(*Punica granatum* L.) u Dalmaciji

DIPLOMSKI RAD

Ivana Piškurić

Zagreb, rujan, 2019.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:  
Fitomedicina

Identifikacija gljiva povezanih sa sušenjem šipka  
(*Punica granatum* L.) u Dalmaciji

DIPLOMSKI RAD

Ivana Piškurić

Mentor: Doc.dr.sc. Joško Kaliterna

Zagreb, rujan, 2019.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA**  
**O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, Ivana Piškurić, JMBAG 0178103075, rođen/a 25.04.1995. u Karlovcu, izjavljujem

da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

Identifikacija gljiva povezanih sa sušenjem šipka (*Punica granatum* L.) u Dalmaciji

Svojim potpisom jamčim:

1. da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
2. da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
3. da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
4. da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
5. da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana \_\_\_\_\_

*Potpis studenta / studentice*

---

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE  
O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta/ice Ivane Piškurić, JMBAG 0178103075, naslova  
Identifikacija gljiva povezanih sa sušenjem šipka (*Punica granatum* L.) u Dalmaciji  
obranjen je i ocijenjen ocjenom \_\_\_\_\_, dana \_\_\_\_\_.

Povjerenstvo:

potpisi:

- |    |   |        |       |
|----|---|--------|-------|
| 1. | Doc.dr.sc. Joško Kaliterna                  | mentor | _____ |
| 2. | Izv.prof.dr.sc. Snježana Topolovec-Pintarić | član   | _____ |
| 3. | Doc.dr.sc. Jelena Gadže                     | član   | _____ |

## Zahvala

Ponajprije htjela bih zahvaliti svojoj obitelji na neizmjernej potpori i razumijevanju tijekom cijelog mog školovanja. Uvijek ste bili tu za mene i podržavali me u mojim odlukama, a kad god je bilo teško ohrabрили ste me i imali ste povjerenja u mene. Uz vaše riječi podrške sve studentske brige bivale su lakše. Hvala vam od srca na strpljenju i velikoj pomoći koju ste mi pružili tijekom ovog životnog putovanja.

Ujedno, htjela bih se zahvaliti svojim kolegama i prijateljima koji su imali riječi ohrabrenja i bili su voljni pomoći kad mi je bilo potrebno. Posebno bih se htjela zahvaliti svojoj docimerici Nikolini, vrlo dragoj prijateljici stečenoj tijekom studija, koja mi je bila veliki oslonac tijekom ovih nekoliko godina i kojoj sam se jadala kad mi je bilo teško.

Posebno se želim zahvaliti svim djelatnicima Zavoda za fitopatologiju Agronomskog fakulteta, koji su uvijek bili spremni pomoći, te su me uvijek dočekali s osmjehom prilikom mog dolaska na zavod, koji je bio malo češći.

Na kraju, ali nimalo manje važno, želim se zahvaliti svome mentoru doc.dr.sc. Jošku Kaliterni. Hvala vam na strpljenju i razumijevanju, te na velikoj pomoći koju ste mi pružili tijekom izrade ovog diplomskog rada. Bila mi je čast imati vas za mentora i učiti od vas.

## Sadržaj

<b>1. Uvod</b> .....	1
<b>2. Pregled literature</b> .....	3
2.1. Fitopatogene gljive kao uzročnici bolesti drva šipka.....	3
2.1.1. <i>Ceratocystis fimbriata</i> na šipku.....	3
2.1.2. <i>Lasiodiplodia gilanensis</i> na šipku.....	5
2.1.3. <i>Phytophthora palmivora</i> na šipku.....	6
2.1.4. <i>Coniella granati</i> (sinonim <i>Pilidiella granati</i> ) na šipku.....	6
2.1.5. <i>Cytospora spp.</i> kao biljni patogeni.....	6
2.1.6. <i>Cytospora granati</i> na šipku.....	8
2.1.7. <i>Cytospora punicae</i> na šipku.....	9
<b>3. Cilj i hipoteza</b> .....	12
<b>4. Materijali i metode</b> .....	13
4.1. Uzorkovanje drva šipka.....	13
4.2. Izolacija gljiva i dobivanje čistih izolata.....	13
4.3. Fenotipska karakterizacija izolata grupe 1 i 2.....	14
4.3.1. Obilježja kolonija izolata grupe 1 i 2.....	14
4.3.2. Obilježja piknostroma i konidiogenog sloja izolata grupe 1.....	14
4.3.3. Biometrijska obilježja spora izolata grupe 1.....	14
4.3.4. Brzina rasta izolata grupe 1.....	14
4.3.5. Pokušaj stimulacije izolata grupe 1 na formiranje teleomornog stadija.....	15
4.4. Molekularna karakterizacija izolata grupe 1 i 2.....	15
4.4.1. Izolacija ukupne genomske DNA izolata gljiva.....	15
4.4.2. Umnažanje odsječaka ITS i/ili EF1- $\alpha$ metodom PCR.....	16
4.4.3. Horizontalna gel elektroforeza.....	16
4.4.4. Sekvenciranje PCR produkata.....	17
4.4.5. BLAST i filogenetska analiza.....	17
4.5. Test patogenosti izolata grupe 1.....	18
<b>5. Rezultati i diskusija</b> .....	19
5.1 Rezultati uzorkovanja drva šipka.....	19
5.2. Rezultat izolacije i provizorne identifikacije izolata na temelju morfoloških obilježja kolonija i plodnih tijela na PDA.....	21
5.3. Identifikacija izolata grupe 1 ( <i>C. punicae</i> ) prema biometrijskim obilježjima konidija.....	24
5.4. Brzina rasta micelija izolata grupe 1 ( <i>C. punicae</i> ).....	26
5.5. Molekularna identifikacija izolata gljiva grupe 1 ( <i>C. punicae</i> ) i grupe 2.....	26
5.6. Filogenetska analiza izolata grupe 1 ( <i>C. punicae</i> ).....	27
5.7. Rezultati testa patogenosti.....	30
<b>6. Zaključak</b> .....	34
<b>7. Literatura</b> .....	35
<b>8. Prilog</b> .....	39
<b>Životopis</b> .....	46
<b>Bilješke</b> .....	47

# Sažetak

Diplomskog rada studentice Ivane Piškurić, naslova

## **Identifikacija gljiva povezanih sa sušenjem šipka (*Punica granatum* L.) u Dalmaciji**

Šipak je voćna i ukrasna vrsta čiji je fitopatološki status u Hrvatskoj slabo istražen. Podložna je napadu fitopatogenih gljiva, od kojih su uzročnici bolesti drva sve značajniji posljednjih godina u svijetu. Na više lokaliteta u Dalmaciji od 2017. do 2019., uočena su stabla šipka sa simptomima sušenja, a zbog sumnje na gljivičnu bolest drva cilj istraživanja bio je identificirati gljive uzročnike i provjeriti im patogenost. Izolirane gljive identificirane su prema morfološkim obilježjima kolonija, konidiomata, spora i brzini rasta na podlozi PDA. Morfološkom identifikacijom utvrđene uobičajene saprofitne vrste nisu dalje obrađivane, ali one, vrste *Cytospora punicae*, dodatno su identificirane PCR analizom DNA sekvenci molekularnih markera ITS i EF1- $\alpha$ . Sekvence su uspoređene s odgovarajućima za vrstu *C. punicae* iz baze GenBank koristeći bioinformatički alat BLAST i filogenetsku analizu metodom Maximum Likelihood. Za izolate *C. punicae* patogenost je provjerena i potvrđena na 1-godišnjim sadnicama šipka čime je ovo prvi nalaz te vrste kao patogena drva šipka u Hrvatskoj.

**Ključne riječi:** *Punica granatum*, *Cytospora punicae*, bolest drva šipka, simptomi



## Summary

Of the master's thesis – student Ivana Piškurić, entitled

### **Identification of fungi associated with the drying of Pomegranate (*Punica granatum* L.) in Dalmatia**

Pomegranate is a fruit and ornamental species whose phytopathological status in Croatia is poorly researched. It is susceptible to attack by phytopathogenic fungi, of which the causative agents of wood disease have become increasingly important in recent years in the world. In several localities in Dalmatia from 2017 to 2019, pomegranate trees with drying symptoms were observed, and due to suspected fungal disease of the tree, the aim of the study was to identify the fungal pathogens and to check their pathogenicity. Isolated fungi were identified according to the morphological characteristics of colonies, conidiomata, spores and growth rate on PDA medium. By morphological identification, the common saprophytic species were not further processed, but those of *Cytospora punicae* species were further identified by PCR analysis of the DNA sequences of the molecular markers ITS and EF1- $\alpha$ . The sequences were compared with those corresponding to the genus *C. punicae* from the GenBank database using the BLAST bioinformatics tool and phylogenetic analysis by the Maximum Likelihood method. For *C. punicae* isolates, the pathogenicity was checked and confirmed on one-year-old seedlings of pomegranates, making this the first finding of this species as a pathogen of pomegranate tree in Croatia.

**Keywords:** *Punica granatum*, *Cytospora punicae*, Pomegranate tree disease, symptoms

# 1. UVOD

Šipak, nar ili mogranj (*Punica granatum* L.) je voćna vrsta iz porodice mogranja (*Punicaceae*), potječe s područja Male Azije koja se vremenom proširila Mediteranom, pa tako i u Hrvatskoj a u Dalmaciji je kao voćna vrsta cijenjena od davnina. Uzgoj šipka uglavnom je ograničen na polusušnu blagu umjerenu do suptropsku klimu u glavnim područjima uzgoja, uključujući većinu mediteranskih zemalja (Stover i Mercure 2007., preuzeto iz Gadže 2013.), u kojima su šipci posebno prilagođeni uvjetima suše (Celik i Ercisli 2009., preuzeto iz Gadže 2013.). Uzgaja se na području u kojem prevladavaju vruća ljeta i blage zime i gdje se optimalna srednja dnevna temperatura za rast kreće oko 12 °C (Morton 1987.). Zimi temperature od -11 do -15 °C izazivaju štete, a do smrzavanja dolazi pri -20 °C. Problem predstavljaju i kasni jesenski, te rani proljetni mrazevi (Agroklub 2019.). Šipak ima širok areal uzgoja, preko Azije, Europe, Afrike pa do Amerike, ali pokazalo se da optimalne rezultate postiže uzgojem u mediteranskoj klimi (Drezga 2014.). U Hrvatskoj se tradicionalno uzgaja duž cijele obale, najviše u dolini rijeke Neretve i na dubrovačkom području, kao voćka ili ukrasno stablo (Šakić-Bobić 2016.). Iako u Hrvatskoj postoji veliki broj tradicijskih sorti šipka, ne postoji niti jedan organizirani nasad, već se šipci uzgajaju u okućnicama, vrtovima, na rubovima vinograda, maslinika, u polju (Anonimno 2015.). Visoke je nutritivne vrijednosti i u Hrvatskoj ima veliki neiskorišteni potencijal plantažnog uzgoja. Nalazi se na 17. mjestu od ukupne svjetske proizvodnje voća, iza agruma, masline i smokve (Radunić 2012.). U svijetu se šipak uzgaja na više od 300.000 ha, na kojima se proizvodi više od 3.000.000 tona (Šakić Bobić 2016.). Trenutno zemlje glavni proizvođači šipka su Indija, Iran, Kina, SAD i Turska, čime čine 76% ukupne svjetske proizvodnje šipka (Xavier i sur. 2019.). Iran je jedan od glavnih izvoznika šipka u svijetu, s više od 150.000 tona izvezen u druge zemlje (Gadže 2013.). Najveći proizvođač šipka u Europi je Španjolska s 45.000 tona, od čega se više od 50% plasira uglavnom na europsko tržište (Šakić Bobić 2016.). Kao glavne sorte u Španjolskoj se uzgajaju “Mollar de Elche”, “Mollar de Valencia” i „Wonderful”, dok u plantažnom uzgoju u SAD-u kao glavna sorta prevladava sorta “Wonderful” (Alcaraz-Marmol i sur. 2017.). Na sadašnjoj sortnoj listi Republike Hrvatske nalazi se 13 sorti šipka: Barski slatki, Glavaš, Konjski zub, Majdeški sitnozrni, Ciparski, Sladun, Medun, Šerbetaš i dr.) (Miličević i sur. 2017.).

Gledano s fitopatološkog aspekta šipak je podložan napadu i kolonizaciji većeg broja patogena, posebno fitopatogenih gljiva, te bakterija i virusa. Bakterijska palež uzrokovana *Xanthomonas axonopodis* pv. *punicae* je glavno ograničenje za proizvodnju šipka u važnim zemljama proizvođačima šipka kao što su Indija, Pakistan i Južna Afrika (Bozkurt i sur 2014.), a osim napada ove bakterije, kao uzročnik se javlja i *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. Od virusnih oboljenja ističu se ona uzrokovana virusom kovrčavosti lista trešnje (CLR) čija je pojava zabilježena u Italiji (Bichcheri i sur. 2015.), dok je virus mozaika krastavca (CMV) zabilježen na šipku još u Jugoslaviji (Juretić i Horvath 1984.). Kao posebna skupina patogena izdvajaju se fitopatogene gljive, koje su najčešća i najbrojnija skupina patogena koji se javljaju na šipku, a uzrokuju gljivične bolesti koje se mogu općenito podijeliti na bolesti lista i ploda te bolesti drva

šipka. Zbog negativnog utjecaja na kvalitetu i kakvoću prinosa, te bolesti uzrokuju značajne financijske, prehrambene i skladišne gubitke, što samim time dovodi i do povećanja cijene plodova šipka. Najvažnijim gljivičnim bolestima lista i ploda smatraju se one koje uzrokuju gljive *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Penicillium* spp., *Coniella granati*, *Colletotrichum gloeosporioides* i *Pestalotiopsis versicolor* (Munhuweyi i sur. 2016.). U novije vrijeme jednako važnima su ujedno postale i bolesti drva, koje uzrokuju gljive iz rodova *Ceratocystis* i *Cytospora*. U 2005. godini u Indiji je zabilježena bolest drva šipka uzrokovana gljivama roda *Ceratocystis* (Sharma i sur. 2010.). Vrste roda *Cytospora* na šipku su zabilježene najprije u Kaliforniji (SAD) 2014. godine (Peduto Hand i sur. 2014.), a potom u posljednjih 5 godina i u nekoliko drugih zemalja gdje se uzgaja šipak (Mahdikhani i Davoodi 2017.). U Hrvatskoj do sada nema nikakvih istraživanja na temu uzročnika bolesti drva šipka, i fitopatološka slika za ovu voćnu kulturu je nepotpuna. Stoga bi, u kontekstu moguće revitalizacije uzgoja šipka u Hrvatskoj i sa ciljem bolje zaštite postojećih biljaka, bilo od velikog značaja bolje poznavati uzroke svih bolesti šipka na području Hrvatske, a posebno uzroke bolesti drva koji se povezuju sa sušenjem čitavih stabala.

Pošto su tijekom 2017. godine na području Dalmacije uočeni simptomi sušenja šipka, nepoznatog uzroka, to je bio glavni razlog odabira ove teme istraživanja. Prema podacima iz literature simptomi na šipku na području Dalmacije najviše odgovaraju onima koje uzrokuju gljive iz rodova *Ceratocystis* i *Cytospora*. Uslijed nedovoljnih podataka o samoj simptomatologiji, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se utvrdila točna etiologija ove bolesti.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Fitopatogene gljive kao uzročnici bolesti drva šipka

Fitopatogene gljive navode se kao najčešći i najvažniji uzročnici bolesti plodova šipka, a u novije vrijeme su sve češće prepoznate i kao uzročnici bolesti drva šipka. One indirektno utječu na prinos i rezultiraju značajnim financijskim gubitcima, jer uslijed pojave bolesti u konačnici dolazi do propadanja čitavih stabala. Simptomi bolesti drva očituju se u vidu pucanja kore, nekroze drva, rak rana, kloroze lišća, sušenja izboja, grana te na kraju čitavih stabala, a kao mogući uzročnici smatraju se gljive iz roda *Ceratocystis*, vrsta *Ceratocystis fimbriata* i roda *Cytospora*, vrste *Cytospora granati* i *Cytospora punicae* (Munhuweyi i sur. 2016.).

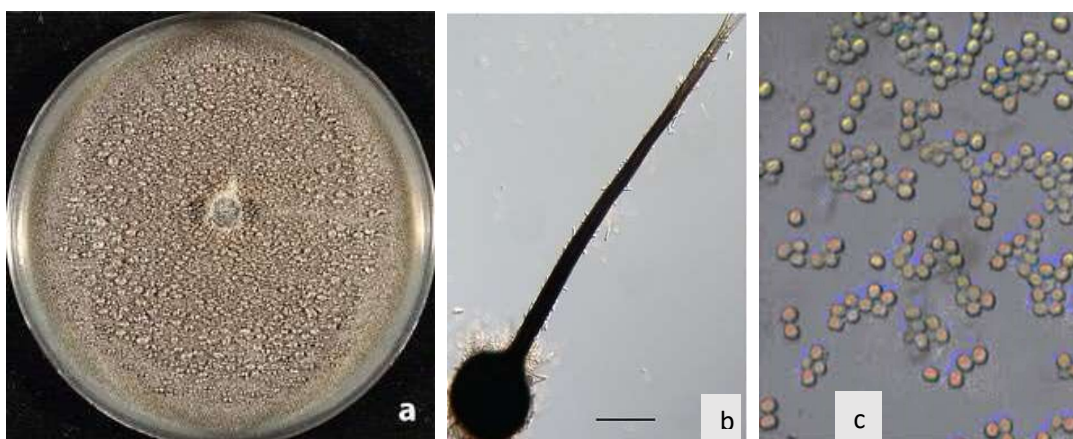
#### 2.1.1. *Ceratocystis fimbriata* na šipku

Rod *Ceratocystis* prvi je puta opisan 1890. godine, opisom *Ceratocystis fimbriata* Ellis i Halsted kao uzročnika truleži slatkog krumpira (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) u SAD-u (Halsted 1890.; Halsted i Fairchild 1891., preuzeto iz Roux i Wingfield 2009.). Nakon tih početnih istraživanja, vrste roda *Ceratocystis* prepoznate su kao jedni od vrlo čestih i vrlo značajnih biljnih patogena, a posebno patogena drva (Kile 1993.; CAB International 2001.; preuzeto iz Roux i Wingfield 2009.). Vrste roda *Ceratocystis* odgovorne su za širok raspon simptoma bolesti, uključujući promjenu boje vaskularnog tkiva, nastanak rak rana i venuće biljaka (Halsted i Fairchild 1891., preuzeto iz Van Wykl 2007.). Prema istraživanju Soni i Kanwar (2016.) bolest propadanja drva šipka uzrokovana gljivom *Ceratocystis fimbriata* smatra se jednom od vrlo važnih bolesti ove voćke u Indiji. Štetno utječe na plantažni uzgoj u svim većim i važnijim uzgojnim regijama Indije. U posljednje vrijeme nasadi šipka sve su više ugroženi napadom ove gljive, te se zbog njene izrazite patogenosti simptomi sušenja stabala ubrzano šire. Autori navode da su simptomi venuća drva šipka u Indiji prvi puta primjećeni 1990. godine u dva područja u Kanrnatki, koji su se ubrzo proširili cijelim područjem. Uzrok tih venuća nije utvrđen do 1995. godine, a bolest se rasprostranila diljem Indije. Također, autori opisuju kako bolest postupno rezultira potpunim propadanjem stabala šipka, a kao početni simptomi javljaju se žućenje i venuće lišća na jednoj do nekoliko grana. U početku simptomi se manifestiraju samo na izbojcima, a kasnije listovi cijelog stabla postaju zahvaćeni žućenjem i venu. Sve to uzrokuje opsežnu defolijaciju i odumiranje, a ksilem debla poprima smeđe-crnu boju. Konačno, kao posljedica poodmakle infekcije dolazi do sušenja čitavog stabla (slika 2.1.1.1.), što uzrokuje velike gubitke prinosa i dovodi do propadanja zaraženih dijelova voćnjaka u svega nekoliko mjeseci (Soni i Kanwar 2016.). U istraživanju Sunkad i sur. (2017.) morfološka obilježja *C. fimbriata* opisuju uzgojem izolata gljive na OMA (engl. oat meal agar). Nakon inkubacije od 16 dana na sobnoj temperaturi razvija se kolonija (slika 2.1.1.2.a) promjera 90 mm sivkaste boje s rubom ovalnog oblika, a starenjem kolonije dolazi do formiranja aleuriokonidija, endokonidija, askospora i peritecija (slika 2.1.1.2. b i c).



**Slika 2.1.1.1.** Simptomi sušenja stabla šipka uzrokovani gljivom *Ceratocystis fimbriata*

(Izvor: <https://priyankaorganica.wordpress.com/2015/09/22/breakthrough-in-pomegranate-wilt-management-breakthrough-in-pomegranate-wilt-management/> (Pristupljeno 29.7.2019.))



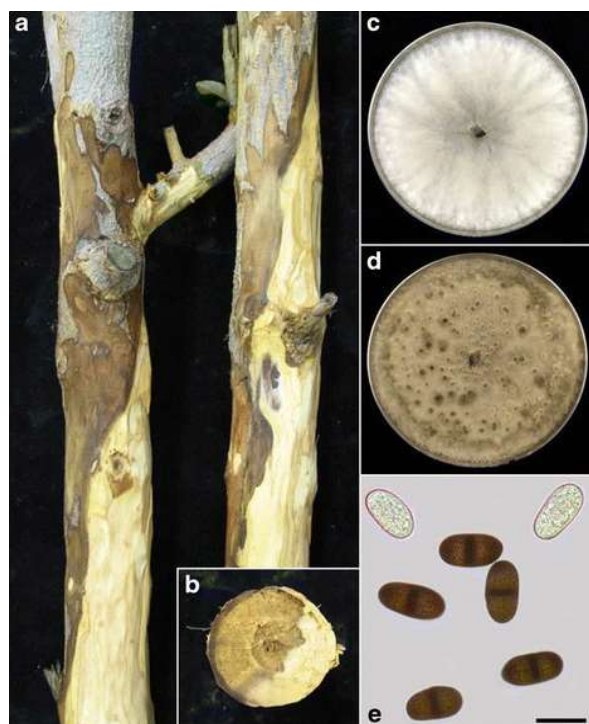
**Slika 2.1.1.2.** Morfološke karakteristike gljive *Ceratocystis fimbriata*: a) kolonija na OMA b) mikroskopski prikaz peritecija; c) askospore

(Izvor: <https://alchetron.com/Ceratocystis-fimbriata#->, [http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/2010/FVCSB\\_4\(SI2\)/FVCSB\\_4\(SI2\)96-101o.pdf](http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/2010/FVCSB_4(SI2)/FVCSB_4(SI2)96-101o.pdf) (Pristupljeno 29.7.2019.))

Prema Sharma i sur. (2010.) gljiva ostaje vijabilna u inficiranim dijelovima biljke šipka do 190 dana i u tlu najmanje 4 mjeseca. Do infekcije dolazi putem nastalih rana na biljci, no istraživanja su pokazala kako *C. fimbriata* može inficirati korijen biljke i bez prisustva bilo kakvih ozljeda.

### 2.1.2. *Lasioidiplodia gilanensis* na šipku

Tijekom ljeta 2009. godine zabilježeno je propadanje mladih stabala šipka u nekoliko voćnjaka u južnoj dolini San Joaquin u Kaliforniji. U tom se istraživanju prvi puta gljiva *L. gilanensis* navodi kao patogena drva šipka, koji uzrokuje odumiranje stabala i grana (Úrbez-Torres i sur. 2016.). Zabilježeni su karakteristični simptomi i to sveukupno lošeg proljetnog rasta biljke i odumiranja jedne ili više grana. Lezije i rak rane zabilježeni su na deblima i granama bolesnih stabala, a na presjeku simptomatičnog dijela biljke, uočena je promjena boje drva. Ukupno 25 simptomatskih mladih stabala (u dobi od tri do pet godina) sorte „Wonderful“, uzorkovano je iz pet različitih voćnjaka u pokušaju determinacije patogena (Úrbez-Torres i sur. 2016.). Izolacijom patogena s granice zdravog i simptomatičnog tkiva na PDA, na sobnoj temperaturi (24 °C), nakon 5 do 7 dana došlo je do razvitka bijele pahuljaste i brzorastuće gljivične kolonije, koja starenjem postaje svjetlo do tamnozeleno boje (slika 2.1.2.1.). Gljiva formira crne piknide, dok su joj konidije prozirne, jednostanične, elipsoidne do jajolike, tamnosmeđe boje s više uzdužnih pruga (slika 2.1.2.1.).



**Slika 2.1.2.1.** Simptomi u drvu šipka zarezanog gljivom *L. gilanensis* (a i b) te izgled kolonije gljive nakon 4 dana (c) i 7 dana na PDA (d), konidije *L. gilanensis* (e)

(Izvor: <https://www.google.hr/search?q=cytospora+granati+on+pomegranate&tbm=isch&source=univ&sa=X&ved=2ahUKEwic6ZPf6NrjAhUSHxoKHZ81DzYQsAR6BAgHEAE&biw=1339&bih=640#imgrc=4jLL4lyfdS2BaM>; (Pristupljeno 30.7.2019.))

### **2.1.3. *Phytophthora palmivora* na šipku**

Türkölmez i sur. (2015.) navode kako su tijekom lipnja 2012., na petogodišnjim stablima šipka, u jugoistočnoj Turskoj, uočili simptome puknuća kore na stabljikama neposredno iznad tla, a također su uočene smeđe lezije na nitima korijena neposredno ispod linije tla. Kao uzročnik je identificirana pseudogljiva *Phytophthora palmivora*, a zaključeno je da bi mogla predstavljati problem u uzgoju šipka u budućnosti (Türkölmez i sur. 2015.).

### **2.1.4. *Coniella granati* na šipku**

Početak ljeta 2012. godine, opaženo je odumiranje grančica i trulež plodova na oko 10% i 30% stabala šipka, u okrugu Huaiyuan u Kini. Unutar grančica uočena je nekroza, što je rezultiralo sušenjem, dok su na površini grančica bili vidljivi obilni, pojedinačni piknidi, crne boje. Kulture gljive na PDA obilno su sporulirale i formirale blijedo zelene ili bijele zračne micelij. Gljiva je formirala piknide okruglastog oblika, crne boje s prozirnim, jednostaničnim konidijama, elipsoidnog oblika. Patogen je izoliran iz svih inokuliranih grančica i identificiran kao *Pilidiella granati* (sin. *Coniella granati*) (Chen i sur. 2014.).

### **2.1.5. *Cytospora* spp. kao biljni patogeni**

Generičko ime *Cytospora* (*Sordariomycetes*, *Diaporthales*, *Cytosporaceae*) uvedeno je 1818. godine i uključuje naoko neškodljive endofite izolirane iz kore, ksilema i lišća asimptomatskih drvenastih biljaka (Spielman 1983.; Bills 1996.; preuzeto iz Lawrence i sur. 2018.). U literaturi, rod *Cytospora* poznat je još pod sinonimom *Leucostoma*, odnosno *Valsa* što je naziv teleomorfne stadija ovog roda gljiva. U fitopatologiji, mnoge vrste iz ovog roda poznate su kao destruktivni patogeni širom svijeta koji uzrokuju simptome poput rak rana i odumiranja čitavih biljaka kod više od 85 drvenastih biljnih vrsta, kako četinjača tako i listopadnih vrsta, no rijetko zeljastih biljaka. Kod četinjača uzrokuju promjenu boje biljnog tkiva, dok kod listopadnog drveća dolazi do poremećaja vodljivosti stanica ksilema u drvu, što uzrokuje venuće i sušenje inficiranih grana ili čitavih stabala (slika 2.1.5.1.) (Sinclair i sur. 1987.; Adams i sur. 2005.; 2006.; preuzeto iz Lawrence i sur. 2018.). U Kaliforniji je 2018. godine otkriveno 15 vrsta roda *Cytospora* povezanih s nastankom rak rana i sušenja grana badema, marelice, trešnje, pamuka, maslina, breskve, pistacije, šljive, šipka i oraha (Lawrence i sur. 2018.). Međutim, na mnogim vrstama drveća gljive iz roda *Cytospora* smatraju se tek fakultativnim parazitima rana koje napadaju oslabljena stabla, a također je poznato kako je prisutnost ovih patogena moguća i u zdravom biljnom tkivu, što bi sugeriralo da one mogu živjeti u biljkama domaćinima i kao endofiti (Lawrence i sur. 2018.).



**Slika 2.1.5.1.** Simptomi citosporioznog sušenja grana trešnje

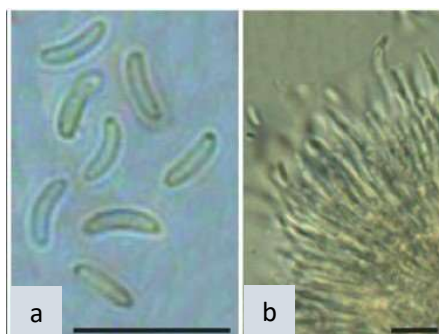
(Izvor: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6317586/> (Pristupljeno 30.7.2019.))

Vrste roda *Cytospora* / *Valsa* u nespolnom stadiju formiraju piknide ili piknostrome, a u njima se razvijaju i kroz otvore ostiola na površinu izlučuju prozirne, alantoidne konidije koje su infektivni inokulum patogena i odgovorne su za njegovo širenje u prirodi. Ono se odvija uglavnom putem kišnih kapi nošenih vjetrom pri čemu spore klijaju i inficiraju biljku domaćina putem pukotina i rana nastalih na kori prilikom obrezivanja biljke te putem ožiljaka nastalih na lišću, ozljeda nastalih od insekata i putem ozlijeđenih pupova koji su oštećeni hladnoćom (Lawrence i sur. 2018.). Temeljem Adams i sur. (2005.). Teleomorfi su rijetki, ne formiraju se u kulturi gljive i morfologija njihovih struktura često nije taksonomski korisna na razini vrste. Brojne vrste roda *Cytospora* važni su biljni patogeni pa je njihova identifikacija važna, a temelji se primarno na morfološkim obilježjima anamorfnog stadija gljive (npr. obilježjima konidiomata i konidija). Međutim, čak i samo na temelju morfoloških obilježja anamorfa, fitopatolozi često nisu u mogućnosti točno odrediti vrstu gljive. Povodom toga sve češće se u svrhu identifikacije uzročnika citosporioznog sušenja i propadanja stabala, koriste i dodatne molekularne metode identifikacije kao i provjere patogenosti gljiva uzročnika (Adams i sur. 2005.; 2006.).



### 2.1.6. *Cytospora granati* na šipku

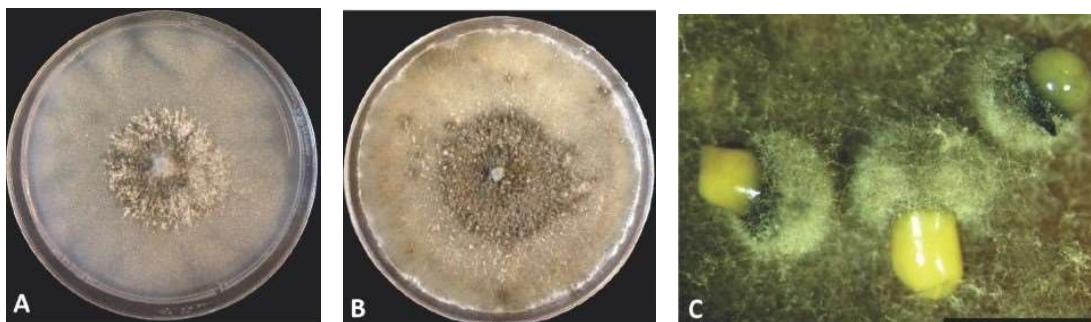
*Cytospora granati* novootkrivena je gljiva iz roda *Cytospora* koja izazivaju sušenje drva šipka. Izolirana je iz rak rana na šipku u Kaliforniji (SAD) (Lawrence i sur. 2018.). Gljiva formira nesporna plodna tijela (konidiomata) na hranjivoj podlozi PDA (engl. potato dextrose agar – krumpir dekstrozni agar) koja su piknidijalna, uglavnom solitarna, no ponekad dolaze u skupini. Bjelkaste su do svijetlosive boje, okruglasti su, stožasta do diskoidalna oblika, bez konceptakula i s konidijskim eksudatom žute boje. Konidiofori su im reducirani na ravne filamentozne konidiogene stanice (slika 2.1.6.1.). Konidije su alantoidne, relativno velike, jednostanične, te prozirne do svijetlosmeđe boje (slika 2.1.6.1.). Nije primijećen spolni stadij (Lawrence i sur. 2018.).



Slika 2.1.6.1. Konidije (a) i konidiofori vrste *C. granati*

(Izvor: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6317586/> (Pristupljeno 30.7.2019.))

Kolonija gljive na PDA, nakon 7 dana na 25 °C postiže promjer od 87,3 mm pa se *C. granati* smatra brzorastućom gljivom. Kolonija joj je bijele do tamnije smeđe boje, plodna tijela su piknidi i maslinasto su bijele boje s tamnim rubom (slika 2.1.6.2.). Hife su prozirne, glatke, ravne, razgranate i septirane (Lawrence i sur., 2018).



Slika 2.1.6.2. Morfološka obilježja vrste *C. granati* na hranjivoj podlozi PDA: A) kolonija nakon 7 dana; B) kolonija nakon 14 dana; C) piknidi sa žutim konidijskim eksudatom

(Izvor: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6317586/> (Pristupljeno 30.7.2019.))

*Cytospora granati* pripada u skupinu gljiva unutar roda *Cytospora* koje sadrže vrste izolirane iz eukaliptusa u Australiji (*C. austromontana*, *C. diatrypelloidea* i *C. eucalypticola*), Kaliforniji (*C. berkeleyi*), Čileu (*C. cinereostroma*) i Urugvaju (*C. disciformis*), te iz pistacije u Kaliforniji (*C. parapistaciae* i *C. pistaciae*). Lawrence i sur. (2018.) navode kako se *C. granati* lako razlikuje od *C. punicae* (koja isto dolazi na šipku) i to po veličini piknida (piknidi *C. granati* su promjera (610–) 673–897 (–975)  $\mu\text{m}$ , što je u prosjeku gotovo dvostruko veće u odnosu na promjer kod *C. punicae* koji je (210–) 237–383 (–490)  $\mu\text{m}$ ). Nadalje, rast kolonija *C. granati* (87,3 mm u 7 d) znatno je brži rast od onog kod *C. punicae* (64,7 mm u 7 d), a i boja te morfologija kolonija ovih dvaju gljiva znatno se razlikuje. Tako *C. granati* formira koloniju bijele do smeđe boje dok *C. punicae* ima karakteristično tamno crvenu koloniju (Lawrence i sur. 2018.).

### **2.1.7. *Cytospora punicae* na šipku**

Prvo izvješće o napadu drva šipka vrstom *Cytospora punicae* objavljeno je od strane Peduto Hand i sur. (2014.) koji navode kako je u voćnjacima u Kaliforniji u 2012. godini, zabilježeno intenzivno odumiranje grana šipka sorte „Wonderful“.

U 2015. u zapadnom Iranu Mahdikhani i Davoodi (2017.) također su zabilježili simptome odumiranja grana šipka u voćnjacima, na sorti „Atabaki“ pri čemu je bilo zaraženo oko 30% stabala u svakom voćnjaku. Simptomi su uključivali žućenje lišća, te pucanje kore na mjestu rana na granama, a unutar puknuća kore bila je vidljiva tamno smeđa promjena boje tkiva.

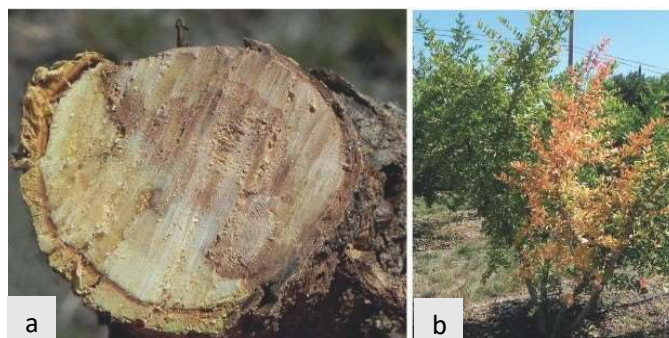
U Tunisu, Triki i sur. (2015.) tijekom svibnja i lipnja 2014. primijetili su snažno odumiranje grana šipka na sorti „Gabsi“ pri čemu je zabilježena infekcija kod 8 % biljaka. Simptomi su uključivali žućenje lišća, pojavu lezija, te rak rana.

*Cytospora punicae* također je utvrđena na šipku na Cipru gdje se ova voćna vrsta tek od nedavno uzgaja (Samouel i Kanetis 2016.). U kolovozu 2013. u voćnjaku šipka smještenog u planinskoj regiji Pitsilia zabilježene su znatne deformacije debla na sorti „Ermioni“. Stabla su bila starosti od 2 godine, a autori tvrde kako je gotovo 30 % stabala bilo izloženo nastanku rak rana u rasponu od 5 do 30 cm. Na mjestu rane kora je raspucala, a unutar puknuća bila je vidljiva promjena boje tkiva u crvenkasto smeđu. Lišće je požutjelo, dok je deblo bilo raspucano, što je prouzročilo propadanje biljke, no na granama nisu zabilježeni simptomi rak rana (Samouel i Kanetis 2016.).

Palavouzis i sur. (2015.) navode kako je u proljeće 2011, u sjevernoj Grčkoj na šipku sorte „Wonderful“ zamijećeno prisustvo truleži vrata korijena. Izolacijom s nekrotičnog područja nastala je kolonija gljive s bijelim micelijem, koji je kasnije postao zelene do tamno smeđe boje, patogen je identificiran kao *Cytospora punicae*.

Venter i sur. (2017.) opisuju kako je 2015. *C. punicae* zabilježena kao uzročnik truleži ploda šipka u blizini Uniondale i Wellington na Zapadnom rtu Južne Afrike, dok su Mincuzzi i sur. (2017.) u 2016. godini zabilježili *C. punicae* kao uzročnika truleži na plodovima šipka sorte „Wonderful“ na lokalnim tržnicama i u pakirnoj kući u pokrajini Lecce u Italiji.

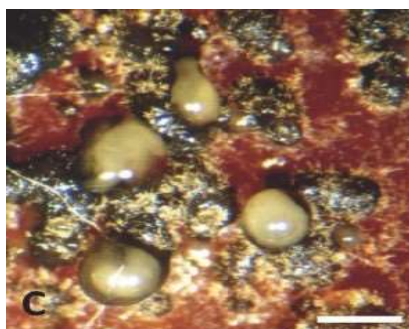
Lawrence i sur. (2018.) u periodu između 2010. i 2017. godine, sa stabala koja su pokazivala simptome propadanja (slika 2.1.7.1.), proveli su izolaciju brojnih vrsta *Cytospora* širom regije Središnje doline u Kaliforniji.



**Slika 2.1.7.1.** Promjena boje presjeka debla (a) i simptomi sušenja stabla šipka (b) uzrokovano vrstom *Cytospora punicae*

(Izvor: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6317586/> (Pristupljeno 30.7.2019.))

U navedenom istraživanju, osim *C. punicae*, iz istih stabala šipka izolirana je i ranije opisana gljiva *Cytospora granati*. Prema Lawrence i sur. (2018.) obje vrste gljiva imaju konidije sličnih dimenzija i oblika, dok su im piknostrome (slika 2.1.7.2.) različitog oblika i veličine, no razlikuju se i u morfološkim karakteristikama kolonije gljiva kako je ranije opisano (str. 8 i 9).

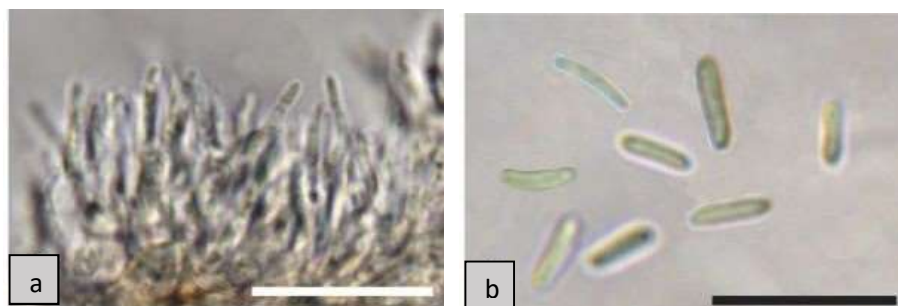


**Slika 2.1.7.2.** Prikaz plodnih tijela (piknostrome) *C. punicae*

(Izvor : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6317586/> (Pristupljeno 30.7.2019.))

*Cytospora punicae* izolirana je iz drva šipka sa simptomima rak rana, a izolirana gljiva na PDA formirala je konidiomate (piknostrome) u skupini, okruglastog do jajolikog oblika, bez konceptakula, crno sive boje s bijelim hifama, i s više unutarnjih lokula . Konidiofori su opisani kao pojedinačni s ravnim filamentoznim konidiogenim stanicama (slika 2.1.7.3.a). Konidije (slika 2.1.7.3.b ) nastaju u velikom broju, pojedinačne su, prozirne do svijetlosmeđe boje, bez septi,

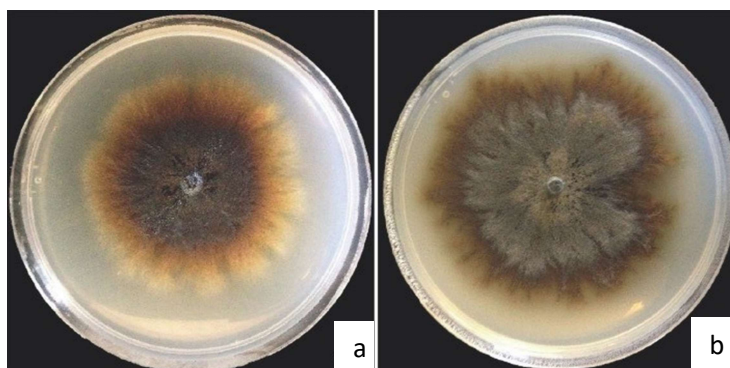
alantoidne, dimenzija (3,5–) 3,8–4,6 (–5,0) × (0,5–) 0,8–1,0 (–1,0) μm.. Nije primijećen spolni stadij. Autori navode kako kolonija gljive na PDA, nakon 7 dana na 25 °C postiže promjer od 64,7 mm.



**Slika 2.1.7.3.** Konidiofori *C. punicae* s filamentoznim konidiogenim stanicama (a) i konidije (b)

(Izvor: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6317586/> (Pristupljeno 30.7.2019.))

*Cytospora punicae* spada u skupinu srednje rastućih gljiva. Na PDA kolonija poprima tamnocrvenu boju (slika 2.1.7.4.), a s vremenom postaje svjetlija. Hife su prozirne, glatke, ravne, razgranate i septirane.



**Slika 2.1.7.4.** Izgled kolonije gljive *C. punicae* na PDA nakon 7 (a) i 14 dana (b)

(Izvor : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6317586/> (Pristupljeno 30.7.2019.))

Lawrence i sur. (2018.), na temelju filogenetske analize, dolaze do zaključka kako je gljiva *Cytospora myrtagena* najsirodnija vrsti *C. punicae*.

### 3. CILJ I HIPOTEZA

Temeljem zapažanja pojave simptoma sušenja i propadanja stabala šipka raznolikog sortimenta na području Dalmacije, cilj je bio sakupiti uzorke drvenastih dijelova simptomatskih i asimptomatskih stabala šipka s različitih lokaliteta, s ciljem utvrđivanja moguće prisutnosti fitopatogenih gljiva, koje bi se potom identificirale te bi im bila provjerena patogenost na šipku.

Hipoteza, s obzirom na izgled simptoma i učestalost pojave bolesti drva šipka uzrokovanog s *C. punicae* u drugim zemljama, jest da simptome uočene na šipku u Dalmaciji uzrokuje fitopatogena gljiva/e, pri čemu se sumnja da je uzročnik upravo *C. punicae*.

## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. Uzorkovanje drva šipka

U razdoblju od 2017. do 2019. godine na području Dalmacije sakupljeni su uzorci drva šipka. Uzorkovanje se sastojalo od rezidbe izboja, a po mogućnosti i debla šipka, za što su korištene alkoholom sterilizirane škare. Iako je cilj bio uzorkovati stabla šipka neovisno o prisustvu simptoma bolesti drva, potpuno asimptomatska stabla bila su rijetkost pa su u 8 od 9 slučajeva uzorkovana stabla sa simptomima promjena na kori, sušenja vršnih izboja i kloroze listova u dijelu krošnje. Uzorci su označeni i u što kraćem roku dopremljeni u fitopatološki laboratorij Zavoda za fitopatologiju Agronomskog fakulteta u Zagrebu i podvrgnuti postupku izolacije gljiva na hranjivu podlogu, te daljnjoj obradi.

### 4.2. Izolacija gljiva i dobivanje čistih izolata

Uzorcima zaraženih grančica uklonjena je kora, a potom su steriliziranim škarama odrezani mali fragmenti drva s granice zdravog i bolesnog tkiva, te su isprani pod mlazom tekuće vode. Odmah nakon, isti su podvrgnuti površinskoj sterilizaciji koja podrazumijeva uranjanje fragmenata drva 30 sekundi u 70% etanol, nakon čega slijedi sterilizacija u 3% otopini natrijevog hipoklorita (NaOCl) u trajanju od 15 sekundi te ispiranje fragmenata u dovoljnoj količini sterilne destilirane vode. Fragmenti drva potom su kroz 10 minuta osušeni strujanjem zraka dok su bili postavljeni na sterilnom filter papiru u sterilnoj komori (tzv. „laminaru“) (VBH Compact, Steril, Italija) te su potom sterilnom pincetom postavljeni u prethodno pripremljene Petrijeve zdjelice na hranjivu podlogu. Kao hranjiva podlogu korišten je PDA (engl. potato dextrose agar) (Biolife, Italija) kojem je dodan antibiotik streptomycin-sulfat (Krka d.o.o., Slovenija) u konačnoj koncentraciji 50 µg/mL hranjivog medija (PDA-Strep). Petrijeve zdjelice inkubirane su u termostatu u mraku na 25 °C do pojave mladih kolonija gljiva koje su potom presađene u nove Petrijeve zdjelice s hranjivom podlogom PDA te kultivirane kako je ranije opisano. Za dobivanje čistih izolata gljiva koje su producirale spore, korištena je metoda monosporne izolacije tako što je kapljica suspenzije spora, prethodno serijski razrijeđena u sterilnoj vodi, razmazana po površini vodenog agara (WA) u Petrijevoj zdjelici. Nakon inkubacijskog perioda potrebnog da spore prokliju i postanu vidljive pod binokularom, segment WA s jednom sporom prenesen je u novu Petrijevu zdjelicu na PDA i inkubiran kao je već opisano. Ukoliko gljiva nije sporulirala, čisti izolati dobiveni su izrezivanjem vrha jedne hife s ruba mlade kolonije i kultivirani kao i u slučaju monosporne izolacije. Dobiveni čisti izolati gljiva provizorno su identificirani prema morfolologiji kolonija, te po mogućnosti prema karakteristikama konidiomata i spora, te je provedeno njihovo grupiranje u tri grupe. Kako su svi izolati iz grupe 3 identificirani kao tipične saprofitne vrste gljiva, iste nisu dalje obrađivane. Izolate iz grupe 1, provizorno identificiranima kao vrsta *Cytospora* sp., te neidentificiranim izolatima iz grupe 2, odabrani su reprezentativni izolati koji su podvrgnuti daljnjoj morfološkoj karakterizaciji i identifikaciji.

### **4.3. Fenotipska karakterizacija izolata grupe 1 i 2**

Fenotipska karakterizacija izolata grupe 1 uključivala je analizu morfoloških obilježja izolata na hranjivoj podlozi PDA i to obilježja kolonija, stromatičnih struktura (piknostroma) i konidija, a dodatno je izmjerena brzina rasta kolonija pri različitim temperaturama. Izolatima grupe 2 bilo je moguće samo zabilježiti obilježja kolonija na PDA, zbog izostanka pojave bilo koji drugih identifikacijskih struktura.

#### **4.3.1. Obilježja kolonija izolata grupe 1 i 2**

Pet reprezentativnih izolata grupe 1 i izolati grupe 2 kultivirani su na PDA u mraku na 25 °C. Pregled izgleda kolonija navedenih izolata proveden je nakon 5, 15 i 30 dana, pri čemu su im analizirani boja kolonije na licu i naličju, oblik ruba, te pojava plodnih tijela i sporulacije.

#### **4.3.2. Obilježja piknostroma i konidiogenog sloja izolata grupe 1**

Svi izolati grupe 1 na PDA su redovito formirali stromatična nesporna plodna tijela u vidu piknostrome kojima su promatrane dimenzije i oblik te grupiranje, a za potrebu analize rasporeda lokula u njima, piknostrome su uzdužno presječene skalpelom te promatrane pod stereomikroskopom. Također, iz lokula piknostroma skalpelom je zahvaćen sloj konidiogenih stanica i potom je promatran i fotografiran pod običnim i polariziranim osvjetljenjem uklopljen u 83 %-tnoj mliječnoj kiselini pri povećanju 1000 X uz korištenje imerzijskog objektiva svjetlosnog mikroskopa (Leica DMR HC, Leica Microsystems, Wetzlar, Njemačka).

#### **4.3.3. Biometrijska obilježja spora izolata grupe 1**

Odabranim reprezentativnim izolatima grupe 1, kultiviranima na PDA u termostatu pri temperaturi od 25°C u trajanju od 14 dana, promatrani su boja i oblik konidija korištenjem svjetlosnog mikroskopa kako je ranije opisano, te su izmjerene njihove dimenzije (duljina i širina) pomoću programa za analizu mikroskopskih fotografija ponuđenog u okviru korištenog svjetlosnog mikroskopa. Svakom izolatu izmjereno je 50 konidija, te su izračunate srednje vrijednosti i standardna odstupanja izmjerenih dimenzija uz njihove minimalne i maksimalne vrijednosti. Također su izračunati 95 %-tni intervali pouzdanosti za utvrđene srednje vrijednosti dimenzija korištenjem funkcije CONFIDENCE.NORM (uz  $\alpha = 0,05$ ) unutar softverskog programa Microsoft Excel.

#### **4.3.4. Brzina rasta izolata grupe 1**

Za mjerenje brzine rasta micelija izolata grupe 1 korišteno je 5 reprezentativnih izolata. Oni su kultivirani u triplicatu u Petrijevim zdjelicama promjera 9 cm na PDA u mraku, na četiri različite temperature (4, 25, 32 i 37°C) u trajanju od 7 dana, nakon čega su im izmjereni promjer (umanjen za dimenzije središnjeg kružnog segmenta PDA kao izvorišta rasta kolonije) i izračunate prosječne vrijednosti dobivenih dimenzija.

#### **4.3.5. Pokušaj stimulacije izolata grupe 1 na formiranje teleomorfno stadija**

S ciljem provjere mogućeg razvitka struktura teleomorfno stadija izolata gljiva iz grupe 1 (Lawrence i sur. 2018.), reprezentativni izolati kultivirani su na različitim hranjivim podlogama i to na PDA i 2%-tnom PDA s dodatkom autoklaviranih segmenata grančica trešnje te na zobenom agaru. Inkubacija je provedena na laboratorijskoj klupi u trajanju od 2 tjedna do 2 mjeseca, pri sobnoj temperaturi (oko 20 – 25°C) i dnevnom osvjetljenju.

#### **4.4. Molekularna karakterizacija izolata grupe 1 i 2**

Da bismo potvrdili točnost provizorne identifikacije izolata grupe 1, odnosno pokušali identificirati izolate grupe 2, provedena je molekularna analiza. Za nju je bilo potrebno izolirati ukupnu genomsku DNA izolata, te u njoj analizirati odsječke koji služe kao molekularni markeri za identifikaciju gljiva. Analizirani su molekularni markeri ITS i EF1- $\alpha$ , a za njihovo umnažanje metodom lančane reakcije polimerazom (PCR), korištene su početnice ITS5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3') i ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (White i sur. 1990., preuzeto iz Kaliterna 2013.), odnosno početnice EF1-728F (5'-CAT CGA GAA GTT CGA GAA GG-3') i EF1-986R (5'-TAC TTG AAG GAA CCC TTA CC-3') (Carbone i Kohn 1999., preuzeto iz Kaliterna 2013.). Nakon umnažanja molekularnih markera ITS i EF1- $\alpha$ , provedeno je njihovo sekvenciranje, te su dobivene sekvence uspoređene s odgovarajućim sekvencama u međunarodnoj bazi podataka GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) korištenjem bioinformatičkog alata BLAST. Temeljem navedene usporedbe, doneseni su zaključci o taksonomskoj pripadnosti izolata grupa 1 i 2, a za izolate grupe 1 dodatno je provedena filogenetska analiza metodom Maximum Likelihood u programskom paketu MEGA verzija 7.

##### **4.4.1. Izolacija ukupne genomske DNA izolata gljiva**

Za provedbu molekularne analize, iz stanica micelija izolata gljiva potrebno je izolirati DNA. Ponajprije je provedena kultivacija odabranih izolata gljiva na PDA, u trajanju od 7 dana, u termostatu na 25°C, a zatim je kružnim sječivom promjera 3 mm uzeto 6 komadića koloniziranog rubnog dijela PDA, te je ravnomjerno preneseno na plastičnu foliju s mikroporama kojom je prekriven PDA, u Petrijevu zdjelicu promjera 9 cm, nakon čega je provedena inkubacija u termostatu na 25 °C. Nakon inkubacije i razvitka dovoljne količine mladog micelija, uz pomoć sterilne metalne lopatice 50 - 100  $\mu$ g micelija (po uzorku) sastrugano je i umetnuto u 2 mL Eppendorf tubice, a korišteno je odmah ili je pohranjeno na -20°C. U Eppendorf tubice sa sakupljenim micelijem dodano je 50  $\mu$ g autoklaviranih staklenih kuglica (Sigma Aldrich, SAD), te su tubice potopljene u tekući dušik na 5 minuta i stavljene na led. U digestoru je u svaku od navedenih tubica s micelijem dodano po 250  $\mu$ L fenola (Sigma, Aldrich SAD), 250  $\mu$ L kloroforma (Kemika, Zagreb) i 0,5 mL pufera za lizu. Pufer je bio prethodno pripremljen dodatkom 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA, 2 % Triton X-100, 1 % SDS i 1 % PVP (SigmaAldrich, SAD). U nastavku je provedeno vorteksiranje tubica 20 min, pri 1400 okretaja u minuti, slijedi centrifugiranje pri 13500 okretaja/min (rpm) kroz 25 minuta na temperaturi od 4°C.



Nastali supernatant s vodenom otopinom DNA i RNA (300 – 400  $\mu\text{L}$ ) prenesen je u novu Eppendorf tubicu od 1,5  $\mu\text{L}$  u koju je dodan isti volumen hladnog izopropanola ( $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ), (Kemika, Zagreb). Nakon blagog miješanja, tubice su centrifugirane pri 13500 okretaja u minuti 10 min pri temperaturi od  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . Dobiveni talog na dnu tubica sadržavao je nukleinske kiseline koje su, nakon odlijevanja supernatanta, isprane s 1 mL 70% hladnog etanola ( $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ), a tubice su zatim centrifugirane pri 13500 okretaja u minuti na 10 minuta pri  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . Nakon centrifugiranja ponovno je uklonjen supernatan, a talog je osušen na zraku ili u sterilnoj komori uz pomoć strujanja zraka. U tubicu s osušenim talogom je dodano 50  $\mu\text{L}$  TE pufera (pH 8.0, Promega, Madison, SAD) s dodatkom 1  $\mu\text{L}$  RNaze-A (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Sigma-Aldrich, SAD), a tubica je potom inkubirana na  $55\text{ }^\circ\text{C}$ , 15 minuta (Santos i sur. 2009., preuzeto iz Kaliterna 2013.).

#### **4.4.2. Umnažanje odsječaka ITS i/ili EF1- $\alpha$ metodom PCR**

Metodom PCR-a umnoženi su specifični odsječci DNA molekularnih markera ITS i EF1- $\alpha$ . Za umnažanje ITS regije korištene su početnice ITS5 i ITS4, dok su za umnažanje molekularnog markera EF1- $\alpha$  korištene početnice EF1-728F i EF1-986R.

Za umnažanje ITS regije reakcijska smjesa sadržavala je 25  $\mu\text{L}$  reakcijske smjese iz PCR kita Emerald Amp® MAX PCR MasterMix (Takara BIO INC, Japan), 1 % DMSO, 12.5 pmol početnice ITS5 i 12.5 pmol početnice ITS4, 50 ng DNA predloška u volumenu od 50  $\mu\text{L}$  (Marin, 2016). Reakcija umnažanja ITS regije odvijala se u termocikleru Mastercycler (Eppendorf AG, Hamburg, Njemačka) gdje su se vrijednosti i trajanje reakcije mijenjali pri određenim temperaturama: početno zagrijavanje odvijalo se 10 minuta na  $95\text{ }^\circ\text{C}$ , u nastavku je provedeno 35 ciklusa umnažanja. Umnažanje je provedeno u 3 koraka. Prvi korak je uključivao umnažanje na  $94\text{ }^\circ\text{C}$  u 30 sekundi, drugi korak na  $55\text{ }^\circ\text{C}$  u 30 sekundi, a treći korak na  $72\text{ }^\circ\text{C}$  u 60 sekundi. Nakon posljednjeg ciklusa uslijedila je završna elongacija na  $72\text{ }^\circ\text{C}$  kroz 10 minuta (Marin 2016.).

Za umnažanje molekularnog markera EF1- $\alpha$  reakcijska smjesa sadržavala je 25  $\mu\text{L}$  reakcijske smjese iz PCR kita Emerald Amp® MAX PCR MasterMix (Takara BIO INC, Japan), 1 % DMSO, 12.5 pmol svake od početnica, 50 ng DNA predloška u volumenu od 50  $\mu\text{L}$  (Marin 2016.). Reakcija umnažanja molekularnog markera EF1- $\alpha$  odvijala se u termocikleru Mastercycler (Eppendorf AG, Hamburg, Njemačka) pod uvjetima: početno zagrijavanje odvijalo se 3 minute na  $95\text{ }^\circ\text{C}$ , u nastavku je provedeno 35 ciklusa umnažanja. Umnažanje je provedeno u 3 koraka. Prvi korak je uključivao umnažanje na  $94\text{ }^\circ\text{C}$  u 30 sekundi, drugi korak na  $55\text{ }^\circ\text{C}$  u 30 sekundi, a treći korak na  $72\text{ }^\circ\text{C}$  u 60 sekundi. Nakon posljednjeg ciklusa uslijedila je završna elongacija provedena na  $72\text{ }^\circ\text{C}$  kroz 5 minuta (Marin 2016.).

#### **4.4.3. Horizontalna gel elektroforeza**

Da bi potvrdili uspješnost PCR reakcije i provjerili veličinu PCR produkata primijenjena je horizontalna gel elektroforeza (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, SAD) u 1,5 %-tnom agaroznom gelu (Sigma Aldrich, SAD) s dodatkom boje „GelRed“ (Olerup SSP, Švedska) u konačnoj koncentraciji 5-10  $\mu\text{L}/20\text{ mL}$  gela. Korišteni elektroforetski pufer bio je 0,5 %-tni TBE (Sigma

Aldrich, SAD), elektroforeza je provedena u trajanju od 30 min pri 75 V. Kao standardni marker za molekularnu težinu DNA korišten je „100bp Ladder“ (Ladder 100 – 1500 pb, Intron Biotechnology, Koreja). Rezultati su očitani pod UV svjetlom korištenjem transiluminatora (Marin 2016.).

#### **4.4.4. Sekvenciranje PCR produkata**

Kako bi se utvrdio redosljed nukleotida umnoženih odsječaka DNA molekularnih markera ITS i EF1- $\alpha$ , PCR produkti su poslani u biotehnošku kompaniju Macrogen Europe (Macrogen Europe Inc., Amsterdam, Nizozemska), gdje su pročišćeni i sekvencirani. Za svaki molekularni marker sekvenciranje je provedeno u oba smjera sa početnicama koje su korištene za njihovo umnažanje, a uređaj za sekvenciranje bio je automatski sekvencer ABI3730XL (Applied Biosystems, SAD).

#### **4.4.5. BLAST i filogenetska analiza**

Obrada dobivenih sekvenci molekularnih markera ITS i EF1- $\alpha$  izolata grupe 1 i 2, te filogenetska analiza samo izolata grupe 1 provedena je uz pomoć programskog paketa MEGA verzija 7. U tom programu sekvence DNA poravnate su pomoću modula „Alignment explorer“, uređene su u smjeru 5' prema 3', te su pohranjene u tekstualnu datoteku u FASTA formatu.

Molekularna identifikacija izolata gljiva kao u istraživanju Kaliterna (2013.) provedena je usporedbom DNA sekvenci ITS regije genoma i dijela EF1- $\alpha$  gena pojedinih izolata, s odgovarajućim sekvencama referentnih izolata pohranjenima u međunarodnoj bazi podataka GenBank. Usporedba je provedena pomoću programa BLAST (Basic Logical Alignment Search Tool) na internet adresi:

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE=BLASTHome>.

Temeljem postotka podudarnosti sekvenci uspoređivanih izolata donesen je zaključak o pripadnosti izolata dotičnoj vrsti.

U svrhu dodatne potvrde podudarnosti sekvenci, provedena je filogenetska analiza metodom Maximum Likelihood. Kreirano je prvo filogenetsko stablo bazirano samo na ITS sekvencama izolata grupe 1 i odgovarajućih referentnih sekvenci preuzetih iz baze GenBank (prikazano je u dodatku, str 39), odnosno drugo filogenetsko stablo bazirano na kombiniranim ITS i EF1- $\alpha$  sekvencama (ITS+EF1- $\alpha$ ) po podudarnom postupku kako je opisano za prvo filogenetsko stablo (Kaliterna 2013.). Prilikom izrade filogenetskog stabla korištena je metoda Maximum Likelihood prema sljedećim postavkama: „Substitution Type“ = Nucleotide; „Model / Method“ = General Time Reversible model; „Rates among Sites“ = Gamma distributed with Invariant sites (G + I); „No of Discrete Gamma Categories“ = 6; „Gaps / Missing Data Treatment“ = Complete deletion; „ML Heuristic Method“ = Nearest-Neighbor-Interchange (NNI); „Initial Tree for ML“ = Make initial tree automatically; „Branch Swap Filter“ = Very Strong (Phillips i sur. 2012.). Filogenetska stabla vizualizirana su u modulu „Phylogeny“ programskog paketa MEGA 7.

#### 4.5. Test patogenosti izolata grupe 1

Izolatima grupe 1, predstavljenima sa pet reprezentativnih izolata, provjerena je patogenost na šipku metodom umjetne inokulacije. Prvo su izolati gljiva kultivirani 14 dana u mraku na 25°C, a potom su na rubu kolonije kružnim sjekačem izbušeni kružni komadići hranjive podloge PDA s micelijem. Steriliziranim kružnim sjekačem istih dimenzija napravljene su ozljede promjera 5 mm i dubine 3 mm na deblu jednogodišnjih sadnica šipka, sorti Glavaš i Barski slatki (slika 4.5.1.) te je u ozljede umetnut komadić PDA s micelijem pojedinog izolata. Ozljede su potom zaštićene od isušivanja premazivanjem manjom količinom Vazelina te omotane Parafilmom (Parafilm, Behr, Njemačka) u nekoliko slojeva. Kao negativna kontrola, 10 sadnica svake sorte inokulirano je na opisani način sterilnim komadićem PDA bez prisustva izolata gljive.



**Slika 4.5.1.** Prikaz načinjenih ozljeda prilikom umjetne inokulacije stabljike šipka

Umjetno inokulirane biljke posložene su slučajnim bloknim rasporedom i čuvane su u plasteniku (slika 4.5.2.) na temperaturi od 25±3°C, uz redovito zalijevanje svaka 2 – 3 dana. Devet mjeseci od inokulacije, na uzdužnom presjeku stabljike provedeno je mjerenje duljine nastalih nekrotičnih promjena iznad i ispod mjesta inokulacije. Kako bi se utvrdilo postoji li statistički značajna razlika srednjih vrijednosti izmjerenih nekrotičnih promjena u drvu šipka, između različitih tretmana na obje sorte, provedeni su analiza varijance (ANOVA) te Tukey-Kramer HSD test uz P vrijednost od 0.01%. Navedene statističke analize provedene su u programskom paketu JMP verzija 14 (SAS Institute, SAD). Kako bi se zadovoljili Kochovi postulati, s dijela inokulirane stabljike šipka, a nakon provedenog mjerenja, uzeti su komadići tkiva s granice nekrotičnog i zdravog dijela stabljike, te su prenijeti na hranjivu podlogu PDA-Strep u svrhu reizolacije gljive uzročnika. Identifikacija reizoliranih gljiva provedena je na temelju morfoloških obilježja kolonija i/ili konidija kako je ranije opisano.



**Slika 4.5.2.** Čuvanje biljaka šipka u plasteniku na temp. od 25±3°C, u trajanju od 9 mjeseci

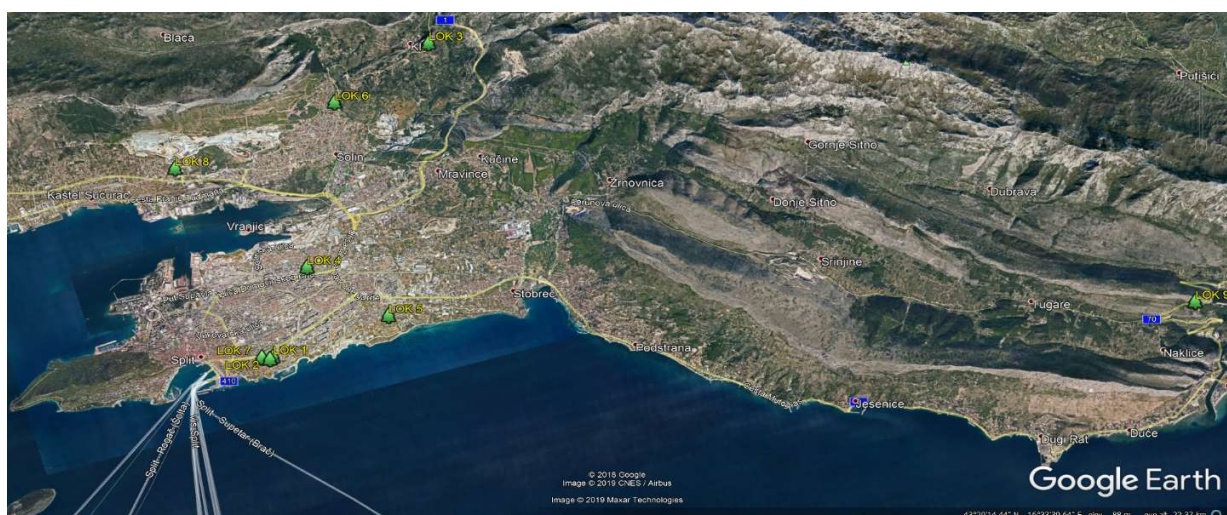
## 5. REZULTATI I DISKUSIJA

### 5.1 Rezultati uzorkovanja drva šipka

Tijekom razdoblja od 2017. do 2019. godine na području Dalmacije na 9 lokaliteta (slika 5.1.2.) sakupljeno je 11 uzoraka debla i grana simptomatskih i jedne asimptomatske biljke šipka (slika 5.1.1., Tablica 5.2.1). Za razliku od drugih dosadašnjih istraživanja na šipku, uzorkovane biljke pronađene su u urbanoj i suburbanjoj sredini gdje se šipak uzgaja kao ukrasna i voćna vrsta oko okućnica i uz rubove polja i vinograda.



Slika 5.1.1. Stablo šipka sa simptomima sušenja u parku u Splitu



Slika 5.1.2. Mapa lokaliteta s kojih su sakupljeni uzorci drva šipka

Od 11 uzoraka, samo uzorak s Lokaliteta 7 nije pokazivao simptome koji bi upućivali na bolest drva. Svi ostali uzorci pokazivali su simptome bolesti drva, a bili su slični onima opisanima kod Lawrence i sur. (2018.) i drugih autora (Peduto Hand i sur. 2014.). Uključivali su žućenje lišća te njihovo opadanje sa bolesnog dijela krošnje, odvajanje i pucanje kore biljaka i nastanak rak rana uslijed sušenja debla i grana. Na presjeku debla i grana moguće je bilo uočiti promjenu boje tkiva iz zdravog koje je žućkaste boje, u zaraženo koje poprima smeđu boju i nekrotizira, a kao krajnji rezultat bolesti dolazi do potpunog propadanja stabala šipka (slika 5.1.3.).



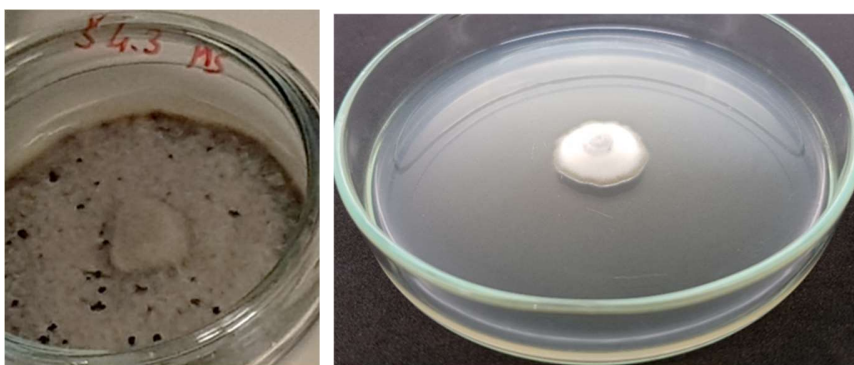
**Slika 5.1.3.** Simptomi bolesti drva na stablima šipka u Dalmaciji – pucanje kore debla (a), rak rane (b), raspucala kora mlade sadnice šipka (c), smeđenje provodnog tkiva u drvu šipka (d)

**Tablica 5.2.1.** Popis lokaliteta sakupljanja uzoraka uz pregled broja uzoraka, te broja dobivenih izolata gljiva i identificiranih taksona po lokalitetu.

Lokalitet	GPS koordinate	Uzorci šipka	Broj izolata gljiva	Broj takosna gljiva
Lok 1	43°30'8.30"N 16°27'26.35"E	Š0	3	1
Lok 2	43°30'6.57"N 16°27'23.04"E	Š1	3	1
Lok 3	43°33'27.59"N 16°31'27.23"E	Š2	5	3
	43°33'27.16"N 16°31'28.08"E	Š3	3	1
Lok 4	43°31'7.53"N 16°28'25.87"E	Š4	3	3
Lok 5	43°30'14.54"N 16°29'24.82"E	Š5	6	3
	43°30'14.46"N 16°29'23.24"E	Š6	4	2
Lok 6	43°33'3.46"N 16°29'43.58"E	Š7	3	3
Lok 7	43°30'9.48"N 16°27'16.59"E	Š8	1	1
Lok 8	43°32'47.39"N 16°26'58.85"E	Š9	2	1
Lok 9	43°27'40.09"N 16°41'23.69"E	Š10	3	1
Σ		Ukupno 11 uzoraka	36	6

## 5.2. Rezultat izolacije i provizorne identifikacije izolata na temelju morfoloških obilježja kolonija i plodnih tijela na PDA

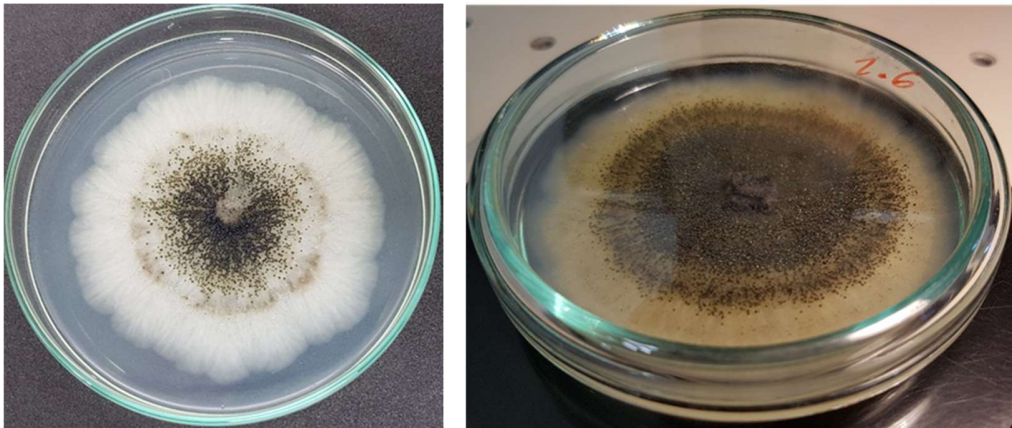
Izolirano je ukupno 36 izolata gljiva koji su grupirani kako je opisano u prethodnom poglavlju. Izolati grupe 3 identificirani su odmah prema morfološkim obilježjima kolonija na PDA, te je utvrđeno da grupu 3 čine gljive rodova *Alternaria*, *Penicillium* i *Aspergillus*, dotični izolati nisu dalje obrađivani, budući je zaključeno kako se radi o tipičnim ubikvističkim saprofitima. Izolati grupe 2 (izolati Š4.3 i Š7.4) nisu identificirani zbog izostanka morfoloških obilježja koja bi to omogućila. Izolat Š4.3. formirao je sivu pamučastu koloniju s crnim stromatičnim strukturama, no spore nisu pronađene (slika 5.2.1. lijevo), dok je izolat Š7.4 okarakteriziran kao spororastuća gljiva bijelog micelija kojem su rubovi kolonije s vremenom postali sive boje (slika 5.2.1. desno). Zaključeno je da će se izolati grupe 2 pokušati identificirati analizom molekularnog markera ITS, kao najzastupljenijeg markera u uporabi za identifikaciju gljiva.



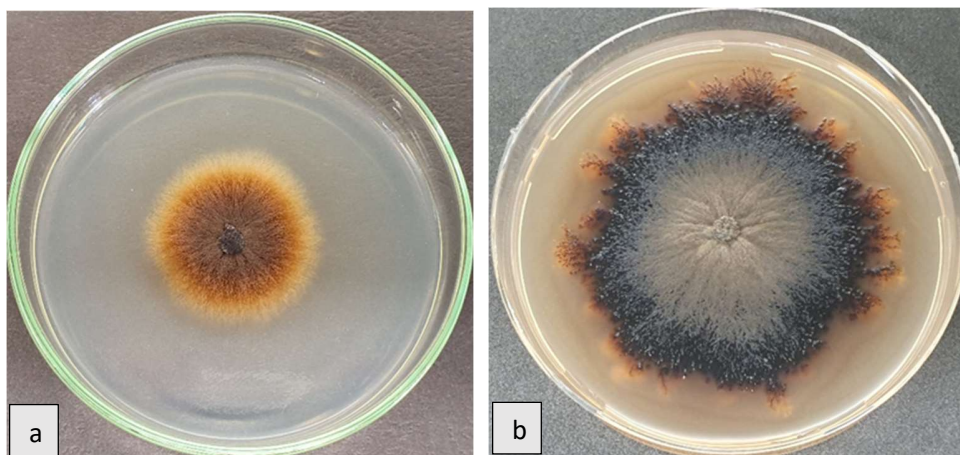
Slika 5.2.1. Izolati grupe 2: Š4.3 (lijevo) i Š7.4 (desno)

Izolati grupe 1 provizorno su identificirani kao vrsta *Cytospora punicae*, budući su se njihove morfološke karakteristike podudarale s onima opisanima kod drugih autora (Peduto Hand i sur. 2014; Mahdikhani i Davoodi 2017. i dr.). Pa su tako mlade gljivične kolonije na PDA bile blago izdignute, baršunaste strukture s laticastim oblikom ruba, s u početku bijelim micelijem koji je postupno mijenjao boju u maslinasto zelenu do tamno smeđu uz obilnu produkciju plodnih tijela u vidu stromatičnih struktura piknidijskog tipa, tj. . piknostroma i konidija (slika 5.2.2.). Hife izolata grupe 1 bile su prozirne, glatke, ravne i razgranate.

Isti izolati su pokazali promjenjivost obilježja kolonija u ovisnosti o varijaciji vanjskih čimbenika poput manjih varijacija u koncentraciji hranjive podloge te varijacije temperature i osvjetljenja. Tako su izolati grupe 1 također imali i kolonije crveno smeđe boje koje s vremenom postaju tamnije crveno smeđe, a središnji dio kolonije daljnjim starenjem postaje baršunast i sivo smeđe boje (slika 5.2.3.), kakve su opisane u istraživanju Lawrence i sur. (2018.).

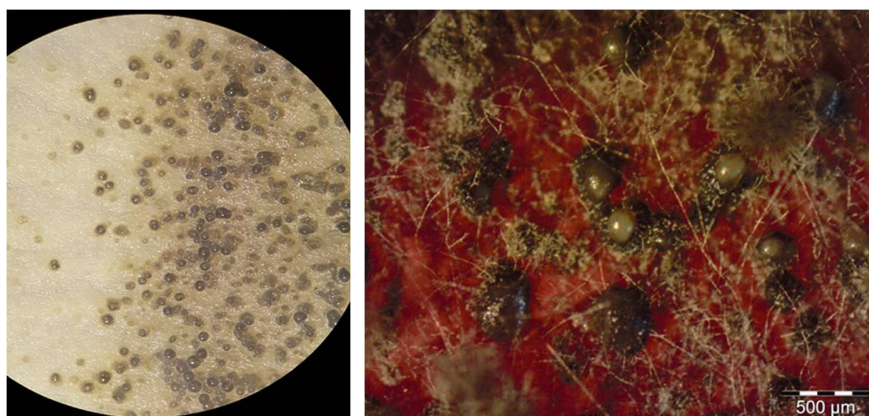


**Slika 5.2.2.** Kolonije i piknostrome izolata grupe 1 (*C. punicae*) na PDA



**Slika 5.2.3.** Kolonije izolata grupe 1 (*C. punicae*) na PDA s ekspresijom fenotipa s crveno smeđom kolonijom: kolonija nakon 5 dana (a), kolonija nakon 15 dana (b)

Plodna tijela nespolnog stadija gljive bile su stromatične strukture piknidijskog tipa tj. piknostrome. One su se formirale u gustom rasporedu, prvo od središta pa prema periferiji kolonije, tamno smeđe do crne su boje, bez konceptakula, okruglog do blago spljoštenog oblika, te po svojim obilježjima odgovaraju opisima drugih autora za vrstu *C. punicae* (slika 5.2.4.) (Lawrence i sur. 2018.).



**Slika 5.2.4.** Piknostrome s eksudatima spora

U uzdužnom presjeku piknostroma izolata grupe 1 uočeno je kako imaju više lokula koje su odijeljene uvrnućima i imaju zajednički zid (slika 5.2.4.) što je konzistentno s opažanjima Lawrence i sur. (2018.) za vrstu *C. punicae*. Prema opisima Adams i sur. (2005.) zaključeno je da opaženi raspored navedenih lokula u piknostromama najvjerojatnije pripada labirintičnom citosporioidnom tipu. Konidiofori su bili prozirni, ravni ili s kratkim bočnim ograncima koji su na vrhu imali po jednu filamentoznu konidiogenu stanicu koja se sužava prema vrhu (slika 5.2.4.). Razgranati konidiofori uobičajen su tip konidiofora kod mnogih vrsta iz roda *Cytospora* (Crous i sur. 2019.), no za razliku od ovog istraživanja, Lawrence i sur. (2018.) ne spominju postojanje razgranatih konidiofora.

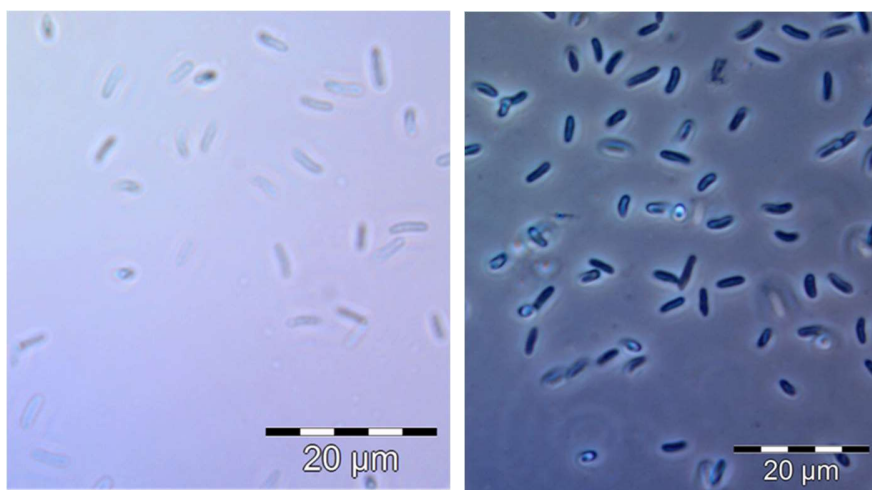


**Slika 5.2.5.** Poprečni presjek piknostrome (lijevo), konidiogeni sloj stanica (u sredini) i razgranati konidiofor s filamentoznim konidiogenim stanicama (desno)



### 5.3. Identifikacija izolata grupe 1 (*C. punicae*) prema biometrijskim obilježjima konidija

Za biometrijsku analizu obilježja konidija izolata iz grupe 1 odabrano je 6 reprezentativnih izolata (Š0.0, Š1.6, Š5.4, Š6.3, Š7.1 i Š9.1). Konidije su dolazile u velikom broju, a bile su prozirne do svijetlo smeđe boje, alantoidne, bez gutula i jednostanične (slika 5.3.1.), no s vremenom su se kod starijih eksudata spora mogle uočavati i višestanične spore s jednom do dvije septe (slika 5.3.2.), što je konzistentno opisu konidija vrste *C. punicae* u istraživanju Lawrence i sur. (2018.), iako isti autori ne spominju postojanje septiranih konidija.



Slika 5.3.1. Konidije izolata grupe 1 pod običnim (lijevo) i polariziranim (desno) osvjetljenjem



Slika 5.3.2. Septirane konidije kod izolata grupe 1

Za analizu biometrijskih obilježja konidija odabran je reprezentativni izolat (0.0), a utvrđene dimenzije spora prikazane su u tablici 5.3.1. Navedene dimenzije nalaze se u rasponu dimenzija konidija vrste *C. punicae* utvrđenima u istraživanju drugih istraživača (tablica 5.3.2) (Lawrence i sur. 2018.), a očigledna varijabilnost tih dimenzija između različitih istraživanja sugerira znatnu plastičnost veličina konidija ove vrste.

Također, teleomorfni stadij izolata grupe 1 nije utvrđen u ovom istraživanju što je konzistentno s rezultatima drugih istraživanja vrste *C. punicae* (Lawrence i sur. 2018.).

**Tablica 5.3.1.** Dimenzije konidija izolata Š0.0 iz grupe 1 (*C. punicae*)

<b>Dimenzije konidija (<math>\mu\text{m}</math>) izolata Š0.0</b>	
<b>Veličina konidija (<math>D \times \check{S}</math>)<sup>†</sup></b>	<b>Srednja vrijednost <math>\pm</math> S.D.<sup>§</sup></b>
(2,21-) <b>3,78 – 3,92</b> (-5,78) $\times$ (0,95-) <b>1,24 – 1,28</b> (-1,5)	<b>3,85 <math>\pm</math> 0,43 <math>\times</math> 1,26 <math>\pm</math> 0,11</b>

<sup>†</sup> - Dimenzije su iskazane kao raspon od donje do gornje granice intervala pouzdanosti od 95 %, a u zagradama su prikazane minimalne i maksimalne vrijednosti izmjerenih dimenzija; <sup>§</sup> - srednja vrijednost dimenzija ( $D \times \check{S}$ ) i standardno odstupanje (S.D.).

**Tablica 5.3.2.** Dimenzije konidija za *Cytospora punicae* u istraživanjima drugih istraživača

<b>Konidije (<math>D \times \check{S}</math>) (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Referenca</b>
(3.5-) <b>3.8 – 4.6</b> (-5.0) $\times$ (0.5-) <b>0.8 – 1.0</b> (-1.0)	Lawrence i sur. 2018
4.5–5.4 x 0.9–1.9	Samouel i Kanetis, 2016
(4) 4.5–5 (6) $\times$ (1) 1.5 (2)	Hand i sur. 2014
(4-)4.5-5.4(-6) $\times$ (1.5-)2(-2.5)	Mahdikhani i Davoodi, 2017
4-5 x 1.75	Triki i sur. 2015
4-6 $\times$ 1-2	Mincuzzi i sur. 2017
4-6 x 4.5-5.5	Palavouzis i sur. 2015

$D \times \check{S}$  – duljina  $\times$  širina konidije.

#### 5.4. Brzina rasta micelija izolata grupe 1 (*C. punicae*)

Za utvrđivanje brzine rasta micelija izolata grupe 1 odabrani su reprezentativni izolati Š1.6, Š5.4, Š6.3, Š7.1, Š9.1, a dotični test proveden je na četiri različite temperature. Prosječni promjeri kolonija izolata prikazani su u tablici 5.4.1. Na 25 °C zabilježena je prosječna brzina rasta micelija od 52 mm nakon 7 dana, dok je u istom vremenu na 32 °C ta kolonija porasla samo 15 mm u promjeru. Kolonije 5 odabranih izolata nakon 7 dana na 25 °C postižu različit raspon rasta od 50 – 54 mm, dok na 32 °C postižu rast od 13 – 18 mm, a kao glavni uzrok te varijabilnosti smatra se intraspecijska varijabilnost izolata. Kolonije *C. punicae* rasle su prosječno 70 % sporije na 32 °C u odnosu na 25 °C, iz čega zaključujemo kako *C. punicae* još uvijek može rasti na 32 °C, makar znatno sporije. Na 4 °C i 37 °C nije zabilježen rast micelija. Utvrđena prosječna brzina rasta promjera kolonija izolata grupe 1 tijekom 7 dana (52 mm) odstupa od onih u istraživanju Lawrence i sur. (2018.) (64,7 mm) za 20 % i zaključeno je da se takvo odstupanje može pripisati intraspecijskoj varijabilnosti.

**Tablica 5.4.1.** Prosječan promjer (mm) triju replikata kolonije izolata grupe 1 (*C. punicae*) nakon 7 dana na četiri različite temperature

Izolat	4 °C	25 °C	32 °C	37 °C
Š1.6	0	51	18	0
Š5.4	0	50	13	0
Š6.3	0	54	14	0
Š7.1	0	53	14	0
Š9.1	0	51	16	0
<b>Prosječna brzina rasta izolata</b>	0	52	15	0

#### 5.5. Molekularna identifikacija izolata gljiva grupe 1 (*C. punicae*) i grupe 2

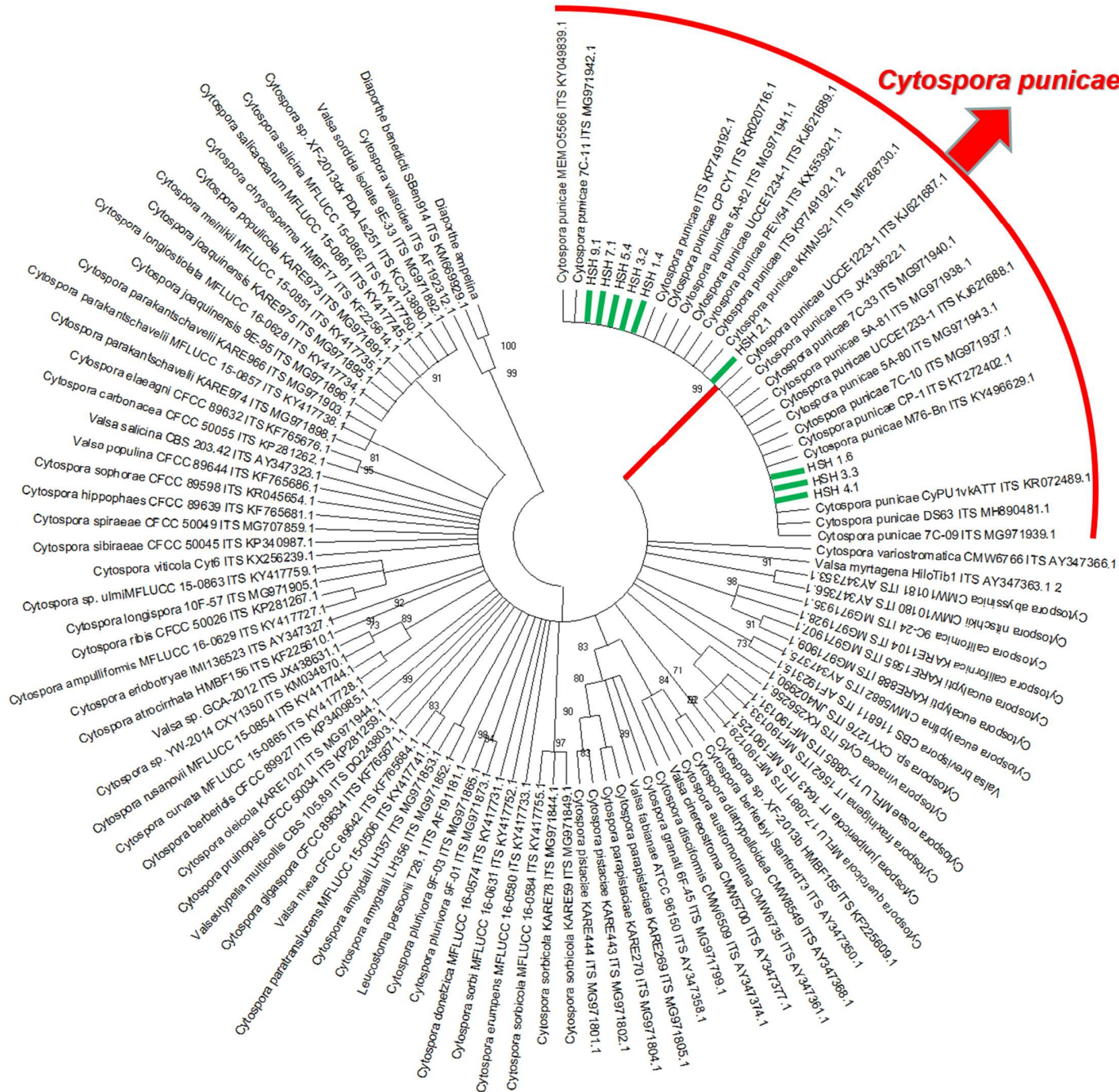
U molekularnoj identifikaciji izolata grupe 1 (Š1.4, Š1.6, Š2.1, Š3.2, Š3.3, Š4.1, Š5.4, Š7.1 i Š9.1) pomoću molekularnih markera ITS i EF1- $\alpha$  metodom PCR dobiveni su produkti duljine 557 nukleotida za ITS, odnosno 305 nukleotida za EF1- $\alpha$ . ITS sekvence tih produkata, pomoću programa BLAST, uspoređene su s referentnim sekvencama za vrstu *Cytospora punicae* iz baze podataka GenBank. Navedenom usporedbom utvrđen je postotak homologije kod izolata grupe 1 od 99 do 100 % s odgovarajućom sekvencom referentnih izolata UCCE1223 (GenBank KJ621687.1), UCCE1233 (GenBank KJ621688.1) i UCCE1234 (GenBank KJ621689.1) (Perduto Hand i sur. 2014.). Analiza programom BLAST sekvenci EF1- $\alpha$  izolata grupe 1 pokazala je također postotak homologije veći od 99 % s odgovarajućom sekvencom referentnih izolata UCCE1223 (GenBank KJ621684.1), UCCE1233 (GenBank KJ621685.1) i UCCE1234 (GenBank KJ621686.1) (Perduto Hand i sur. 2014.). Temeljem utvrđenoga stupnja homologije molekularnih

markera ITS i EF1-a izolata grupe 1 s referentnim izolatima iz baze podataka GenBank, zaključeno je kako izolati grupe 1 pripadaju vrsti *Cytospora punicae*, čime se potvrđuju pretpostavke prethodnih morfoloških analiza.

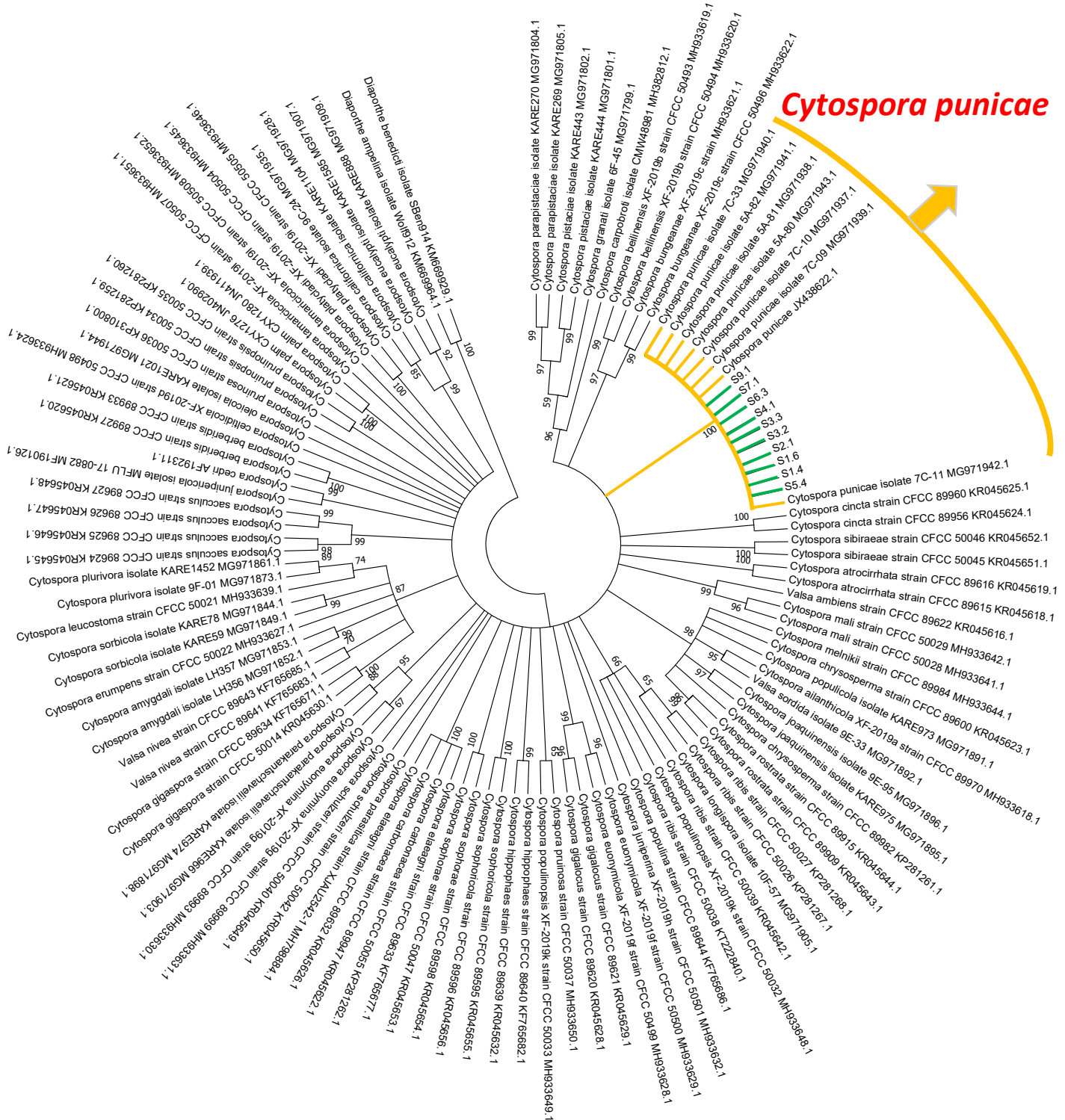
Kod analize molekularnog markera ITS programom BLAST izolata grupe 2 (Š4.3 i Š7.4) nisu dobiveni konzistentni rezultati, te isti nisu mogli biti identificirani. Stoga je zaključeno kako je u budućem istraživanju potrebno koristiti dodatne molekularne markere za točnu identifikaciju izolata gljiva iz grupe 2.

## **5.6. Filogenetska analiza izolata grupe 1 (*C. punicae*)**

Kao dodatna potvrda taksonomske pripadnosti izolata grupe 1 provedena je filogenetska analiza statističkom metodom Maximum Likelihood ITS, odnosno ITS+EF1- $\alpha$  sekvenci sa sekvencama referentnih izolata vrsta iz roda *Cytospora*. Rezultat filogenetske analize sekvenci ITS bilo je jedno filogenetsko stablo (slika 5.6.1.), na kojem se vidi kako su reprezentativni izolati grupe 1 grupirani zajedno s referentnim izolatima za vrstu *Cytospora punicae* u dobro podržanom ogranku s bootstrap vrijednošću od 99 %, te su jasno odijeljeni od ostalih vrsta iz roda *Cytospora*. Rezultat filogenetske analize sekvenci ITS+EF1- $\alpha$  također je bilo jedno filogenetsko stablo (slika 5.6.2.), na kojem se vidi kako su reprezentativni izolati grupe 1 grupirani zajedno s referentnim izolatima za vrstu *Cytospora punicae* u dobro podržanom ogranku s bootstrap vrijednošću od 99 %, te su također jasno odijeljeni od ostalih vrsta iz roda *Cytospora*. Dobiveni rezultati filogenetske analize u potpunosti dokazuju pripadnost izolata grupe 1 vrsti *Cytospora punicae* i konzistentni su s rezultatima Lawrence i sur. (2018.). Stoga je ovo prvi dokaz vrste *C. punicae* na šipku u Hrvatskoj.



**Slika 5.6.1.** Prikaz kondenziranog („cut off“ na 50 %) filogenetskog stabla dobivenog metodom Maximum likelihood (logL=-5042.93) baziranog na analizi pravnatih ITS sekvenci reprezentativnih izolata grupe 1 i referentnih izolata iz baze postotaka GenBank za različite vrste iz roda *Cytospora*. Vrste *Diaporthe ampelina* i *D. benedicti* uzete su kao vanjska grupa. Brojevi iznad pojedinih ogranaka predstavljaju postotak od 1000 bootstrap ponavljanja, a prikazani su samo oni >69 %.



**Slika 5.6.2.** Prikaz kondenziranog („cut off“ na 55 %) filogenetskog stabla dobivenog metodom Maximum likelihood (logL=-3697.34) baziranog na analizi poravnatih kombiniranih sekvenci ITS+EF1- $\alpha$  reprezentativnih izolata grupe 1 i referentnih izolata iz baze podataka GenBank za različite vrste iz roda *Cytospora*. Vrste *Diaporthe ampelina* i *D. benedicti* uzete su kao vanjska grupa. Brojevi iznad pojedinih ogranaka predstavljaju postotak od 1000 bootstrap ponavljanja.

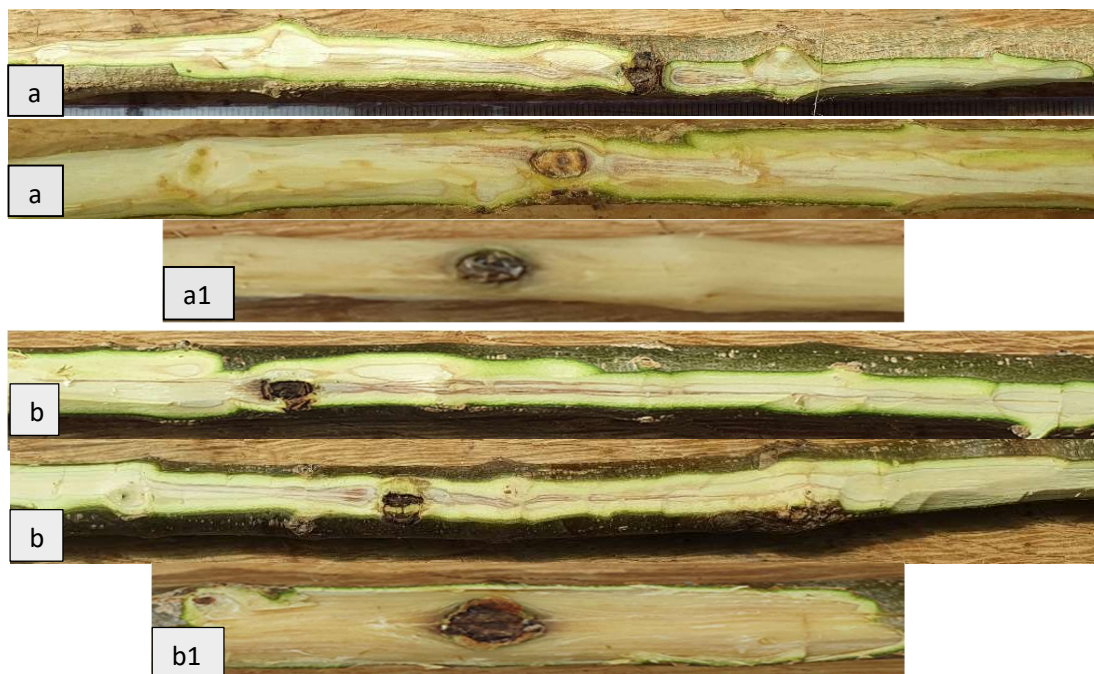
## 5.7. Rezultati testa patogenosti

Kako bismo utvrdili patogeni potencijal izolata iz grupe 1 (*C. punicae*) te zadovoljili Kochove postulate, proveden je test patogenosti na dvjema sortama šipka, kako je ranije opisano. U navedenom testu patogenosti (slika 5.7.1.) korišteno je pet reprezentativnih izolata (Š0.0, Š1.6, Š3.3, Š7.1 i Š9.1) i sterilni komadić PDA kao negativna kontrola.



Slika 5.7.1. Očitavanje rezultata testa patogenosti

Nakon 9 mjeseci od umjetne inokulacije jednogodišnjih sadnica šipka, sorti Glavaš i Barski slatki, nisu utvrđeni nikakvi vanjski simptomi koji bi upućivali na bolest drva. Međutim, u uzdužnim presjecima stabljika inokuliranih sadnica ispod i iznad mjesta inokulacije, jasno su se mogle uočiti nekrotične promjene boje tkiva iz žućkaste u svijetlije do tamnije smeđu boju. Navedena nekrotična promjena nije bila prisutna kod kontrole (slika 5.7.2.).



Slika 5.7.2. Nekroza provodnog staničja na dvije sorte šipka, Barski slatki (a) i Glavaš (b) + kontrola (a1 i b1)

Dimenzije nastalih nekrotičnih promjena, umanjene za 5 mm koliko je iznosio promjer mjesta inokulacije, zabilježene su, te su za te dimenzije izračunate srednje vrijednosti za pojedine izolate i kontrolu (slika 5.7.3.), a izračunata je i statistička značajnost razlika između utvrđenih srednjih vrijednosti kao i statistički značaj istih (tablica 5.7.1). Svi testirani izolati izazvali su pojavu nekrotičnih promjena čije su dimenzije statistički bile značajno veće od onih kod kontrole (tablica 5.7.1), no statistički značajnih razlika tih dimenzija između pojedinih izolata na objema sortama šipka, nije bilo. Stoga, možemo zaključiti da u ovom istraživanju nije primijećeno značajno variranje izolata po stupnju patogenosti, kao ni postojanje razlike u osjetljivosti dviju testiranih sorti šipka na gljivu *C. punicae*.

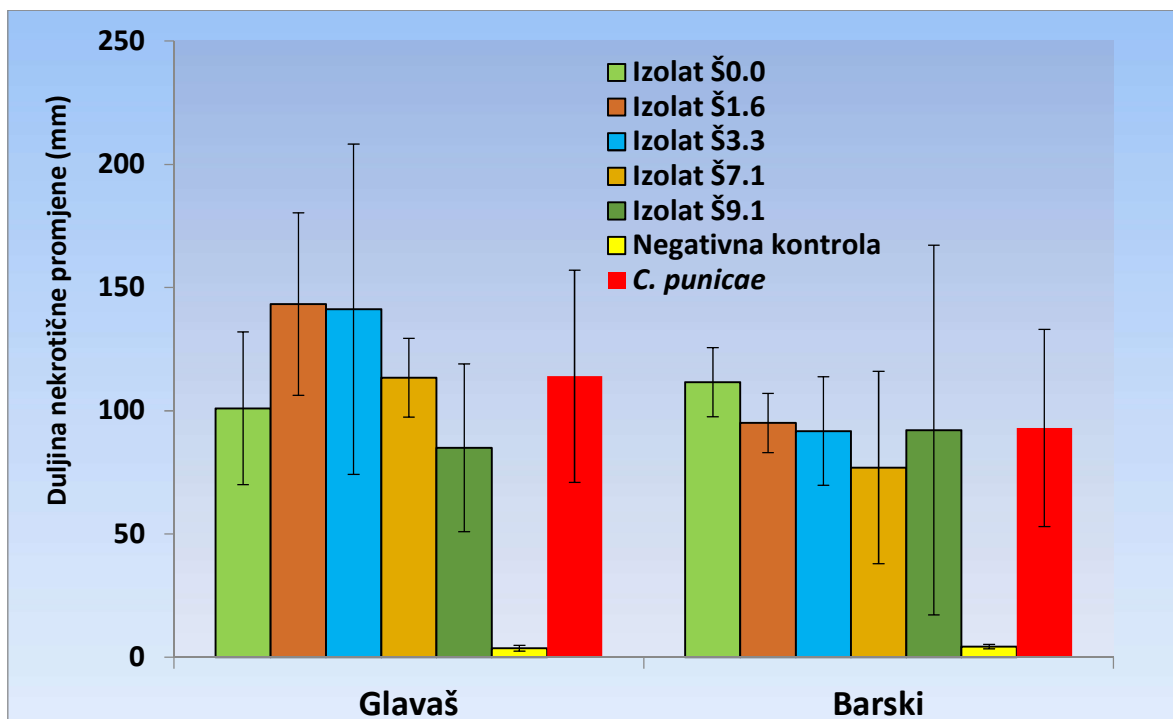
**Tablica 5.7.1.** Rezultati testova patogenosti s prosječnim vrijednostima duljine nekrotičnih promjena (prosječna duljina  $\pm$  S.D., u milimetrima) za izolate vrste *C. punicae* na stabljici sadnica dviju sorti šipka (Barski slatki i Glavaš) sa sterilnim PDA kao negativnom kontrolom. Prosječne vrijednosti praćene istim slovom nisu značajno različite pri vrijednosti  $P < 0,0001$ .

Izolat <i>C. punicae</i>	Sorta šipka	
	Glavaš	Barski slatki
Š0.0	101 $\pm$ 31 a	112 $\pm$ 14 a
Š1.6	143 $\pm$ 37 a	95 $\pm$ 12 a
Š3.3	141 $\pm$ 67 a	92 $\pm$ 22 a
Š7.1	113 $\pm$ 16 a	77 $\pm$ 39 a
Š9.1	85 $\pm$ 34 a	92 $\pm$ 75 a
Svi izolati <i>C. punicae</i> zajedno	114 $\pm$ 43 a	93 $\pm$ 40 a
Negativna kontrola	3,7 $\pm$ 1,2 b	4.3 $\pm$ 0.9 b

Reizolacija gljiva, koje su morfološki odgovarale izolatima grupe 1, provedenog sa ruba zdravog i nekrotičnog tkiva drva sadnica šipka inokuliranih izolatima grupe 1, bila je uspješna u više od 85 % slučajeva, dok iz drva kontrolnih sadnica šipka nisu izolirane gljive, čime su zadovoljeni Kochovi postulati. Na temelju provedenog testa patogenosti, zaključeno je da izolati *C. punice* izolirani iz šipka u Hrvatskoj imaju sposobnost inficirati drvo šipka putem rane u kori biljke, savladati obrambene mehanizme biljke i proširiti se duž drvenastog tkiva u oba smjera od mjesta inokulacije, pritom izazivajući nekrotične promjene u zahvaćenom tkivu. Takve promjene boje drva šipka konzistentne su onima opaženima kod uzorkovanja bolesnih stabala u Dalmaciji, a i konzistentne su rezultatima testa patogenosti u istraživanju Triki i sur. (2015.). Kako bi se provjerilo da li izolati *C. punicae* izolirani iz šipka u ovom istraživanju također mogu tijekom vremena uzrokovati i ostale simptome opažene na bolesnim stablima šipka u Dalmaciji, potrebno će biti provesti test patogenosti dulji od 9 mjeseci. Također, metoda provedbe testa patogenosti, između postojećih istraživanja u svijetu varira po pitanju sortimenta testnih biljaka, starosti i tipu inokuliranih organa stabala ili sadnica, kao i trajanju testa, a u obzir treba uzeti i vjerojatno različitu virulentnost izolata gljive u navedenim istraživanjima. Navedene činjenice vjerojatni su razlog



zašto opisi simptoma u testovima patogenosti, po pitanju intenziteta, odstupaju između ovog i istraživanja drugih istraživača, a koja se također međusobno razlikuju (Mincuzzi i sur. 2017; Venter i sur. 2017; Peduto Hand i sur. 2014; Mahdikhani i Davoodi 2017; Samouel i Kanetis 2016; Triki i sur. 2015.).



**Slika 5.7.3.** Rezultati testova patogenosti s prosječnim vrijednostima duljine nekrotičnih promjena (prosječna duljina  $\pm$ S.D. u milimetrima) prema utvrđenoj vrsti *C. punicea* na stabljici dviju sorti šipka (Barski slatki i Glavaš) sa sterilnim PDA kao negativnom kontrolom.

Po pitanju stupnja patogenosti tj. virulentnosti izolata *C. punice* iz grupe 1, korištenih u testu patogenosti, s obzirom na izostanak simptoma uočenih na uzorkovanim biljkama u Dalmaciji, zaključeno je da je on nizak do srednji, a sama patogena gljiva vjerojatno iskazuje svoju virulentnost u ovisnosti o zdravstvenom stanju biljke domaćina, te bi se *C. punicea* u okviru ovog istraživanja mogla okarakterizirati kao patogen slabosti. Stoga bi buduća istraživanja trebala istražiti moguće uzroke slabosti biljaka šipka koje ih čine podložnima zarazi i kolonizaciji od strane *C. punicea*. Mogući uzroci mogli bi se pripisati češćim pojavama ekstremnih temperatura, poput kasnih mrazova i dugotrajnih suša, u kontekstu globalnih klimatskih promjena. Takve promjene u okolišu mogu štetno utjecati na biljke domaćine i uzrokovati njihovu veću osjetljivost na patogene organizme (Kaliterna i sur. 2012.). Rezultati testa patogenosti u ovom istraživanju predstavljaju prvi nalaz vrste *C. punicea* kao patogena šipka u Hrvatskoj. Stoga, može se zaključiti da je ova gljiva, izolirana iz 10 od ukupno 11 uzorkovanih stabala šipka (tablica 5.7.2), vjerojatno

glavni biotski uzrok sušenja šipka u Dalmaciji, te je ovom znanstvenom spoznajom ostvaren cilj ovog istraživanja i potvrđena je postavljena hipoteza.

**Tablica 5.7.2.** Popis lokaliteta sakupljanja uzoraka uz pregled broja uzoraka te utvrđenih taksona gljiva po pojedinom uzorku i lokalitetu.

Lokalitet	GPS koordinate	Uzorci šipka	Identificirane vrste gljiva / taksoni
Lok 1	43°30'8.30"N 16°27'26.35"E	Š0	<i>Cytospora punicae</i>
Lok 2	43°30'6.57"N 16°27'23.04"E	Š1	<i>Cytospora punicae</i>
Lok 3	43°33'27.59"N 16°31'27.23"E	Š2	<i>Cytospora punicae</i> , <i>Penicillium</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp.
	43°33'27.16"N 16°31'28.08"E	Š3	<i>Cytospora punicae</i>
Lok 4	43°31'7.53"N 16°28'25.87"E	Š4	<i>Cytospora punicae</i> , <i>Nepoznata vrsta</i> (izolat Š4.3), <i>Penicillium</i> sp.
Lok 5	43°30'14.54"N 16°29'24.82"E	Š5	<i>Cytospora punicae</i>
	43°30'14.46"N 16°29'23.24"E	Š6	<i>Cytospora punicae</i>
Lok 6	43°33'3.46"N 16°29'43.58"E	Š7	<i>Cytospora punicae</i> , <i>Alternaria</i> sp., <i>Nepoznata vrsta</i> (izolat Š7.4)
Lok 7	43°30'9.48"N 16°27'16.59"E	Š8	<i>Penicillium</i> sp.
Lok 8	43°32'47.39"N 16°26'58.85"E	Š9	<i>Cytospora punicae</i>
Lok 9	43°27'40.09"N 16°41'23.69"E	Š10	<i>Cytospora punicae</i>
Σ		Ukupno 11 uzoraka	6

## 6. ZAKLJUČAK

U skladu s postavljenom hipotezom i ciljem, a na temelju dobivenih rezultata, zaključci provedenog istraživanja su sljedeći:

1. Na svim istraživanim lokalitetima u Dalmaciji, osim Lokalitetu 7, utvrđene su biljke šipka sa simptomima bolesti drva, konzistentnima sa simptomima citosporioznog sušenja šipka.
2. Iz svih uzoraka simptomatskog drva šipka, osim uzroka s lokaliteta 7, utvrđena je prisutnost gljiva identificiranih kao vrsta *Cytospora punicae*.
3. Na lokalitetima 3, 4 i 6, uz *C. punicae* dodatno su utvrđene saprofitne vrste gljiva iz roda *Penicillium*, *Aspergillus*, odnosno *Alternaria*, a na lokalitetu 7, utvrđena je samo saprofitna vrsta *Penicillium* sp.. Zaključeno je da navedene vrste gljive vjerojatno nisu povezane s opaženim simptomima bolesti drva šipka u Dalmaciji.
4. Na lokalitetima 4 i 6, također su utvrđene gljive koje nije bilo moguće identificirati u okviru ovog istraživanja te je zaključeno da je za njihovu identifikaciju u budućim istraživanjima potrebno osim ITS, koristiti dodatne molekularne markere za identifikaciju gljiva, kao i provjeriti njihovu patogenost na šipku.
5. Reprezentativnim izolatima vrste *Cytospora punicae* u ovom istraživanju dokazana je patogenost u drvu šipka te je patogen okarakteriziran kao slabi do srednje jaki, ili čak kao patogen slabosti. Stoga bi buduća istraživanja trebala istražiti moguće uzroke slabosti biljaka šipka koje ih čine podložnima zarazi i kolonizaciji od strane *C. punicae*.
6. Nije utvrđena statistički značajna razlika u virulentnosti između izolata *C. punice*, kao niti statistički značajna razlika u osjetljivosti sorti šipka Glavaš i Barski slatki prema kolonizaciji od strane *C. punicae*.
7. Ovo istraživanje donosi prvi nalaz vrste *C. punicae* kao patogena šipka u Hrvatskoj, a budući je to jedina vrsta u ovom istraživanju koja je konzistentno izolirana iz svih biljaka šipka sa simptomima bolesti drva, zaključeno je da je vrsta *C. punicae* vjerojatno i jedini biotski uzrok sušenja šipka u Dalmaciji.
8. U budućim istraživanjima trebalo bi istražiti epidemiologiju vrste *C. punicae* na šipku kao i provjeriti osjetljivost drugih sorti šipka u Hrvatskoj na ovog patogena.

## 7. LITERATURA

1. 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.
2. 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: 1-144.
3. Agroklub (2019). Šipak. < <https://www.agroklub.com/sortna-lista/voce/sipak-30/> > (Pristupljeno: 20.7. 2019.)
4. Alcaraz-Marmol F. Nuncio-Jauregui N., Garcia-Sanchez F., Martinez-Nicolas J. J., Hernandez F. (2017). Characterization of twenty pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain: Aptitudes for fresh consumption and processing. *Scientia Horticulturae* 219: 152-160.
5. Anonimno (2015). Tradicijske sorte i pasmine Dalmacije Voćke. <[https://issuu.com/undphr/docs/tradicijske\\_sorte\\_i\\_pasmine\\_dalmaci\\_7290528eb1693f16](https://issuu.com/undphr/docs/tradicijske_sorte_i_pasmine_dalmaci_7290528eb1693f16)> (Pristupljeno 22.7.2019.)
6. Bichcheri R., Mirotti A., Babini A. R., Poggi Pollini C. (2015). Viral infections in one collection field of pomegranate (*Punica granatum*) in Italy. *Food and Agriculture Organization of the United Nations. AGRIS* 97 (4): 29-30.
7. Bills G. F. (1996) Isolation and Analysis of Endophytic Fungal Communities from Woody Plants. St Paul, MN: American Phytopathological Society Press.
8. Bozkurt I. A., Soylu S., Mirik M., Ulubas Serce C., Baysal O. (2014). Characterization of bacterial knot disease caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* on pomegranate (*Punica granatum* L.) trees: a new host of the pathogen. *Applied Microbiology* ISSN 0266-8254. <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/lam.12309>> (Pristupljeno 20.7.2019.)
9. CAB International. (2001). *Ceratocystis fimbriata* [izvorni tekst od Harrington TC i Baker C]. U: *Crop protection compendium*. Wallingford: CAB International.
10. Celik A. i Ercisli S. (2009). Some physical properties of pomegranate cv. Eksinar. *International Agrophysics* 23(3):295-298.
11. Chen Y., Shao D. D., Zhang A. F., Yang X., Zhou M. G., Xu Y. L. (2014). First Report of a Fruit Rot and Twig Blight on Pomegranate (*Punica granatum*) Caused by *Pilidiella granati* in Anhui Province of China. *Plant Disease* 98 (5): 695.

12. Drezga T. (2014). Nije svaki nar šipak. Agroklub. <<https://www.agroklub.com/vocarstvo/nije-svaki-nar-sipak/14394/>> (Pristupljeno 22.7.2019.)
13. Fan X. L., Bezerra J. D. P., Tian C. M., Crous P. W. (2019). *Cytospora* (*Diaporthales*) in China. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 45:1-45.
14. Gadže J. (2013). Pomological, chemical and molecular characterization of pomegranate cultivars (*Punica granatum* L.). Doktorski rad
15. Halsted B. D. (1890). Some fungus disease of the sweet potato. Agricultural College Experiment Station 76: 1-32.
16. Halsted B. D, Fairchild D. G. (1891). Sweet potato black rot. *Journal of Mycologia* 7: 1-11.
17. Juretic N., Horvath J. (1984). Isolation of *cucumber mosaic virus* from pomegranate *Punica granatum* in Yugoslavia. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 19(3-4): 309-314.
18. Kaliterna J. (2013). Identifikacija, patogenost i rasprostranjenost vrsta gljiva iz porodica *Botryosphaeriaceae* i *Diaporthaceae* na vinovoj lozi u Hrvatskoj. Doktorski rad
19. Kaliterna, J., Miličević, T., Ivić, D., Benčić, Đ., Mešić, A. (2012): First report of *Diplodia seriata* as causal agent of olive dieback in Croatia. *Plant Disease* 96: 290.
20. Kile G. A. (1993). Plant diseases caused by species of *Ceratocystis* sensu stricto and *Chalara*. In: Wingfield MJ, Seifert KA, Webber JF (eds), *Ceratocystis and Ophiostoma: taxonomy, ecology, and pathogenicity*. St Paul: APS Press. pp 173-183
21. Lawrence D. P., Holland L. A., Nouri M. T., Travadon R., Abramians A., Michailides T. J., Trouillas F. P. (2018). Molecular phylogeny of *Cytospora* species associated with canker diseases of fruit and nut crops in California, with the descriptions of ten new species and one new combination. *IMA Fungus* 9 : 333-370.
22. Mahdikhani M., Davoodi A. (2017). First report of wood canker of pomegranate caused by *Cytospora punicae* in western Iran.  
< <https://www.ndrs.org.uk/article.php?id=035001> > (Pristupljeno 25.7.2019.)
23. Marin S. (2016). Molekularna identifikacija gljiva iz porodica *Diaporthaceae* i *Botriosphaeriaceae* izoliranih iz drva smokve u Hrvatskoj. Diplomski rad.
24. Miličević T., Kaliterna J., Vončina D. (2017). Bolesti mediteranskih voćnih vrsta bajam, rogač, smokva, šipak, žižula. *Zaklada Adris, Zagreb*.

25. Mincuzzi A., Sanzani S. M., Garganese F., Ligorio A., Ippolito A. (2017). First report of *Cytospora punicae* causing fruit rot on pomegranate in Italy. *Journal of Plant Pathology* (2017), 99 (1), 287-304.
26. Morton J. (1987). *Fruits of warm climates*. 352–355.  
<<https://pdfs.semanticscholar.org/7441/0024de07be2cd9df3aed4de068d6862e1db4.pdf>>  
(Pristupljeno 20.7.2019.)
27. Munhuweyi K., Lennox C. L., Meitz-Hopkins J. C., Caleb O. J., Linus Opara U. (2016). Major diseases of pomegranate (*Punica granatum L.*), their causes and management – A review. *Scientia Horticulturae* 211: 126-139.
28. Palavouzis S.C., Tzamos S., Paplomatas E., Thomidis T. (2015). First report of *Cytospora punicae* isolated from pomegranate plants with symptoms of collar rot in northern Greece. *Journal of Plant Pathology* 97(1), 209-220.
29. Peduto Hand F., Choudhury R. A., Gubler W.D. (2014). First Report of *Cytospora punicae* Causing Wood Canker and Branch Dieback of Pomegranate (*Punica granatum*) in the United States. *Plant Disease* 98 (6): 853.
30. Radunić M. (2012). Tehnološke smjernice za uzgoj šipka. Institut za jadranske culture i melioraciju krša, Split. < <https://www.krs.hr/events/2012/120308-radionica/prezentacije/Tszus.pdf> > (Pristupljeno 22.7.2019.)
31. Raja, Sunkad G., Amaresh Y. S., Yenjerappa S. T., Amaregouda A., Shreenivas A. G. (2017). Morphological Characteristics of *Ceratocystis fimbriata* Ell. and Halst. Causing Wilt in Pomegranate. *International Journal of Pure & Applied Science* 5 (2): 285-289.
32. Roux J. i Wingfield M. J. (2009). *Ceratocystis species*: emerging pathogens of non-native plantation Eucalyptus and Acacia species. *Southern Forests: a Journal of Forest Science* 71: 2, 115 — 120.
33. Samouel S. i Kanetis L. (2016). First Report of *Cytospora punicae* Causing Trunk Canker of Pomegranate (*Punica granatum*) in Cyprus. *Plant Disease* 100 (1): 222.
34. Sharma K. K., Sharma J., Jadhav J. T. (2010). Etiology of Pomegranate Wilt and its Management. *Global Science Books* 96-101.
35. Sinclair W. A., Lyon H. H., Johnson W. T. (1987) *Diseases of Trees and Shrubs*. Ithaca, NY: Cornell University Press.
36. Soni M. i Kanwar K. (2016). Phytotoxicity Studies of *Ceratocystis fimbriata* Causing Pomegranate Wilt in *Punica granatum L.* Cv. Kandhari Kabuli. *Journal of Plant Pathology & Microbiology* 7:344.

37. Spielman LJ. (1983) Taxonomy and biology of *Valsa* species on hardwoods of North America, with special reference to species on maples. PhD thesis, Cornell University.
38. Stover E. I Mercure E. W.(2007). The Pomegranate: A New Look at the Fruit of Paradise. *HortScience* 42: 5.
39. Šakić Bobić B. (2016). Ekonomika proizvodnje nara. *Gospodarski list*. <  
<https://gospodarski.hr/rubrike/agroekonomika/ekonomika-proizvodnje-nara/8491/>>  
Pristupljeno: 19.7.2019.
40. Triki M. A., Gharbi Y., Cheffi M., Krid S., Rahma T., Hammami I., Hamdi H., Chaabani B., Ben Ali H., Gdoura R. (2015). First report of *Cytospora punicae* associated with wood canker and branch dieback disease of pomegranate in Tunisia. *Journal of Plant Pathology* 97 (3): 541-551.
41. Türkölmez S., Çiftçi O., Serçe C. U., Derviş S. (2015). First Report of *Phytophthora palmivora* Causing Crown and Root Rot on Pomegranate (*Punica granatum*) in Turkey. *Plant Disease* 100 (1): 227.
42. Úrbez-Torres J. R., Peduto Hand F., Trouillas F. P., Gubler W. D. (2016). Pomegranate dieback caused by *Lasiodiplodia gilanensis* in California. *European Journal of Plant Pathology* 148(1):223-228.
43. Van Wyk1 M., Adawi A. O., Khan I. A, Deadman M. L., Al Jahwari A. A., Wingfield B. D., Ploetz R. I Wingfield M. J. (2007). *Ceratocystis manginecans* sp. nov., causal agent of a destructive mango wilt disease in Oman and Pakistan. *Fungal Diversity*. <  
[http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/27\\_13.pdf](http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/27_13.pdf)> (Pristupljeno 20.7.2019.)
44. Venter E., Lennox C. L., Meitz-Hopkins J. C. (2017). First Report of *Cytospora punicae* Causing Post-Harvest Fruit Rot on Pomegranate in South Africa. *Plant Disease* 101(4): 631.
45. Xavier K. V., KC a. N., Crous P. W., Groenewald J. Z., Vallad G. E. (2019). *Dwiroopa punicae* sp. nov. (*Dwiroopaceae* fam. nov., *Diaporthales*), associated with leaf spot and fruit rot of pomegranate (*Punica granatum*). *Fungal Systematics and Evolution* 4: 33-41.

## 8. PRILOG

### 8.1. Tablica referentnih sekvenci preuzetih iz baze podataka GenBank

**Tablica 8.1.1.** Popis korištenih izolata i njihovih ITS i EF1- $\alpha$  sekvenci iz baze podataka GenBank za gljive roda *Cytospora*

Vrsta gljive	Izolat	Biljka domaćin	ITS	EF1
* <i>Cytospora abyssinica</i>	<b>CMW 10181</b>	<i>Eucalyptus globulus</i>	AY347353	
<i>Cytospora ailanthicola</i>	CFCC 89970	<i>Ailanthus altissima</i>	MH933618	MH933494
* <i>C. ampulliformis</i>	<b>MFLUCC 16-0629</b>	<i>Acer platanoides</i>	KY417727	
* <i>C. amydgali</i>	LH356	<i>Prunus dulcis</i>	MG971852	MG971658
* <i>C. amydgali</i>	<b>LH357/ CBS 144233</b>	<i>Prunus dulcis</i>	MG971853	MG971659
* <i>C. austromontana</i>	<b>CMW 6735</b>	<i>Eucalyptus pauciflora</i>	AY347361	
* <i>C. atrocirrhatta</i>	<b>CFCC 89615</b>	<i>Jugulans regia</i>	KF225610	
<i>Cytospora atrocirrhatta</i>	CFCC 89615	<i>Jugulans regia</i>	KR045618	KP310858
<i>Cytospora atrocirrhatta</i>	CFCC 89616	<i>Jugulans regia</i>	KR045619	KP310859
<i>Cytospora beilinensis</i>	CFCC 50493	<i>Pinus armandii</i>	MH933619	MH933495
<i>Cytospora beilinensis</i>	CFCC 50494	<i>Pinus armandii</i>	MH933620	MH933496
* <i>C. berberidis</i>	<b>CFCC 89927</b>	<i>Berberis dasystachyum</i>	KP340985	
<i>Cytospora berberidis</i>	CFCC 89927	<i>Berberis dasystachya</i>	KR045620	KU710913
<i>Cytospora berberidis</i>	CFCC 89933	<i>Berberis dasystachya</i>	KR045621	KU710914
* <i>C. berkeleyi</i>	<b>StanfordT3</b>	<i>Eucalyptus globulus</i>	AY347350	
* <i>C. brevispora</i>	<b>CBS 116811</b>	<i>Eucalyptus grandis</i>	AF192315	
<i>Cytospora bungeanae</i>	CFCC 50495T	<i>Pinus bungeana</i>	MH933621	MH933497
<i>Cytospora bungeanae</i>	CFCC 50496	<i>Pinus bungeana</i>	MH933622	MH933498
* <i>C. californica</i>	<b>9C-24/ CBS 144234</b>	<i>Jugulans regia</i>	MG971935	MG971645



<i>*C. californica</i>	KARE1104	<i>Prunus dulcis</i>	MG971928	MG971638
<i>*C. carbonacea</i>	<b>CFCC 50055</b>	<i>Ulmus pumila</i>	KP281262	KP310851
<i>Cytospora carbonacea</i>	CFCC 89947	<i>Ulmus pumila</i>	KR045622	KP310855
<i>Cytospora carpobroti</i>	CMW 48981	<i>Carpobrotus edulis</i>	MH382812	MH411212
<i>*C. cedri</i>	CBS 196.50	<i>Unknown host</i>	AF192311	JX438575
<i>Cytospora celtidicola</i>	CFCC 50497	<i>Celtis sinensis</i>	MH933623	MH933499
<i>Cytospora celtidicola</i>	CFCC 50498	<i>Celtis sinensis</i>	MH933624	MH933500
<i>*C. centrivillosa</i>	<b>MFLUCC 16-1206</b>	<i>Sorbus domestica</i>	MF190122	
<i>Cytospora ceratosperma</i>	CFCC 89624	<i>Juglans regia</i>	KR045645	KP310860
<i>Cytospora ceratosperma</i>	CFCC 89625	<i>Juglans regia</i>	KR045646	KP310861
<i>Cytospora ceratospermopsis</i>	CFCC 89626	<i>Juglans regia</i>	KR045647	KU710934
<i>Cytospora ceratospermopsis</i>	CFCC 89627	<i>Juglans regia</i>	KR045648	KU710935
<i>*C. chrysosperma</i>	9E-33/ CBS 144242	<i>Camellia</i>	MG971892	MG971602
<i>*C. chrysosperma</i>	<b>CFCC 89619</b>	<i>Juglans regia</i>	KF225614	
<i>Cytospora chrysosperma</i>	CFCC 89982	<i>Ulmus pumila</i>	KP281261	KP310848
<i>*C. cinereostroma</i>	<b>CMW 5700</b>	<i>Eucalyptus globulus</i>	AY347377	
<i>*C. curvata</i>	<b>MFLUCC 15-0865</b>	<i>Salix alba</i>	KY417728	
<i>*C. davidiana</i>	<b>CXY1350</b>	<i>Populus davidiana</i>	KM034870	
<i>*C. diatrypelloidea</i>	<b>CMW 8549</b>	<i>Eucalyptus globulus</i>	AY347368	
<i>*C. disciformis</i>	<b>CMW 6509</b>	<i>Eucalyptus grandis</i>	AY347374	
<i>*C. donetzica</i>	<b>MFLUCC 16-0574</b>	<i>Rosa sp.</i>	KY417731	
<i>*C. elaeagni</i>	<b>CFCC 89632</b>	<i>Elaeagnus angustifolia</i>	KF765676	
<i>C. elaeagni</i>	<b>CFCC 89632</b>	<i>Elaeagnus angustifolia</i>	KR045626	KU710918
<i>C. elaeagni</i>	CFCC 89633	<i>Elaeagnus angustifolia</i>	KF765677	KU710919
<i>*C. eriobotryae</i>	<b>IMI 136523</b>	<i>Eriobotrya japonica</i>	AY347327	

<i>*C. erumpens</i>	<b>MFLUCC 16-0580</b>	<i>Salix ×fragilis</i>	KY417733	
<i>Cytospora erumpens</i>	CFCC 50022	<i>Prunus padus</i>	MH933627	MH933502
<i>*C. eucalypti</i>	KARE1585/ CBS 144241	<i>Prunus dulcis</i>	MG971907	MG971617
<i>*C. eucalypti</i>	KARE888	<i>Prunus dulcis</i>	MG971909	MG971619
<i>*C. eucalypticola</i>	<b>ATCC 96150</b>	<i>Eucalyptus nitens</i>	AY347358	
<i>*C. eucalyptina</i>	<b>CMW5882</b>	<i>Eucalyptus grandis</i>	AY347375	
<i>Cytospora euonymicola</i>	CFCC 50499	<i>Euonymus kiautschovicus</i>	MH933628	MH933503
<i>Cytospora euonymicola</i>	CFCC 50500	<i>Euonymus kiautschovicus</i>	MH933629	MH933504
<i>Cytospora euonymina</i>	CFCC 89993	<i>Euonymus kiautschovicus</i>	MH933630	MH933505
<i>Cytospora euonymina</i>	CFCC 89999	<i>Euonymus kiautschovicus</i>	MH933631	MH933506
<i>*C. fraxinigena</i>	<b>MFLUCC 14-0868</b>	<i>Fraxinus ornus</i>	MF190133	
<i>*C. fugax</i>	<b>CBS 203.42</b>	<i>Salix</i> sp.	AY347323	
<i>*C. gigalocus</i>	<b>HMBF155</b>	<i>Juglans regia</i>	KF225609	
<i>Cytospora gigalocus</i>	CFCC 89620	<i>Juglans regia</i>	KR045628	KU710920
<i>Cytospora gigalocus</i>	CFCC 89621	<i>Juglans regia</i>	KR045629	KU710921
<i>Cytospora gigaspora</i>	CFCC 50014	<i>Juniperus procumbens</i>	KR045630	KU710922
<i>*Cytospora gigaspora</i>	CFCC 89634	<i>Salix psammophila</i>	KF765671	KU710923
<i>*C. granati</i>	<b>6F-45/ CBS 144237</b>	<i>Punica granatum</i>	MG971799	MG971514
<i>*C. hippophaes</i>	<b>CFCC 89639</b>	<i>Hippophae rhamnoides</i>	KF765681	
<i>Cytospora hippophaës</i>	CFCC 89639	<i>Hippophaë rhamnoides</i>	KR045632	KU710924
<i>Cytospora hippophaës</i>	CFCC 89640	<i>Hippophaë rhamnoides</i>	KF765682	KP310865
<i>Cytospora japonica</i>	CFCC 89956	<i>Prunus cerasifera</i>	KR045624	KU710916
<i>Cytospora japonica</i>	CFCC 89960	<i>Prunus cerasifera</i>	KR045625	KU710917
<i>*C. joaquinensis</i>	9,00E-95	<i>Juglans regia</i>	MG971896	MG971606

<i>*C. joaquinensis</i>	<b>KARE975/ CBS 144235</b>	<i>Populus deltoides</i>	MG971895	MG971605
<i>Cytospora junipericola</i>	BBH 42444	<i>Juniperus communis</i>	MF190126	MF377579
<i>*Cytospora junipericola</i>	MFLU 17-0882	<i>Juniperus communis</i>	MF190125	MF377580
<i>Cytospora juniperina</i>	CFCC 50501	<i>Juniperus przewalskii</i>	MH933632	MH933507
<i>Cytospora juniperina</i>	CFCC 50502	<i>Juniperus przewalskii</i>	MH933633	MH933508
<i>Cytospora leucosperma</i>	CFCC 89622	<i>Pyrus bretschneider</i>	KR045616	KU710911
<i>Cytospora leucosperma</i>	CFCC 50021	<i>Prunus salicina</i>	MH933639	MH933512
<i>*C. longiostiolata</i>	<b>MFLUCC 16-0628</b>	<i>Salix ×fragilis</i>	KY417734	
<i>*C. longispora</i>	<b>10F-57/ CBS 144236</b>	<i>Prunus domestica</i>	MG971905	MG971615
<i>Cytospora mali</i>	CFCC 50028	<i>Malus pumila</i>	MH933641	MH933513
<i>Cytospora mali</i>	CFCC 50029	<i>Malus pumila</i>	MH933642	MH933514
<i>*C. melnikii</i>	<b>MFLUCC 15-0851</b>	<i>Malus domestica</i>	KY417735	
<i>Cytospora melnikii</i>	CFCC 89984	<i>Rhus typhina</i>	MH933644	MH933515
<i>*C. multicollis</i>	<b>CBS 105.89</b>	<i>Quercus ilex subsp. rotun difolia</i>	DQ243803	
<i>*C. myrtagena</i>	<b>HiloTib1</b>	<i>Tibouchina urvilleana</i>	AY347363	
<i>*C. nitschkii</i>	<b>CMW 10180</b>	<i>Eucalyptus globulus</i>	AY347356	
<i>Cytospora nivea</i>	CFCC 89641	<i>Elaeagnus angustifolia</i>	KF765683	KU710929
<i>*C. nivea</i>	<b>CFCC 89642</b>	<i>Salix psammophila</i>	KF765684	
<i>Cytospora nivea</i>	CFCC 89643	<i>Salix psammophila</i>	KF765685	KP310863
<i>*C. notastroma</i>	<b>Cottonwood16</b>	<i>Populus tremuloides</i>	JX438631	
<i>*C. oleicola</i>	<b>KARE1021/ CBS 144248</b>	<i>Olea europaea</i>	MG971944	MG971660
<i>*Cytospora palm</i>	CXY 1276	<i>Cotinus coggygria</i>	JN402990	KJ781296
<i>Cytospora palm</i>	CXY 1280	<i>Cotinus coggygria</i>	JN411939	KJ781297

<i>*C. parakantschavelii</i>	<b>MFLUCC 15-0857</b>	<i>Populus</i> <i>×sibirica</i>	KY417738	
<i>*C. parakantschavelii</i>	KARE974/ CBS 144243	<i>Populus</i> <i>deltoides</i>	MG971898	MG971608
<i>*C. parakantschavelii</i>	KARE966	<i>Populus</i> <i>fremontii</i>	MG971903	MG971613
<i>*C. parapistaciae</i>	<b>KARE270/ CBS</b> <b>144506</b>	<i>Pistacia vera</i>	MG971804	MG971519
<i>*C. parapistaciae</i>	KARE269	<i>Pistacia vera</i>	MG971805	MG971520
<i>Cytospora parasitica</i>	XJAU 2542-1	<i>Malus sp</i>	MH798884	MH813452
<i>*C. paratranslucens</i>	<b>MFLUCC 15-0506</b>	<i>Populus</i> <i>alba</i> var. <i>bolleana</i>	KY417741	
<i>*C. pistaciae</i>	<b>KARE443/ CBS</b> <b>144238</b>	<i>Pistacia vera</i>	MG971802	MG971517
<i>*C. pistaciae</i>	KARE444	<i>Pistacia vera</i>	MG971801	MG971516
<i>Cytospora platycladi</i>	CFCC 50504	<i>Platycladus</i> <i>orientalis</i>	MH933645	MH933516
<i>Cytospora platycladi</i>	CFCC 50505	<i>Platycladus</i> <i>orientalis</i>	MH933646	MH933517
<i>Cytospora platycladicola</i>	CFCC 50038	<i>Platycladus</i> <i>orientalis</i>	KT222840	MH933519
<i>Cytospora platycladicola</i>	CFCC 50039	<i>Platycladus</i> <i>orientalis</i>	KR045642	KU710931
<i>*C. plurivora</i>	9F-01	<i>Juglans regia</i>	MG971873	MG971584
<i>*C. plurivora</i>	<b>KARE1452/ CBS</b> <b>144239</b>	<i>Olea europaea</i>	MG971861	MG971572
<i>*C. populicola</i>	KARE973/ CBS 144240	<i>Populus</i> <i>deltoides</i>	MG971891	MG971601
<i>*Cytospora populina</i>	CFCC 89644	<i>Salix</i> <i>psammophila</i>	KF765686	KU710930
<i>Cytospora populinopsis</i>	CFCC 50032	<i>Sorbus</i> <i>aucuparia</i>	MH933648	MH933520
<i>Cytospora populinopsis</i>	CFCC 50033	<i>Sorbus</i> <i>aucuparia</i>	MH933649	MH933521
<i>*Cytospora pruinopsis</i>	CFCC 50034	<i>Ulmus pumila</i>	KP281259	KP310849
<i>Cytospora pruinopsis</i>	CFCC 50035	<i>Ulmus pumila</i>	KP281260	KP310850
<i>Cytospora pruinosa</i>	CFCC 50036	<i>Syringa oblata</i>	KP310800	KP310845
<i>Cytospora pruinosa</i>	CFCC 50037	<i>Syringa oblata</i>	MH933650	MH933522
<i>C. punicae</i>	7C-09	<i>Punica</i> <i>granatum</i>	MG971939	MG971650

<i>C. punicae</i>	7C-10	<i>Punica granatum</i>	MG971937	MG971648
<i>C. punicae</i>	7C-11	<i>Punica granatum</i>	MG971942	MG971653
<i>C. punicae</i>	5A-80/ CBS 144244	<i>Punica granatum</i>	MG971943	MG971654
<i>C. punicae</i>	5A-81	<i>Punica granatum</i>	MG971938	MG971649
<i>C. punicae</i>	5A-82	<i>Punica granatum</i>	MG971941	MG971652
<i>C. punicae</i>	7C-33	<i>Punica granatum</i>	MG971940	MG971651
<i>C. punicae</i>	CBS 199.50	<i>Punica granatum</i>	JX438622	JX438568
* <i>C. quercicola</i>	<b>MFLUCC 14-0867</b>	<i>Quercus</i> sp.	MF190129	
<i>Cytospora ribis</i>	CFCC 50026	<i>Ulmus pumila</i>	KP281267	KP310856
<i>Cytospora ribis</i>	CFCC 50027	<i>Ulmus pumila</i>	KP281268	KP310857
* <i>C. rosae</i>	<b>MFLUCC 14-0845</b>	<i>Rosa canina</i>	MF190131	
* <i>C. rostrata</i>	<b>Ls251</b>	<i>Salix cupularis</i>	KC313890	JX438568
<i>C. rostrata</i>	CFCC 89909	<i>Salix cupularis</i>	KR045643	KU710932
<i>C. rostrata</i>	CFCC 89910	<i>Salix cupularis</i>	KR045644	KU710933
* <i>C. rusanovii</i>	<b>MFLUCC 15-0854</b>	<i>Salix babylonica</i>	KY417744	
<i>C. sacculus</i>	CFCC 89624	<i>Juglans regia</i>	KF225615	KP310860
* <i>C. salicacearum</i>	<b>MFLUCC 15-0509</b>	<i>Salix alba</i>	KY417745	
* <i>C. salicina</i>	<b>MFLUCC 15-0862</b>	<i>Salix alba</i>	KY417750	
<i>Cytospora schulzeri</i>	CFCC 50040	<i>Malus domestica</i>	KR045649	KU710936
<i>Cytospora schulzeri</i>	CFCC 50042	<i>Malus asiatica</i>	KR045650	KU710937
* <i>C. sibiraeae</i>	<b>CFCC 50045</b>	<i>Sibiraea angustata</i>	KP340987	
<i>Cytospora sibiraeae</i>	CFCC 50045	<i>Sibiraea angustata</i>	KR045651	KU710938
<i>Cytospora sibiraeae</i>	CFCC 50046	<i>Sibiraea angustata</i>	KR045652	KU710939
<i>Cytospora sophorae</i>	CFCC 50047	<i>Styphnolobium japonicum</i>	KR045653	KU710940
* <i>C. sophorae</i>	<b>CFCC 89598</b>	<i>Sophora japonica</i>	KR045654	KU710941

<i>Cytospora sophoricola</i>	CFCC 89596	<i>Styphnolobium japonicum</i> var. <i>Pendula</i>	KR045656	KU710943
<i>Cytospora sophoricola</i>	CFCC 89595	<i>Styphnolobium japonicum</i> var. <i>pendula</i>	KR045655	KU710942
<i>Cytospora sophoriopsis</i>	CFCC 89600	<i>Styphnolobium japonicum</i>	KR045623	KU710915
* <i>C. sorbi</i>	<b>MFLUCC 16-0631</b>	<i>Sorbus aucuparia</i>	KY417752	
* <i>C. sorbicola</i>	<b>MFLUCC 16-0584</b>	<i>Acer pseudoplatanus</i>	KY417755	
<i>C. sorbicola</i>	KARE59	<i>Prunus dulcis</i>	MG971849	MG971562
<i>C. sorbicola</i>	KARE78	<i>Prunus dulcis</i>	MG971844	MG971557
* <i>C. spiraeae</i>	<b>CFCC 50049</b>	<i>Spiraea salicifolia</i>	MG707859	
<i>Cytospora tamaricicola</i>	CFCC 50507	<i>Rosa multiflora</i>	MH933651	MH933525
<i>Cytospora tamaricicola</i>	CFCC 50508	<i>Tamarix chinensis</i>	MH933652	MH933523
* <i>C. ulmi</i>	<b>MFLUCC 15-0863</b>	<i>Ulmus minor</i>	KY417759	
* <i>C. valsoidea</i>	<b>CMW 4309</b>	<i>Eucalyptus grandis</i>	AF192312	
* <i>C. variostromatica</i>	<b>CMW 6766</b>	<i>Eucalyptus globulus</i>	AY347366	
* <i>C. vinacea</i>	<b>CBS 141585</b>	<i>Vitis interspecific hybrid 'Vidal'</i>	KX256256	KX256277
* <i>C. viticola</i>	<b>CBS 141586</b>	<i>Vitis vinifera 'Cabernet Franc'</i>	KX256239	KX256260
* <i>Diaporthe ampelina</i>	Wolf912	<i>Vitis vinifera 'Thompson seedless'</i>	KM669964	KM669820
* <i>Diaporthe benedicti</i>	<b>SBen914</b>	<i>Salix sp.</i>	KM669929	KM669785

Izolati sa **zadebljanim fontom** su referentni za dotičnu vrstu; Izolati sa \* su korišteni za izradu ITS filogenetskog stabla; Izolati s ITS i EF1- $\alpha$  sekvencama su korišteni za ITS+EF1-  $\alpha$  filogenetsko stablo.

## Životopis

Ivana Piškurić, rođena u Karlovcu, 25.04.1995. godine. Osnovnu školu završava u Žakanju. Godine 2010. upisuje smjer „farmaceutski tehničar“ na Zdravstvenom učilištu u Zagrebu, gdje je maturirala 2014. godine. Preddiplomski studij „Zaštita bilja“ na Agronomskom fakultetu u Zagrebu upisuje akademske godine 2014/2015. Navedeni studij završava 2017. godine obranom završnog rada pod naslovom „Ekonomski značaj biljnih virusa“, čime stječe titulu univ. bacc. ing. agr. Diplomski studij „Fitomedicina“ upisuje na Agronomskom fakultetu u Zagrebu 2017. godine. Tijekom navedene godine stječe certifikat za sudjelovanje u razmjeni studenata na projektu Eco Echo organiziranog od strane IDEA u Latviji. Diplomski rad izrađuje u akademskoj godini 2018/2019. pod mentorstvom doc.dr.sc. Joška Kaliterne na Zavodu za fitopatologiju. Slobodno vrijeme voli provoditi s prijateljima, sa svojim ljubimcima, a posebno gledajući amaterske predstave svojevremeno prikazivane u kazalištu Knap u Zagrebu, osmišljene i režirane od strane vrlo drage i talentirane prijateljice.

## **Bilješke**