

# Fenotipska i genotipska karakterizacija gljiva povezanih sa sušenjem šipka (*Punica granatum* L.) u Dalmaciji

---

Šušić, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:426838>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-27**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET

**FENOTIPSKA I GENOTIPSKA KARAKTERIZACIJA GLJIVA  
POVEZANIH SA SUŠENJEM ŠIPKA (*Punica granatum* L.)  
U DALMACIJI**

DIPLOMSKI RAD

Lucija Šušić

Zagreb, rujan 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:  
Fitomedicina

**FENOTIPSKA I GENOTIPSKA KARAKTERIZACIJA GLJIVA  
POVEZANIH SA SUŠENJEM ŠIPKA (*Punica granatum* L.)  
U DALMACIJI**

DIPLOMSKI RAD

Lucija Šušić

Mentor:

Doc. dr. sc. Joško Kaliterna

Zagreb, rujan 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
**AGRONOMSKI FAKULTET**

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

Ja, Lucija Šušić, JMBAG 0178108734, rođena 21.06.1997. u Zadru, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

**FENOTIPSKA I GENOTIPSKA KARAKTERIZACIJA GLJIVA POVEZANIH SA SUŠENJEM ŠIPKA**  
**(*Punica granatum* L.) U DALMACIJI**

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- 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 **Lucije Šušić**, JMBAG 0178108734 naslova

**FENOTIPSKA I GENOTIPSKA KARAKTERIZACIJA 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   | _____ |



## Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Pregled literature .....	3
2.1. Bolesti šipka uzrokovane fitopatogenim gljivama .....	3
2.1.1. Trulež plodova šipka uzrokovana gljivama <i>Aspergillus niger</i> i <i>Alternaria alternata</i> .....	3
2.1.2. Botriosferijski rak stabla i palež izboja šipka uzrokovan gljivama <i>Neofusicoccum parvum</i> i <i>Lasiodiplodia theobromae</i> .....	5
2.1.3. Citosporioze šipka .....	7
3. Cilj i hipoteza .....	11
4. Materijali i metode.....	12
4.1. Porijeklo analiziranih izolata .....	12
4.2. Fenotipska karakterizacija izolata .....	13
4.2.1. Kultivacija kolonija izolata na PDA i WA+šipak.....	13
4.2.2. Brzina rasta izolata .....	13
4.2.3. Biometrijska obilježja spora .....	14
4.2.4. Test patogenosti .....	14
4.3. Genotipska karakterizacija izolata.....	15
4.3.1. Izolacija ukupne genomske DNA izolata gljiva .....	16
4.3.2. Umnažanje odsječaka ITS i EF1- $\alpha$ metodom PCR.....	17
4.3.3. Horizontalna gel elektroforeza .....	18
4.3.4. Sekvenciranje PCR produkata.....	18
4.3.5. BLAST i filogenetska analiza .....	18
5. Rezultati i diskusija .....	21
5.1. Rezultati fenotipske karakterizacije izolata.....	21
5.1.1. Obilježja kolonija izolata na PDA i WA+šipak .....	21
5.1.2. Brzina rasta .....	25
5.1.3. Biometrijska obilježja spora .....	26

5.1.4. Rezultati testa patogenosti .....	30
5.2. Rezultati genotipske karakterizacije izolata Grupa 1/2, 3, 5 i 9 .....	33
5.2.1. Molekularna identifikacija izolata .....	33
5.2.2. Filogenetska analiza .....	33
6. Zaključak .....	38
7. Popis literature.....	39
8. Prilog.....	43
Životopis .....	50



## Sažetak

Diplomskog rada studentice Lucije Šušić, naslova

### **FENOTIPSKA I GENOTIPSKA KARAKTERIZACIJA GLJIVA POVEZANIH SA SUŠENJEM ŠIPKA (*Punica granatum* L.) U DALMACIJI**

Na nekoliko lokaliteta na području Dalmacije tijekom 2019. godine su uočene bolesne biljke šipka čiji su simptomi upućivali na citosporiozni rak i venuće. U narednim je istraživanjima potvrđeno da se radi o vrsti *Cytospora punicae* za koju je pretpostavljeno da je glavni uzročnik propadanja šipka. Budući da je šipak cijenjena mediteranska voćna vrsta s visokim potencijalom uzgoja u Dalmaciji, potrebno je dodatno istražiti njezin fitopatološki status u Hrvatskoj. Fitopatogene gljive su najvažniji i najčešći uzročnici bolesti šipka, s posebnim naglaskom na uzročnike bolesti drva. Njihova prisutnost, osobito na oslabjeloj biljci, može dovesti do propadanja cijele biljke. U prethodnim istraživanjima je iz drva šipka sa simptomima venuća izolirano nekoliko gljiva među kojima je jedina identificirana vrsta bila spomenuta *Cytospora punicae*. U ovom su istraživanju analizom DNA sekvenci molekularnih markera ITS i EF1- $\alpha$  primjenom PCR metode identificirane još tri nove vrste za koje se smatra da uz vrstu *C. punicae* uzrokuju propadanje šipka. Dobivene ITS i EF1- $\alpha$  sekvence su uspoređene s odgovarajućim sekvencama iz GenBank baze podataka primjenom bioinformatičkog programa BLAST, a za filogenetsku analizu je korištena metoda Maximum Likelihood. Reprezentativni su izolati okarakterizirani fenotipski, analizom morfoloških karakteristika i testom patogenosti na šipku.

**Ključne riječi:** šipak, fitopatogene gljive, bolesti drva šipka

## Summary

Of the master's thesis – student Lucija Šušić, entitled

### PHENOTYPE AND GENOTYPE CHARACTERIZATION OF FUNGI ASSOCIATED WITH POMEGRANATE (*Punica granatum* L.) DIEBACK IN DALMATIA

During 2019, on few sites across Dalmatia were observed pomegranate plants that were indicating *Cytospora* canker and wilting symptoms. Further research determined a *Cytospora punicae* species from collected wood, presumed to be the main cause of pomegranate decay. Pomegranate is high valued mediterranean species with excellent cultivation potential across region of Dalmatia, therefore further investigation of its phytopathological status in Croatia is crucial. The most important and most common causes of pomegranate diseases are phytopathogenic fungi, with emphasis on the causative agents of wood diseases. Their presence leads to the decay of the whole plant, especially targeting the weakened plants. In previous studies several fungi were isolated from pomegranate plants which indicated wilting symptoms. At the time, the only identified fungi was *Cytospora punicae*. In this study, by using PCR method to analyze DNA sequences of molecular markers ITS and EF1- $\alpha$ , three new species were identified. The new species are believed to cause pomegranate decay in addition to *C. punicae*. The obtained ITS and EF1- $\alpha$  sequences were compared with the corresponding sequences from the GenBank database using the BLAST bioinformatics program, and the Maximum Likelihood method was used for phylogenetic analysis. Representative isolates are described by phenotype. Morphological analysis and pathogenicity test were conducted on pomegranate.

**Keywords:** pomegranate, phytopathogenic fungi, pomegranate wood diseases

## 1. Uvod

Šipak (*Punica granatum* L.) je listopadni grm ili niže stablo iz porodice mogranja (Punicaceae). Dosta raširen naziv za ovu voćnu vrstu je nar, a nešto rjeđe se koristi i naziv mogranj (Miličević i sur, 2017.). Spominje se u Bibliji uz pšenicu, ječam, vinovu lozu, smokvu, maslinu i datulju, kao jedna od sedam vrsta kojima je Bog blagoslovio Obećanu Zemlju (Włodarczyk, 2020.). Autohton je na području od Irana do Himalaje na sjeveru Indije, a uzgaja se i na cijelom Mediteranu gdje se naturalizirao još od antičkog doba. Dakle, uzgaja se u Iranu, mediteranskim zemljama, suhim dijelovima Jugoistočne Azije, Istočne Indije i tropske Afrike, a donekle i u SAD-u (suhi dijelovi Kalifornije i Arizone) te u Kini, Japanu i Rusiji (Viuda-Martos, 2010.). Unatoč odgovarajućim agroekološkim uvjetima, u Hrvatskoj se šipak pretežno uzgaja samo za vlastite potrebe. Najvećim dijelom se mogu pronaći pojedinačna stabla na okućnicama i rubovima parcela priobalnog dijela Hrvatske (Vučković, 2018.). Najviše se uzgaja u dolini rijeke Neretve i na dubrovačkom području, ali je broj komercijalnih nasada malen (Šakić-Bobić, 2016.) pa Hrvatska uvozi šipak iz Turske, Egipta i Izraela (Vučković, 2018.). Vodeći svjetski proizvođači šipka su Indija, Iran, Kina, Turska i SAD, a najveći europski proizvođač je Španjolska (Šakić-Bobić, 2016.). Većina proizvedenog šipka u svijetu se preradi u prehrambenoj, farmakološkoj i kozmetičkoj industriji, dok se u Hrvatskoj najviše konzumira kao svježa sezonska namirnica. Ipak, i na hrvatsko tržište dolaze proizvodi od šipka poput soka, dodataka prehrani i kozmetike (Vučković, 2018.). Iako šipak raste na širokom klimatskom području, visokokvalitetni plodovi mogu se dobiti samo u aridnijim područjima s visokim temperaturama tijekom razdoblja zrenja (Petruzzello, 2021.). Šipak najbolje uspijeva na plodnim tlima bogatim humusom. Pogoduju mu duboka, srednje teška i dobro drenirana, posebice aluvijalna tla. Dobro podnosi tla povećanog saliniteta. Heliofitna je biljka pa negativno reagira na pretjeranu zasjenjenost. Može podnijeti visoke temperature, čak do 48 °C, ali nije tolerantan na smrzavanje te ne podnosi temperature niže od –18 °C (Chandra, 2010.). Šipak ima niz pozitivnih utjecaja na ljudsko zdravlje. Povoljno utječe na zdravlje usne šupljine i kože te na krvožilni sustav. Dobar je antioksidans te ima antidijabetička, protuupalna i antivirusna svojstva (Viuda-Martos, 2010.). Sadrži dijetalna vlakna, folnu kiselinu, vitamin C i vitamin K (Petruzzello, 2021.). Zbog njegove nutritivne vrijednosti svjetska nutricionistička i zdravstvena javnost ga posljednjih godina promovira

kao superhranu (Vučković, 2018.), što je doprinijelo povećanju potražnje za šipkom i pojačanom interesu za njegovim uzgojem (Ezra, 2015.; Kahramanoglu i Usanmaz, 2016.). Iz navedenih razloga, u posljednje vrijeme raste broj znanstvenih istraživanja vezanih uz problematiku uzgoja šipka. Otkriva se sve veći broj bolesti koje ga napadaju i ugrožavaju njegovu uspješnu proizvodnju (Xavier, 2019).

Velik broj fitopatogenih organizama napada šipak, od kojih najveći dio čine fitopatogene gljive, uzročnici mikoza. Najčešće izolirane gljive iz ploda šipka pripadaju rodovima *Penicillium*, *Aspergillus*, *Botrytis* i *Rhizopus* (Ezra, 2015.). Osim mikoza, na šipku se javljaju bakterijske bolesti od kojih je najznačajnija bakterijska palež uzrokovana patogenom *Xanthomonas axanopodis* pv. *punicae* (Munhuweyi, 2016.). Na šipku je utvrđena i pojava virusa, a prvi zabilježeni virus na šipku je CMV, virus mozaika krastvca. Stabla šipka zaražena ovim virusom slabije cvatu te imaju deformirano i mozaično lišće (Juretić i Horvat, 1984.). Na šipku je zabilježeno još virusa, viroida i fitoplazmi, ali ne uzrokuju ekonomski značajne gubitke (Sharma, 2021.). U novije vrijeme, na velikoj važnosti dobivaju bolesti drva šipka. Simptomi uzrokovani fitopatogenim gljivama koje parazitiraju na drvetu, vrlo su ozbiljni te izazivaju propadanje cijele biljke. Bolesti drveta se najčešće javljaju na starijim i loše zbrinutim stablima pa su preventivne mjere i briga o nasadu od velike važnosti u smanjenju izloženosti biljaka ovim patogenima (Gubler i sur., 2017.).

## 2. Pregled literature

### 2.1. Bolesti šipka uzrokovane fitopatogenim gljivama

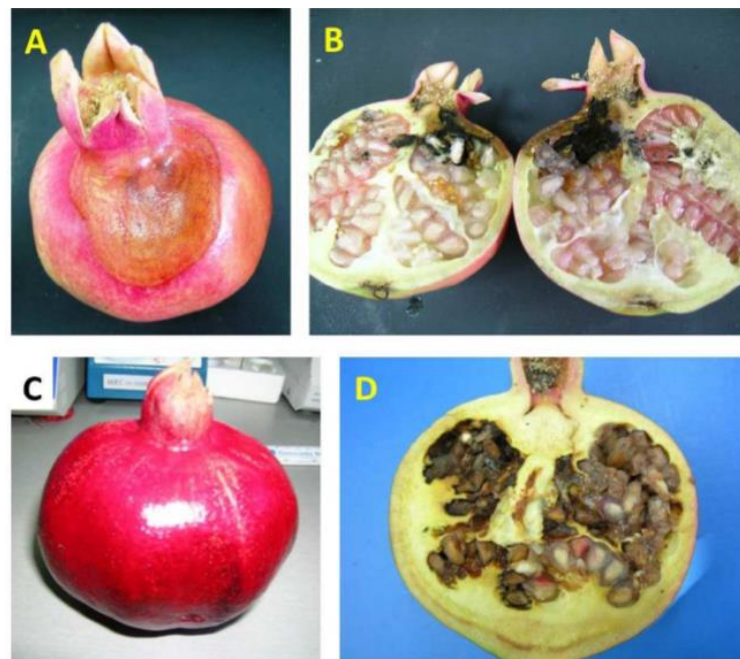
Patogeni organizmi kao što su *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Penicillium* spp., *Coniella granati*, *Colletotrichum gloeosporioides* i *Pestalotiopsis versicolor* su važni uzročnici mikoza na šipku. Infekcije ostvarene prije berbe ostaju u stanju mirovanja sve do skladištenja kada izbijaju simptomi. Navedeni patogeni dovode do kvarenja plodova i olakšavaju propadanje kore i truljenje plodova tijekom skladištenja (Munhuweyi, 2016.). U istraživanju provedenom u Grčkoj, najčešće izolirana gljiva iz simptomatskih plodova šipka bila je *Pilidiella granati* koja je utvrđena i u istraživanjima drugih istraživača iz različitih zemalja (Cintora-Martínez, 2017.; Mirabolfathy, 2012.). *P. granati* je zabilježen kao uzročnik truleži krune ploda i paleži izboja šipka. Nije potvrđeno da ovaj patogen uzrokuje truljenje na drugim kulturama, osim na šipku. Truljenje plodova šipka izazivaju i druge gljive, kao što su *A. niger*, *B. cinerea* i *Phoma* sp., ali u manjem postotku. Vrste iz roda *Phoma* ranije nisu bile poznate kao uzročnici truleži šipka (Thomidis, 2014.). Osim navedenih uzročnika truleži plodova, veliki problem predstavlja i gljiva *Ceratocystis fimbriata* kao jedan od glavnih uzročnika venuća šipka (Jadhav, 2011.) te gljive *Neofusicoccum parvum* i *Lasiodiplodia theobromae* koje također pripadaju među važnije patogene drva šipka (Xavier, 2019.). Vrste roda *Cytospora*, *C. punicae* i *C. granati*, također su usko vezane uz propadanje drva šipka, a novija je spoznaja da *C. punicae* može uzrokovati i propadanje plodova šipka u skladištu (Mincuzzi i sur., 2017.).

#### 2.1.1. Trulež plodova šipka uzrokovana gljivama *Aspergillus niger* i *Alternaria alternata*

Trulež uzrokovana gljivom *Aspergillus niger* se pojavljuje svake godine u većini komercijalnih nasada šipka uzrokujući značajan gubitak prinosa i smanjenu kvalitetu plodova (Kumar, 2016.). Bolest je češća u kišnoj sezoni, a infekcija se ostvaruje tijekom cvatnje i formiranja plodova (Munhuweyi, 2016.). Simptomi na perikarpu plodova javljaju se u vidu sferičnih uleknutih mrlja svjetlije žute do smeđe-crvene boje. Međutim, simptomi mogu biti ograničeni samo na unutrašnjost ploda (Kumar, 2016.; Munhuweyi, 2016.). Ovaj patogen češće izaziva simptome vidljive na vanjskom dijelu ploda, nego *Alternaria alternata* čiji su

simptomi vidljivi samo unutar ploda (Adaskaveg, 2018.). Gljiva se zadržava u tlu na otpaljoj vegetaciji, a spore se raznose zrakom. Prodire kroz rane ili mjesta rezidbe, a simptomi se uglavnom javljaju tijekom ili nakon berbe (Snowdon, 2010.).

Unutrašnja trulež ili crna trulež plodova uzrokovana patogenom *Alternaria alternata* je jedna od važnijih bolesti šipka koja značajno utječe na proizvodnju šipka u svijetu. Za bolest je karakteristična crna trulež unutrašnjosti ploda koja se širi iz područja cvjetne čaške (kaliksa), dok vanjski dio ploda zadržava zdrav izgled. Spore ovog patogena klijavu na njuški tučka otvorenog cvijeta i nastavljaju razvoj u vratu tučka. Kod nekih voćaka, micelij zahvaća donji lokulus gdje gljiva ostaje u latentnoj fazi tri do četiri mjeseca, odnosno do početka dozrijevanja plodova. Kod malog broja voćki, gljiva se nastavlja širiti i invadira zrna šipka uzrokujući crnu trulež u donjem lokulusu. U početku razvoja bolesti, gljiva uzrokuje smeđu trulež arila (sočno meso koje okružuje svaku sjemenku šipka), koji postaju crni i suhi s rastom gljive. Gljiva raste iz donjeg u gornji lokulus, uzrokujući gljiloću cijelog ploda (Ezra, 2014.).



Slika 2.1.1.1. Vanjski i unutanji simptomi na šipku. A i B: trulež uzrokovana *Aspergillus* spp. C i D: trulež uzrokovana patogenom *Alternaria alternata*

Izvor: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-07-14-0707-RE>

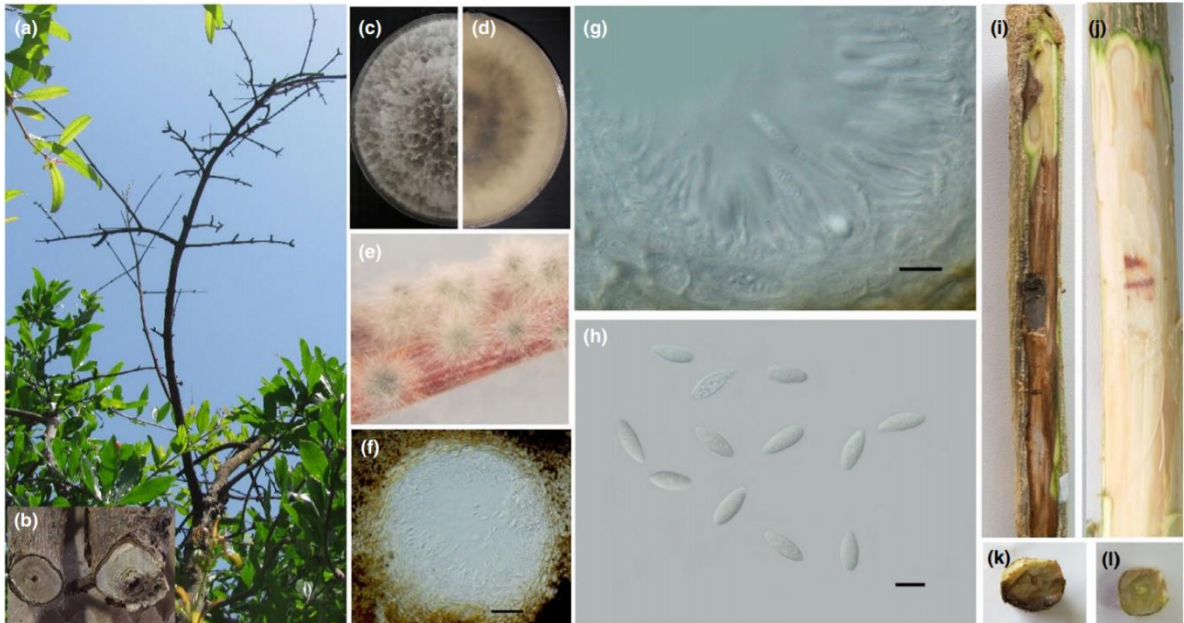
(pristupljeno: 11.08.2021.)

Mumificirano voće ostavljeno u nasadu tijekom zime održava zarazu i omogućuje širenje i sporulaciju patogena koji uzrokuju truljenje plodova šipka sljedeće godine. Iz navedenog razloga, vrlo je važno provoditi higijenu nasada (Thomidis, 2014.). Dakle, naglasak je na preventivnim mjerama koje podrazumijevaju uklanjanje trulih plodova iz nasada. U prevenciji bolesti koristi održavanje krošnje šipka prozračnom te sadnja šipka na osunčanim mjestima bez sjene (Miličević i sur., 2017.). Voda za navodnjavanje i kiša mogu proširiti piknospore sa prezimjelih piknida na koru drveta ili mlade voćke i uzrokovati latentne infekcije (Thomidis, 2014.). Prema epidemiologiji bolesti, propadanje plodova poslije berbe može biti uzrokovano patogenima koji se nalaze u ranama i mikrooštećenjima zrelih plodova koja su nastala prije, tijekom ili nakon berbe. Simptomi mogu izbiti tek nakon berbe iako je zaraza ostvarena u vrijeme cvatnje i zretanja plodova. Bolest ostaje u latentnom stanju zbog prirodne otpornosti šipka ili nepogodnih vanjskih uvjeta. Vrsta i količina inokuluma određuje hoće li doći do ekonomskih gubitaka poslije berbe. Za razliku od drugih proizvodnih područja, u zemljama Europske unije nisu dopušteni konvencionalni kemijski fungicidi za tretiranje šipka nakon berbe (Palou, 2019.).

### 2.1.2. Botriosferijski rak stabla i palež izboja šipka uzrokovan gljivama *Neofusicoccum parvum* i *Lasiodiplodia theobromae*

Dvije patogene gljive iz porodice Botryosphaeriaceae, *Neofusicoccum parvum* i *Lasiodiplodia theobromae*, uzrokuju botriosferijski rak stabla i palež izboja šipka. Za početak bolesti tipične su male smeđe lezije na mladim izbojima. Umjetno zaraženo stablo razvija simptome nalik paleži tri mjeseca nakon inokulacije. Lezije se šire i poprimaju oblik velikih ispupčenih rak-rana sa dubokim pukotinama i brojnim plodnim tijelima godinu dana nakon inokulacije patogenom. Stablo potpuno odumire unutar dvije godine od infekcije. Na površini grana postaju vidljiva mnogobrojna plodna tijela (Xavier, 2019.). U istraživanju provedenom u Iranu (Golmohammadi, 2019.), simptomi bolesti na stablima šipka su uključivali zakrčljale izdanke i usporeni rast, rak-rane i nekroze, promjenu boje provodnog staničja te sušenje grana. U voćnjaku je otprilike 5 % stabala bilo zaraženo. Rezultati testa patogenosti provedenog u sklopu istraživanja u Iranu su također utvrdili da *N. parvum* ima veliki patogeni potencijal na šipku. Nekroza u vidu smeđenja drveta se širila iznad i ispod

mjesta inokulacije. Prosječna duljina lezije bila je  $22 \pm 2$  cm mjesec dana nakon inokulacije, dok se kod kontrole nisu razvili simptomi bolesti (Golmohammadi, 2019.).



Slika 2.1.2.1. Sušenje šipka i rak-rane uzrokovane gljivom *Neofusicoccum parvum*

(a) Sušenje i simptomi rak-rana na mladim grančicama i granama. (b) Nekroza i smeđa vaskularna promjena boje tkiva kambija. (c – d) Sedam dana stara kolonija na PDA. (e) Konidiomati nastali na borovim iglicama na WA. (f) Uzdužni presjek piknida. (g) Konidiogene stanice. (h) Hijaline i fusiformne konidije. (i – l) Rezultati testa patogenosti. Mjerilo: (f): 50  $\mu\text{m}$ , (g – h): 10  $\mu\text{m}$

Izvor: <https://www.researchgate.net/profile/Hojjatollah-Rabbani-Nasab/publication/339571556>

(pristupljeno: 27.08.2021.)

Među važnijim mjerama sprječavanja bolesti je pregled stabala kako bi se uočile oboljele grane. Fitopatogene gljive *Neofusicoccum parvum* i *Lasiodiplodia theobromae* su često izolirane iz cvjetne stapke, specijalizirane stabljike koja plod pričvršćuje za granu. Rezidba bolesnih grana i preostalih cvjetnih stapki bi trebala pomoći u smanjenju prijenosa patogena. Proizvođači moraju voditi računa o vlažnosti pri rezidbi bolesnih grana, poželjno ju je provoditi tijekom suhog vremena. Rezovi trebaju biti kosi kako bi se omogućilo istjecanje vode s grane. Rezidbu je najbolje obaviti zimi kada je proizvodnja spora niska i biljke su u stanju mirovanja, ili u kasnu jesen kada su rane manje podložne infekcijama i brže zarastaju.



Opremu za rezidbu koja dođe u dodir s oboljelim tkivom treba dezinficirati odobrenim sredstvom za dezinfekciju između svakog stabla (Xavier, 2019.).

### 2.1.3. Citosporioze šipka

Za bolesti uzrokovane gljivama iz roda *Cytospora* koristi se skupni naziv citosporioze. Naziv *Cytospora* se koristi od 1818. godine i uključuje endofitne vrste izolirane iz kore, ksilema i lišća asimptomatskih drvenastih biljaka, saprofite koji koloniziraju i uzrokuju propadanje bolesnog ili mrtvog drva te uzročnike rak-rana za koje je zabilježeno da napadaju preko 85 drvenastih biljnih vrsta (Lawrence i sur., 2018.). Rodovi *Leucostoma*, *Valsa*, *Valsella* i *Valseutypella* ranije su se koristili kao sinonimi roda *Cytospora* (Pan, 2020.). Naziv *Cytospora* se koristi za nespolni stadij patogena koji je puno češći u prirodi nego spolni stadij (*Valsa* i *Leucostoma*) (Jacobi, 1994.). Bolesti drva uzrokovane gljivama iz roda *Cytospora* imaju razarajuć učinak na brojne poljoprivredne kulture, osobito na koštuničave, jezgričave i lupinaste voćne vrste kao što su *Prunus persica*, *P. armeniaca*, *P. avium*, *Malus* spp. i *Juglans* spp. Vrste roda *Cytospora* pogađaju grane, ali i debla gdje im je učinak na biljku još razorniji što uvelike utječe na rodnost i vijek nasada (Lawrence i sur., 2018., Slika 2.1.3.1.). Zbog svoje oportunističke prirode, gljive iz roda *Cytospora* najveće štete uzrokuju kod oslabjelih biljaka u stresnim uvjetima, kao što su suša, poplave, mraz ili štete nastale od kukaca (Guyon i sur., 1996.). Prema internet bazi *Index Fungorum* (<http://www.indexfungorum.org>) opisane su 674 vrste iz ovog roda, međutim Kirk i sur., (2008.) naveli su otprilike 110 prihvaćenih vrsta roda *Cytospora*. Za ostale vrste se smatra da su sinonimi prethodno opisanih vrsta ili uopće ne pripadaju ovom rodu (Lawrence i sur., 2018.). Tradicionalna identifikacija vrsta roda *Cytospora* je uglavnom bila bazirana na pripadnosti određenom domaćinu. Ipak, jedna vrsta se može pojavljivati na različitim domaćinima, a više vrsta roda *Cytospora* može biti izolirano iz jednog domaćina (Pan, 2020.). Fitopatolozi obično ne mogu precizno identificirati izolate gljiva iz roda *Cytospora* do vrste samo na temelju morfologije nespolnih plodnih tijela. Točna identifikacija *Cytospora* spp. korištenjem samo morfoloških obilježja je vrlo teška te je za točnu determinaciju neophodna molekularna analiza (Adams, 2006.).



Slika 2.1.3.1. Citosporiozni rak, promjena boje drva i odumiranje grana šipka

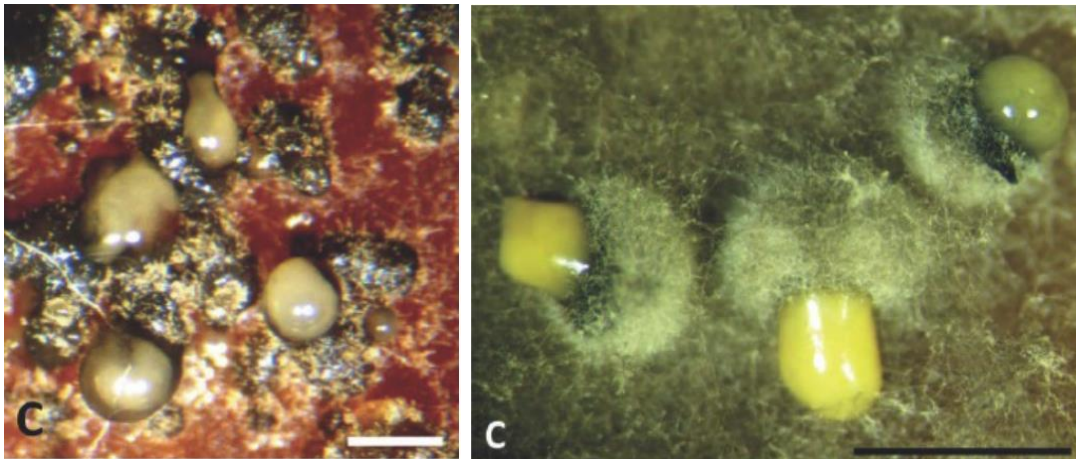
Izvor: <https://imafungus.biomedcentral.com/articles/10.5598/imafungus.2018.09.02.07>

(pristupljeno: 9.08.2021.)

#### 2.1.3.1. *Cytospora punicae* i *Cytospora granati* na šipku

Obje gljive su pronađene na šipku na kojemu uzrokuju simptome citosporioznog sušenja. Da se radi o patogenima šipka vidi se iz njihovog latinskog nazivlja u kojem stoje epiteti *punicae* i *granati* prema lat. *Punica granatum* (šipak). Rak uzrokovan vrstama iz roda *Cytospora* karakterističan je po pojavi piknida odmah ispod periderme dajući kori „prištićav” izgled. Takav izgled rak-rane razlikuje se od rak-rane uzrokovane drugim patogenima. U istraživanju provedenom u Kaliforniji (Lawrence i sur., 2018.) najočitiiji simptomi su se pojavili tijekom toplih ljetnih mjeseci, iako su se infekcije mogle dogoditi tijekom kišne zime i ranog proljeća. Simptomi su uključivali lezije kore s mrtvim floemom i kambijem, promjenu boje ksilema, nekrozu drva i eksudat na rubovima rak-rana. Rak-rane su obično utonule, što uzrokuje cijepanje kore i prstenovanje izbojaka. Nastanak rak-rana je najčešće pripisivan rezidbi, opeklinama od sunca i ozljedama uzrokovanim primjenom ulja. *C. punicae* je utvrđena na šipku u brojnim istraživanjima u kojima je zabilježeno da izaziva simptome citosporioznog venuća i truleži šipka. Potvrđena je u istraživanjima u Kaliforniji, Cipru, Iranu (Lawrence i sur., 2018.; Hand i sur., 2014.; Samouel i Kanetis, 2016.; Mahdikhani i Davoodi, 2017.) kao uzročnik raka šipka, u Grčkoj (Palavouzis i sur., 2015.) kao uzročnik apoplektičnog propadanja donjeg dijela debla te u Južnoafričkoj Republici (Venter i sur., 2017.) kao uzročnik trulenja plodova u skladištu (Lawrence i sur., 2018.).

Obje vrste imaju konidije sličnih dimenzija i oblika, pa razlikovnu ulogu u raspoznavanju ovih dviju vrsta imaju piknidi i morfološki izgled kolonije. *C. granati* i *C. punicae* se mogu lako razlikovati prema veličini piknida. Piknidi vrste *C. granati* iznose (610–)673–897(–975)  $\mu\text{m}$ , što ih čini gotovo dvostruko većima od piknida *C. punicae* čije su mjere (210–)237–383(–490)  $\mu\text{m}$  (Lawrence i sur., 2018.).

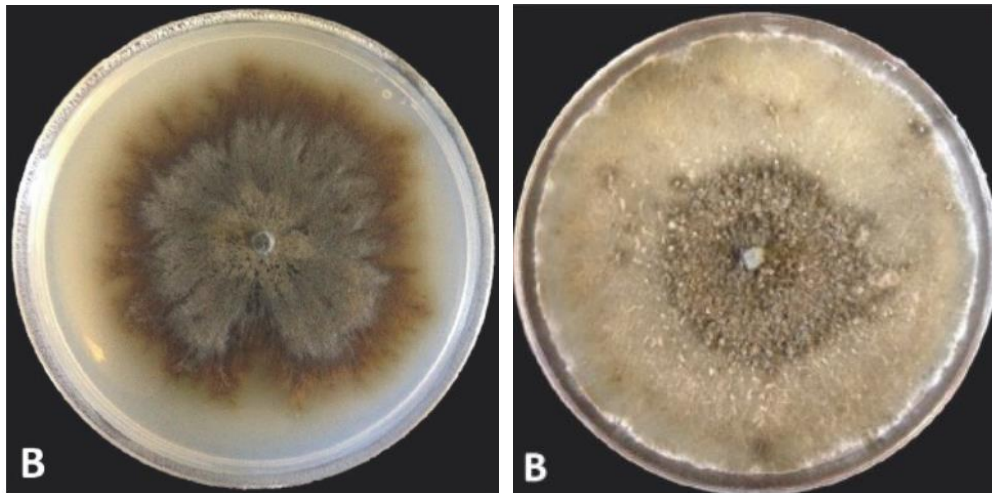


Slika 2.1.3.1.1. Na slikama su prikazani piknidi vrsta *C. punicae* (lijevo) i *C. granati* (desno)

Izvor: <https://imafungus.biomedcentral.com/articles/10.5598/imafungus.2018.09.02.07>

(pristupljeno: 10.08.2021.)

Osim što ima veće piknide, vrsta *C. granati* bilježi i brži rast kolonije (87,3 mm u 7 dana) od *C. punicae* (64,7 mm u 7 dana). Kolonija *C. granati* je bijele do smeđkasto žute boje, dok kolonija *C. punicae* proizvodi karakteristični tamno crveni pigment (Slika 2.1.3.1.2.). Hife obje vrste su hijaline, glatke površine, ravne, razgranate i septirane (Lawrence i sur., 2018.).



Slika 2.1.3.1.2. Na slikama su prikazane četrnaest dana stare kolonije *C. punicae* (lijevo) i *C. granati* (desno) na PDA

Izvor: <https://imafungus.biomedcentral.com/articles/10.5598/imafungus.2018.09.02.07>

(pristupljeno: 10.08.2021.)

Ne postoje pripravci za suzbijanje *Cytospora* spp. infekcije se trebaju spriječiti izbjegavanjem stresnih uvjeta i uklanjanjem simptomatskih grana iz nasada kako bi se suzbilo širenje zaraze. Biljke koje trpe ožegotine od sunca ili veliku sušu, nedostatak kalija te štetnike drva i nematode podložnije su napadu ovih patogena. Zaraženi dijelovi biljaka ostavljeni u nasadu predstavljaju inokulum za razvoj novih infekcija, stoga trebaju biti uklonjeni iz nasada i uništeni. U slučaju previsoke zaraze ekonomski je isplativije ukloniti zaražene biljke i zasaditi novi nasad (Gubler i sur., 2017.).

### 3. Cilj i hipoteza

Tijekom 2019. godine, na području Dalmacije uočene su biljke šipka sa simptomima citosporioznog sušenja. U istraživanjima Piškurić, 2019. i Ivandić, 2020. provedenima na Zavodu za fitopatologiju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu iz prikupljenih uzoraka simptomatičnog drva izolirana je vrsta *Cytospora punicae* (Grupa 1/2) koja je bila djelomično okarakterizirana. Osim spomenute vrste, iz simptomatičnog su drva izolirane i druge gljive koje su provizorno, prema izgledu kolonija na PDA, svrstane u Grupe 3, 5, i 9. Cilj istraživanja je izolatima iz navedenih grupa, opisati fenotipska obilježja, kao i provjeriti patogenost na šipku, molekularno (genotipski) ih okarakterizirati te u konačnici identificirati do razine vrste. U okviru navedenog cilja, bit će također nadopunjena postojeća karakterizacija za izolate Grupe 1/2. Postavljene su sljedeće hipoteze: a) svi izolati Grupe 1/2 pripadaju vrsti *C. punicae*; b) izolati *C. punicea* (Grupe 1/2) su znatno virulentniji na šipku od izolata iz drugih grupa te su stoga vjerojatno glavni uzročnik propadanja šipka u Dalmaciji.

## 4. Materijali i metode

### 4.1. Porijeklo analiziranih izolata

S nekoliko lokaliteta u Dalmaciji su prikupljeni uzorci simptomatičnog drva šipka iz kojeg su izolirane 63 gljive, od kojih su 42 grupirane prema morfološkom izgledu i boji kolonije koju su formirale na PDA (Ivandić, 2020.). Ostali izolati gljiva su identificirani kao saprofiti iz rodova *Alternaria* i *Penicillium* pa nisu svrstani ni u jednu grupu te su isključeni iz daljnjih istraživanja. Grupe su imenovane brojevima. Svi izolati obrađivani u ovome radu nalaze se u Tablici 4.1.1. Potonji su u prethodnom istraživanju (Ivandić, 2020.) provizorno svrstani u Grupe 1, 2, 3, 5 i 9 prema morfološkim karakteristikama kolonija na PDA. Sve gljive označene zelenom bojom su u prethodnom istraživanju svrstane u Grupe 1 i 2 te su unutar istog istraživanja molekularno determinirane do vrste *C. punicae*. Budući da se radi o istim vrstama, u daljnjem će se tekstu svrstavati u zajedničku grupu - Grupu 1/2.

Tablica 4.1.1. Prikaz reprezentativnih izolata i pripadajućih koordinata lokaliteta s kojih su prikupljeni uzorci

Grupa	Izolati	GPS koordinate lokaliteta
1/2	ŠK1-1	43°32'47.4"N 16°26'58.8"E
	ŠK2-3	43°32'47.9"N 16°26'53.5"E
	ŠK3-2	43°33'10.1"N 16°25'20.1"E
3	ŠK5-1	43°33'42.5"N 16°21'57.0"E
1/2	ŠK6-1	43°33'11.9"N 16°20'44.1"E
	ŠK7-1b	43°33'13.1"N 16°20'41.5"E
5	ŠK8-5	43°33'10.3"N 16°20'44.2"E
1/2	ŠK9-4	43°31'15.8"N 16°08'20.4"E
	ŠK10-3	43°30'50.1"N 16°06'22.1"E
9	ŠK11-2a	43°31'48.5"N 16°02'03.0"E
1/2	ŠK12-1	43°32'04.0"N 15°57'57.3"E
	ŠK14	43°31'06.7"N 16°14'10.3"E

## 4.2. Fenotipska karakterizacija izolata

Fenotipska karakterizacija izolata Grupa 1/2 (*Cytospora punicae*), 3 (ŠK5-1), 5 (ŠK8-5) i 9 (11-2a) uključivala je morfološku analizu i praćenje brzine rasta kolonija na hranjivoj podlozi PDA. Pod svjetlosnim mikroskopom promatrana su obilježja konidija prikupljenih iz piknostroma reprezentativnih uzoraka. Testom patogenosti utvđena je patogenost izolata na sadnicama šipka.

### 4.2.1. Kultivacija kolonija izolata na PDA i WA+šipak

Devet reprezentativnih izolata Grupe 1/2 te po jedan izolat iz Grupa 3, 5 i 9 kultivirani su na krumpirovom dekstroznom agaru (PDA, Difco, SAD). Kako bi se analizirala pojava plodnih tijela, samo izolati Grupe 1/2 kultivirani su dodatno i na hranjivoj podlozi vodeni agar uz sterilne grančice šipka (WA+šipak). Svi izolati u ovom istraživanju su kultivirani u termostatu, u mračnim uvjetima na temperaturi od 25 °C.

Iz zbirke izolata istraživanja Ivandić (2020.), precijepljene su gljive na PDA (Difco, SAD) novih Petrijevih zdjelica kako bi se dobile mlade kolonije na kojima se mogu analizirati njihova morfološka obilježja. Pregled fenotipskih karakteristika kolonija navedenih izolata uzgojenih na PDA proveden je nakon 3., 6. i 30. dana, pri čemu je analizirana boja kolonije na licu i naličju, oblik ruba kolonije te pojava plodnih tijela i sporulacije.

Za pripremu hranjive podloge WA+šipak, grančice šipka promjera ~1 cm su narezane na dijelove dužine ~5 cm i postavljene u Petrijeve zdjelice. Autoklavirane su dva puta u razmaku od 24 sata, na 122 °C u trajanju od 25 minuta. U Petrijeve zdjelice promjera 90 mm izliven je vodeni agar. Na tek izliveni vodeni agar postavljena su dva fragmenta autoklaviranih grančica po Petrijevoj zdjelici. Iz zbirke aktivno rastućih reprezentativnih izolata Grupe 1/2, s ruba svake kolonije, uzet je kružni segment micelija te je položen između grančica u svaku Petrijevu zdjelicu, jedan izolat po zdjelici.

### 4.2.2. Brzina rasta izolata

Provedeno je praćenje brzine rasta micelija za 12 reprezentativnih izolata, 9 iz Grupe 1/2 te po jedan izolat iz Grupa 3, 5 i 9. Svaki je izolat kultiviran u triplikatu u Petrijevim zdjelicama promjera 90 mm na PDA. Izolati su pohranjeni u termostat na temperaturu od 25 °C u trajanju od 6 dana. Prvo mjerenje rasta micelija je obavljeno treći, a drugo šesti dan. Za

svaki je izolat izmjeren radijalni rast uzimajući promjere dva najšira mjesta kolonije koja su međusobno okomita. Izmjereni promjeri su umanjeni za dimenzije središnjeg kružnog segmenta PDA (5 mm) koji je bio izvorište rasta kolonije. Izračunate su prosječne vrijednosti dobivenih dimenzija.

#### 4.2.3. Biometrijska obilježja spora

Odabranim reprezentativnim izolatima Grupa 1/2, 3 i 9 kultiviranima na PDA u termostatu pri temperaturi od 25 °C u trajanju od 14 dana, promatrani su boja i oblik konidija korištenjem svjetlosnog mikroskopa. 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 × uz korištenje imerzijskog objektiva svjetlosnog mikroskopa (OLYMPUS, Njemačka). Zatim su izmjerene njihove dimenzije (duljina i širina) pomoću programa za analizu mikroskopskih fotografija (LCmicro, OLYMPUS, Njemačka) ponuđenog u okviru korištenog svjetlosnog mikroskopa. Svakom izolatu izmjereno je minimalno 100 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.

#### 4.2.4. Test patogenosti

Reprezentativnim izolatima provjerena je patogenost na šipku metodom umjetne inokulacije. Sedam dana starim kolonijama izolata su sa ruba kolonije kružnim sjekačem izbušeni 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 sorte Barski slatki 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. Za negativnu kontrolu uzeto je deset sadnica sorte Barski slatki koje su inokulirane na opisani način sterilnim komadićem PDA, bez prisustva izolata gljive (Slika 4.2.4.1.). Pokus je dizajniran kao slučajni blokni raspored (Randomized Complete Block Design – RCBD) s deset repeticija po izolatu,



dakle jednim izolatom gljive inokulirano je deset biljaka. Biljke su čuvane u plateniku na temperaturi od  $25\pm 3$  °C, uz redovito zalijevanje svaka 2 – 3 dana. Šest mjeseci od inokulacije, na uzdužnom presjeku stabljike provedeno je mjerenje duljine nastalih nekrotičnih promjena iznad i ispod mjesta inokulacije. S dobivenim vrijednostima provedena je analiza varijance (ANOVA) te Tukey-Kramer HSD test uz P vrijednost od 0.05 %. 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 preneseni na hranjivu podlogu PDA-Strep u svrhu reizolacije gljive uzročnika. Identifikacija reizoliranih gljiva provedena je na temelju morfoloških obilježja kolonija i/ili konidija.



Slika 4.2.4.1. A) Inokulacija biljke sterilnim PDA (kontrola)  
B) Omatanje inokuliranog mjesta Parafilmom

Izvor: Joško Kaliterna

### 4.3. Genotipska karakterizacija izolata

Kako bi se utvrdila točna taksonomska pripadnost izolata Grupe 1/2, 3, 5 i 9, njihovi su reprezentativni uzorci (navedeni u Tablici 4.1.1., str. 12) podvrgnuti molekularnoj analizi. Za provedbu molekularne analize je potrebno izolirati ukupnu genomsku DNA reprezentativnih izolata te provesti analizu odsječaka unutar nje. Odsječci DNA izolata služe kao molekularni markeri za identifikaciju gljiva. U ovom istraživanju su analizirani molekularni markeri ITS (unutarnja prepisujuća razmaknica, engl. Internal Transcribed Spacer) i EF1- $\alpha$ . Za umnažanje ITS markera korištena je metoda lančane reakcije

polimerazom (PCR) za što su korištene početnice ITS5 (5'- GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') i ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White i sur., 1990.). Za umnažanje EF1- $\alpha$  molekularnog markera korištene su početnice EF1-728F (5'-CAT CGA GAA GTT CGA GAA GG-3') i EF1-986R (5'-TAC TTG AAG GAA CCC TTA CC-3') (Kaliterna, 2013.). Nakon što su se molekularni markeri ITS i EF1- $\alpha$  umnožili provedeno je sekvenciranje izolata u firmi Macrogen Europe. Sve sekvence dobivene u ovom istraživanju uspoređene su s odgovarajućim sekvencama iz međunarodne baze gena GenBank koja se nalazi na mrežnoj adresi <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> uz pomoć bioinformatičkog alata BLAST. Nakon provedene usporedbe sekvenci određena je taksonomska pripadnost analiziranih izolata iz Grupa 1/2, 3, 5 i 9. Za analizirane izolate provedena je i filogenetska analiza uz upotrebu metode Maximum Likelihood u okviru programskog paketa MEGA7.

#### 4.3.1. Izolacija ukupne genomske DNA izolata gljiva

Kako bi se izolirala ukupna genomska DNA reprezentativnih izolata potrebno je kultivirati izabrane izolate gljiva na hranjivoj podlozi PDA. Postojeći izolati se moraju precijepiti u nove Petrijeve zdjelice u koje je prethodno dodan PDA preko kojega se postavila prozirna PVC folija s mikroporama. Uloga folije je olakšavanje prijenosa tek uzgojenog micelija u tubice. U sterilnom kabinetu se iz reprezentativnih uzoraka s ruba mlade kolonije izrezalo 6 malih kvadratića zajedno s dijelom hranjive podloge i precijepilo u novu Petrijevu zdjelicu promjera 90 mm na kojoj se nalaze hranjiva podloga i prozirna PVC folija. Izrezani kvadratići izolata su postavljeni u novu Petrijevu zdjelicu na način da tvore oblik cvijeta (1 kvadratić u središtu i 5 kvadratića oko njega). Novi su izolati postavljeni u termostat na temperaturu od 25 °C kako bi započela inkubacija. Nakon sedam dana količina micelija je bila dostatna za potrebe izolacije DNA. Koristeći sterilnu metalnu lopaticu micelij je sastrugan laganim pokretima, pazeći da se ne zahvati i agar ispod prozirne folije. Sastrugani micelij je umetnut u Eppendorf tubice zapremnine 2 mL. Po uzorku je korišteno 50 - 100  $\mu$ g micelija. Mladi micelij je pohranjen u zamrzivač na -20 °C gdje se nalazio do upotrebe. U sljedećem koraku micelij je prebačen u sterilni tarionik te mu je dodan tekući dušik. Kako bi se micelij usitnio korišten je sterilni tučak. Tako usitnjeni micelij prebačen je u novu tubicu te mu je odmah dodano 0,5 mL pufera za lizu. Pufer je prethodno pripremljen uz dodatak 100 m mol/dm<sup>3</sup> NaCl, 10 m mol/dm<sup>3</sup> Tris-HCl (pH 8,0), 1 m mol/dm<sup>3</sup> EDTA, 2 % Triton X-100, 1 % SDS

i 1 % PVP (Sigma Aldrich, SAD). Tubice su prebačene u digestor gdje im je dodano po 250  $\mu$ L fenola (Sigma Aldrich, SAD), 250  $\mu$ L kloroforma (Kemika, Zagreb). Tubice su kratko vorteksirane, a zatim centrifugirane pri 13500 okretaja/min kroz 25 minuta pri temperaturi od 4 °C. Nakon centrifugiranja je nastao supernatant s vodenom otopinom DNA i RNA (u količini 300 - 400  $\mu$ L). Pomoću pipete odvojen je supernatant određenog volumena. Odgovarajući volumen je izračunat za svaki izolat i prenesen u novu Eppendorf tubicu (1,5  $\mu$ L) u koju je dodan isti volumen hladnog izopropanola (-20 °C) (Kemika, Zagreb). Uslijedilo je centrifugiranje tubica na temperaturi od 4 °C pri 13500 okretaja/min u trajanju od 10 minuta. Nakon centrifugiranja na dnu tubica je vidljiv talog koji je u sebi sadržavao nukleinske kiseline. Kako bi u tubici ostale samo nukleinske kiseline potrebno je odliti supernatant te isprati tubicu s 1 mL 70 %-tnog etanola. Slijedi ponovno centrifugiranje na temperaturi od 4 °C pri 13500 okretaja/min u trajanju od 10 minuta. Supernatant je zatim uklonjen kako bi u tubici ostao samo talog u kojem su sadržane nukleinske kiseline potrebne za daljnju analizu. Tubice su položene otvorom okrenutim prema dolje kako bi se osušio talog, a proces sušenja se odvijao u sterilnom kabinetu pomoću strujanja zraka. U tubice je dodano 50  $\mu$ L TE pufer (pH 8,0, Promega, Madison, SAD) koji je u sebi sadržao i 1  $\mu$ L RNaze-A (50  $\mu$ g/mL, Sigma Aldrich, SAD). Završni korak bila je inkubacija tubica na temperaturi od 55 °C u trajanju od 15 minuta (Santos i Phillips, 2009., preuzeto iz Kaliterna, 2013.).

#### 4.3.2. Umnažanje odsječaka ITS i EF1- $\alpha$ metodom PCR

Metodom lančane reakcije polimerazom (PCR) umnoženi su specifični odsječci DNA molekularnih markera ITS i EF1- $\alpha$ . Za umnažanje ITS molekularnog markera korištene su početnice ITS5 i ITS4, a za umnažanje EF1- $\alpha$  molekularnog korištene su početnice EF1-728F i EF1-986R. Za umnažanje molekularnog markera ITS je korištena reakcijska smjesa koja je sadržavala 25  $\mu$ L reakcijske smjese iz PCR kita Emerald Amp® MAX PCR Master Mix (Takara BIO INC, Japan), 1 % DMSO (Merck, Njemačka), po 12,5 pmol svake početnice i 50 ng DNA predložka. Reakcija umnažanja ITS regija se odvijala u termocikleru Mastercycler (Eppendorf AG, Hamburg, Njemačka) gdje su se mijenjale vrijednosti i trajanje reakcije pri određenim temperaturama pa se tako početna denaturacija odvijala pri temperaturi od 95 °C kroz 10 minuta, zatim je provedeno 35 ciklusa umnažanja u 3 koraka. Prvi korak je uključivao denaturaciju na temperaturi od 94 °C u trajanju od 30 sekundi. Prilijeganje početnica na 55

°C u trajanju od 30 sekundi provedeno je u drugom koraku, a treći je korak bio umnažanje na temperaturi od 72 °C u trajanju od 60 sekundi. Nakon posljednjeg ciklusa umnažanja, uslijedio je posljednji korak, odnosno završno umnažanje na temperaturi od 72 °C kroz 10 minuta (Marin, 2016.). Na prethodno opisani način odvijalo se i umnažanje molekularnog markera EF1- $\alpha$ .

#### 4.3.3. Horizontalna gel elektroforeza

Uspješnost PCR reakcije i provjera veličine PCR produkata se potvrđuje primjenom horizontalne gel elektroforeze (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, SAD) u 1,5 %-*tnom* agaroznom gelu (Sigma Aldrich, SAD) u koji se dodaje boja GelStar<sup>TM</sup> (Lonza, Švicarska), konačne koncentracije gela 5 - 10  $\mu$ L/20 mL. Elektroforetski pufer korišten za elektroforezu je 0,5 %-*tni* TBA (Sigma Aldrich, SAD), a sama elektroforeza je provedena pri 75 V u trajanju od 30 minuta. Za molekularnu težinu DNA kao standardni marker je korišten „100bp Ladder“ (Ladder 100 - 1500 pb, Intron Biotechnology, Koreja). Očitavanje rezultata je obavljeno pod UV svjetlom uz upotrebu transiluminatora (Marin, 2016.).

#### 4.3.4. Sekvenciranje PCR produkata

Za utvrđivanje redoslijeda nukleotida umnoženih odsječaka DNA molekularnog markera ITS i EF1- $\alpha$ , PCR produkti su poslani u biotehnološku kompaniju Macrogen Europe (Macrogen Europe Inc., Amsterdam, Nizozemska), gdje su pročišćeni i sekvencirani. Sekvenciranje molekularnih markera provedeno je u oba smjera uz pomoć početnica koje su se koristile za njegovo umnažanje. Uređaj koji se koristio za sekvenciranje bio je automatski sekvencer ABI3730XL (Applied Biosystems, SAD).

#### 4.3.5. BLAST i filogenetska analiza

Dobivene su sekvence molekularnih markera ITS i EF1- $\alpha$  za izolate Grupe 1/2, 3 i 9. Za Grup 5 dobivene su samo ITS sekvence. Sve su sekvence obrađene pomoću programskog paketa MEGA 7. Nakadno se obavila filogenetska analiza izolata Grupa 1/2, 3, 5 i 9. U programu MEGA 7 su sekvence DNA poravnate pomoću modula „Alignment explorer“, zatim su uređene u smjeru 5' prema 3' i pohranjene su u tekstualnu datoteku u FASTA formatu.

Molekularna identifikacija izolata gljiva 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 na mrežnoj adresi <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. Usporedba je provedena pomoću programa BLAST (Basic Logical Alignment Search Tool) kojemu se može pristupiti na mrežnoj adresi <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Prema postotku podudarnosti, odnosno homologije između analiziranih izolata iz ovog istraživanja i njima referentnih izolata iz baze podataka GenBank se temeljio zaključak o pripadnosti izolata pojedinoj vrsti. Za dodatnu potvrdu homologije sekvenci provedena je filogenetska analiza upotrebom metode Maximum Likelihood.

Kreirano je filogenetsko stablo bazirano na kombiniranim ITS i EF1- $\alpha$  sekvencama (ITS+EF1- $\alpha$ ) izolata Grupe 1/2 i Grupe 9 te odgovarajućih referentnih sekvenci preuzetih iz baze GenBank (Prilog, Tablica 8.1.1.). Prilikom izrade filogenetskog stabla korištena je metoda Maximum Likelihood prema ovim parametrima: „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“ = Use All Sites; „ML Heuristic Method“ = Nearest-Neighbor-Interchange (NNI); „Initial Tree for ML“ = Make initial tree automatically; „Branch Swap Filter“ = Very Strong (Phillips i sur., 2012.).

Za Grupu 3 kreirano je filogenetsko stablo bazirano na kombiniranim ITS i EF1- $\alpha$  sekvencama (ITS+EF1- $\alpha$ ) izolata ŠK5-1 i odgovarajućih referentnih sekvenci preuzetih iz baze GenBank (Prilog, Tablica 8.1.2.). Prilikom izrade filogenetskog stabla korištena je metoda Maximum Likelihood prema ovim parametrima: „Substitution Type“ = Nucleotide; „Model / Method“ = Kimura 2; „Rates among Sites“ = Gamma distributed(G); „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.).

Za Grupu 5 kreirano je filogenetsko stablo bazirano na ITS sekvenci izolata ŠK8-5 i odgovarajućih referentnih sekvenci preuzetih iz baze GenBank (Prilog, Tablica 8.1.3.), (Kaliterna, 2013.). Prilikom izrade filogenetskog stabla korištena je metoda Maximum Likelihood prema ovim parametrima: „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.

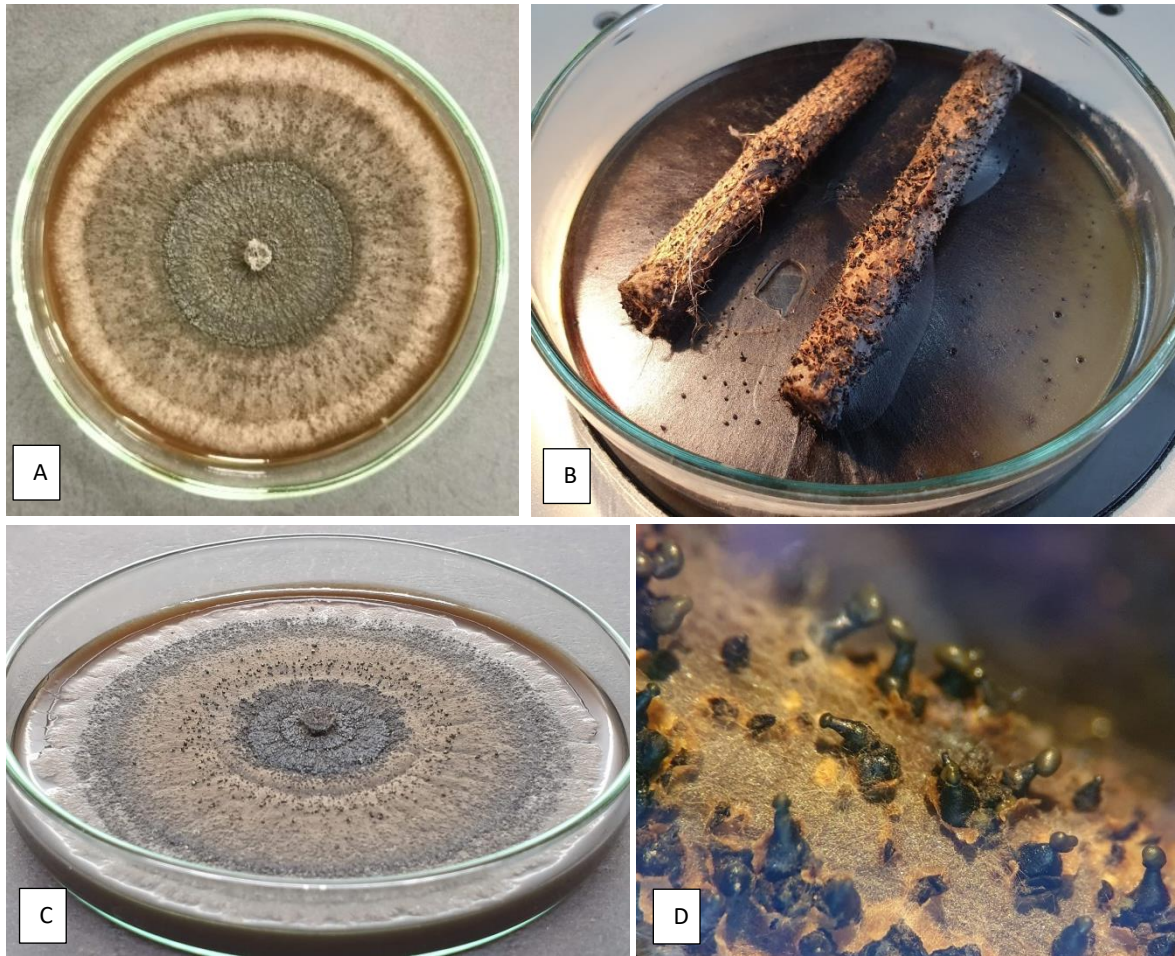
## 5. Rezultati i diskusija

### 5.1. Rezultati fenotipske karakterizacije izolata

Na temelju promatranih obilježja kolonija izolata, sporulacije na grančicama šipka, brzine rasta micelija, izgleda i dimenzija konidija te patogenog potencijala gljive unutar domaćina utvrđeno je o kojim se rodovima, odnosno vrstama fitopatogenih gljiva radi što će se kasnije dodatno potvrditi molekularnom analizom.

#### 5.1.1. Obilježja kolonija izolata na PDA i WA+šipak

Kolonije izolata Grupe 1/2 (Tablica 4.1.1., str. 12) doista svojom morfologijom upućuju na vrstu *C. punicae*, a među izolatima te grupe postoje sitne varijacije što je rezultat intraspecijske varijabilnosti. Kolonije Grupe 1/2 su u 6 dana na 25 °C prosječno narasle 56 mm (Tablica 5.1.2.1., str. 26) što je konzistentno istraživanju Lawrence i sur. (2018.) za vrstu *C. punicae*. Izolati Grupe 1/2 također su bogato sporulirali na WA+šipak što je prikazano na Slici 5.1.1.1.B, str. 22 na primjeru izolata ŠK10-3. Pod stereomikroskopom su vidljiva crna nespolna plodna tijela kruškolikog oblika - piknidi (Slika 5.1.1.1.D, str. 22). Nalaze se u nakupinama ili pojedinačno. Na presjeku piknida vidljivi su konidiofori na kojima se stvaraju konidije. Iz ostiola, otvora na vrhu piknida, izlučuju se konidije u žutom, narančastom do crvenom matriksu. Kolonija sa starenjem na PDA i na WA+šipak u hranjivu podlogu luči karakteristični crveni pigment što je konzistentno s opažanjima drugih istraživača za vrstu *C. punicae* (Lawrence i sur., 2018.).



Slika 5.1.1.1. Fenotipska obilježja izolata *C. punicae* (Grupa 1/2) na primjeru izolata ŠK10-3  
 A) i C) *C. punicae* na PDA B) i D) Sporulacija *C. punicae* iz pojedinačnih piknida  
 na WA+šipak pod stereomikroskopom

Izvor: Lucija Šušić

Izolatu ŠK8-5 iz Grupe 5 (Slika 5.1.1.2., str. 23) zbog odsutstva determinacijskih faktora nije provizorno utvrđena taksonomska pripadnost, ali je identificirana naknadno kao vrsta *Rosellinia corticium* u okviru filogenetske analize (Podnaslov 5.2.2., str. 33). Kolonija je imala slab inicijalni rast, ali nakon 3. dana bilježi rapidan rast pa je tako 6. dana utrostručila svoj promjer. Kolonija je čisto bijele boje i tvori „pletence“. Micelij je „žilav“ te ga je teško izrezati kružnim sjekačem. Nije opažena sporulacija na PDA.

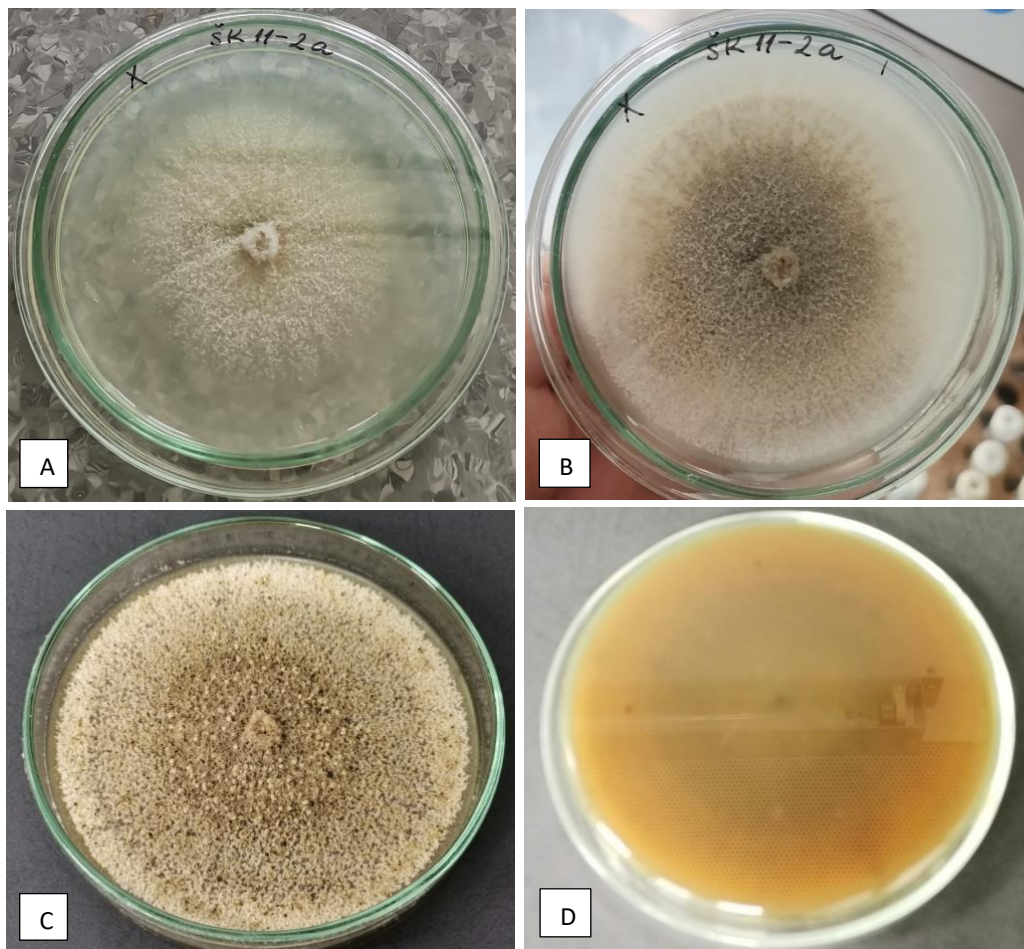




Slika 5.1.1.2. Kolonija izolata ŠK8-5 (Grupa 5) fotografirana 30.dan od precijepljivanja na PDA

Izvor: Lucija Šušić

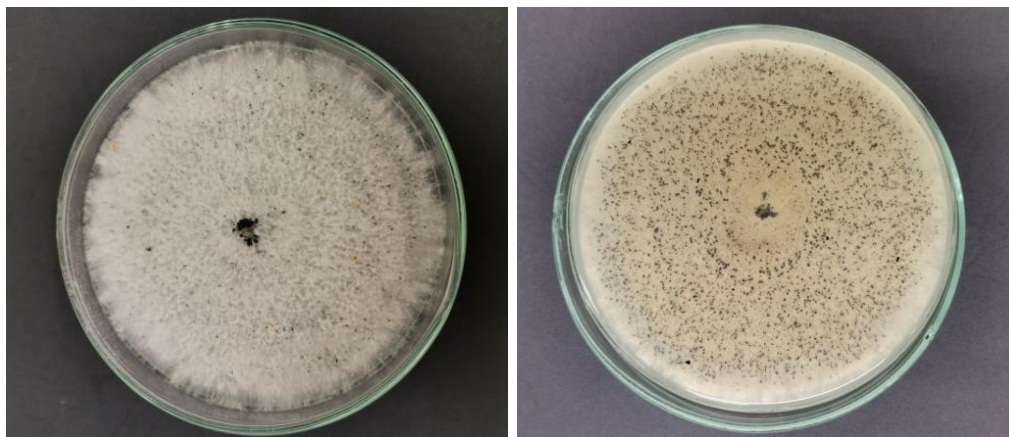
Izolat ŠK11-2a Grupe 9 (Slika 5.1.1.3., str. 24) je prema morfološkom izgledu kolonije te izgledu i veličini konidija svrstan u *Cytospora* spp. Sličan izgled kolonije opisan je u istraživanju Singh, 2007. gdje je iz drva mangrova (*Conocarpus erectus*) u Kostarici izolirana gljiva koja prema svom fenotipu odgovara izolatu ŠK11-2a. Brzina rasta kolonije izolata CR200 na PDA u istraživanju Singh, 2007. bila je 74 mm u 7 dana na 22 °C, dok je u ovom istraživanju izolat ŠK11-2a za kojega se smatra da bi mogao biti istovjetan izolatu CR200 narastao 85 mm u 6 dana na 25 °C što također upućuje da je riječ o istoj vrsti. Osim brzine rasta, morfološki izgled kolonije izolata CR200 starosti 21 dan je opisan kao mekan, baršunasti, grudičast do prhak s poluuronjenim micelijem i čestim konidiomatima što također odgovara izolatu ŠK11-2a. Izolat ŠK11-2a je s gornje strane bež boje s tamnijim smeđim centrom, dok je mlađi micelij svjetliji. Naličje je oker do smeđe boje što također odgovara izolatu CR200. Boja kolonije se mijenjala od bijele do smeđe-sive sa žuto-smeđim obojenjem u središtu. Konidiomati su postali vidljivi 14. dana u vidu bijelih do svijetlo smeđih točkica djelomično uronjenih u agar. Sa starenjem kolonije piknidi su poprimali tamno smeđu boju. Uz pomoć programa BLAST, pretraga ITS sekvenci izolata CR200 utvrdila je da je izolat CR200 najbliži *C. acaciae* (96 %) (Singh i sur., 2007.).



Slika 5.1.1.3. A) Kolonija izolata ŠK11-2a (Grupa 9) 3. dan B) 6. dan C) 30. dan prikazana s gornje strane D) 30. dan prikazana s donje strane

Izvor: Lucija Šušić

Na izolatu ŠK5-1 Grupe 3 (Slika 5.1.1.4., str. 25) vidljivi su piknidi okruglog do kruškolikog oblika, nalaze se u nakupinama ili su raspršeni pojedinačno, djelomično su uronjeni u PDA, tamno smeđe do crne su boje. Izlučuju kuglasti, sluzavi, tamno smeđi eksudat koji sadrži mnoštvo konidija. Rub kolonije je nepravilna oblika, bjelkaste je boje, s rijetkim zračnim micelijem na površini. Konidiomati su crni i gregarigeni, a naličje je blijede boje meda. Zbog izgleda kolonije i konidija koje odgovaraju nalazima drugih istraživača (Maharachchikumbura i sur., 2014.), pretpostavka je bila da se radi o vrsti *Pestalotiopsis biciliata*.



Slika 5.1.1.4. Izolat ŠK5-1 Grupe 3 s gornje (lijevo) i donje strane (desno)

Izvor: Lucija Šušić

### 5.1.2. Brzina rasta

Prosječni promjeri kolonija za izolate Grupe 1/2, 3, 5 i 9 prikazani su u Tablici 5.1.2.1., str. 26. Izolati vrste *Cytospora punicae* prosječno su narasli 28 mm u 3 dana, odnosno 56 mm u 6 dana. Dakle, prosječno rastu oko 1 cm dnevno. Za 7 dana prosječna brzina rasta za ovu vrstu bila bi 65,3 mm što je konzistentno s rezultatima dobivenim u istraživanju Lawrence i sur., 2018. U spomenutom je istraživanju prosječna brzina rasta kolonije *C. punicae* bila 64,7 mm. Najsporiji rast nakon 3. dana bilježi izolat ŠK8-5 iz Grupe 5, a nakon 6. dana najsporiji rast imala je vrsta *C. punicae* iz Grupe 1/2. Najbrži rast bilježi izolat ŠK11-2a provizorno identificiran kao *C. acaciae*, koji je u 3 dana narastao gotovo jednako kao *C. punicae* u 6 dana. Iako se radi o vrstama istog roda, značajna je razlika u brzini rasta.

Tablica 5.1.2.1. Prosječni promjeri (mm) kolonija iz Grupa 1/2, 3, 5 i 9

Grupa	Izolat	Vrsta	25 °C	
			3.dan (mm)	6.dan (mm)
1/2	9 izolata*	<i>Cytospora punicae</i>	28	56
3	ŠK5-1	<i>Pestalotiopsis biciliata</i>	34	71
5	ŠK8-5	<i>Rosellinia corticium</i>	25	76
9	ŠK11-2a	<i>Cytospora acaciae</i>	57	85

\*izračunata je prosječna brzina rasta za 9 izolata *C. punicae* navedenih u Tablici 1 (svaki je uzgojen u triplikatu) za 3. i 6. dan

### 5.1.3. Biometrijska obilježja spora

Prosječna vrijednost srednjih vrijednosti svih izolata iz Grupe 1/2 iznosi  $3,89 \pm 0,46 \times 1,33 \pm 0,19$ , a srednja vrijednost izolata ŠK11-2a iz Grupe 9 iznosi  $3,79 \pm 0,41 \times 1,06 \pm 0,15$ . Dobivene vrijednosti se međusobno značajno ne razlikuju što se može pripisati tome što izolati obiju grupa pripadaju rodu *Cytospora*. Srednja vrijednost konidija izolata ŠK5-1 iz Grupe 3 iznosi  $21,13 \pm 1,92 \times 5,85 \pm 0,11$ . Dakle, konidije izolata ŠK5-1 svojim dimenzijama i izgledom značajno odskakuju od konidija izolata iz roda *Cytospora*.

Tablica 5.1.3.1. Dimenzije konidija izolata iz Grupe 1/2 (*C. punicae*), Grupe 3 (*Pestalotiopsis biciliata*) i Grupe 9 (*C. acaciae*)

Dimenzije konidija ( $\mu\text{m}$ ) Grupe 1/2		
Izolat	Veličina konidija ( $D \times \check{S}$ ) <sup>†</sup>	Srednja vrijednost $\pm$ S.D. <sup>§</sup>
ŠK3-2	(3,02-) <b>3,89 – 4</b> (-5,02) $\times$ (0,75-) <b>1,23 – 1,28</b> (-1,58)	<b>3,95</b> $\pm$ 0,35 $\times$ <b>1,25</b> $\pm$ 0,14
ŠK10-3	(2,46-) <b>3,80 – 3,95</b> (-5,35) $\times$ (0,11-) <b>1,13 – 1,18</b> (-1,73)	<b>3,88</b> $\pm$ 0,45 $\times$ <b>1,16</b> $\pm$ 0,17
ŠK6-1	(2,63-) <b>3,52 – 3,64</b> (-4,52) $\times$ (0,92-) <b>1,29 – 1,34</b> (-1,73)	<b>3,58</b> $\pm$ 0,35 $\times$ <b>1,32</b> $\pm$ 0,15
ŠK7-1b	(1,58-) <b>3,51 – 3,69</b> (-6,75) $\times$ (0,75-) <b>1,27 – 1,33</b> (-1,75)	<b>3,6</b> $\pm$ 0,55 $\times$ <b>1,30</b> $\pm$ 0,19
ŠK9-4	(2,57-) <b>3,62 – 3,80</b> (-4,92) $\times$ (0,96-) <b>1,35 – 1,43</b> (-1,9)	<b>3,71</b> $\pm$ 0,43 $\times$ <b>1,39</b> $\pm$ 0,19
ŠK12-1	(2,79-) <b>4,24 – 4,46</b> (-5,96) $\times$ (0,75-) <b>1,25 – 1,35</b> (-1,88)	<b>4,35</b> $\pm$ 0,65 $\times$ <b>1,31</b> $\pm$ 0,20
ŠK14-4	(3,29-) <b>4,03 – 4,22</b> (-5,71) $\times$ (1,13-) <b>1,55 – 1,67</b> (-2,97)	<b>4,13</b> $\pm$ 0,47 $\times$ <b>1,61</b> $\pm$ 0,30
Dimenzije konidija ( $\mu\text{m}$ ) Grupe 3		
Izolat	Veličina konidija ( $D \times \check{S}$ ) <sup>†</sup>	Srednja vrijednost $\pm$ S.D. <sup>§</sup>
ŠK5-1	(19,63-) <b>18,96 – 23,30</b> (-23,90) $\times$ (5,77-) <b>5,73 – 5,98</b> (-5,98)	<b>21,13</b> $\pm$ 1,92 $\times$ <b>5,85</b> $\pm$ 0,11
Dimenzije konidija ( $\mu\text{m}$ ) Grupe 9		
Izolat	Veličina konidija ( $D \times \check{S}$ ) <sup>†</sup>	Srednja vrijednost $\pm$ S.D. <sup>§</sup>
ŠK11-2a	(2,87-) <b>3,72 – 3,86</b> (-5,02) $\times$ (0,71-) <b>1,03 – 1,08</b> (-1,50)	<b>3,79</b> $\pm$ 0,41 $\times$ <b>1,06</b> $\pm$ 0,15

† - 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; § - srednja vrijednost dimenzija ( $D \times \check{S}$ ) i standardno odstupanje (S.D.).

Tablica 5.1.3.2. Dimenzije konidija za vrstu *Cytospora punicae* i vrstu *Pestalotiopsis biciliata* u istraživanjima drugih istraživača

Konidije vrste <i>Cytospora punicae</i> (D × Š) (μm)	Referenca
(3.5–)3.8–4.6(–5.0) × (0.5–)0.8–1.0(–1.0)	Lawrence i sur., 2018.
4.5–5.4 × 0.9–1.9	Samouel i Kanetis, 2016.
(4) 4.5–5 (6) × (1) 1.5 (2)	Hand i sur., 2014.
(4–)4.5–5.4(–6) × (1.5–)2(–2.5)	Mahdikhani i Davoodi., 2017.
4–5 × 1.75	Triki i sur., 2015.
4–6 × 1–2	Mincuzzi i sur., 2017.
4–6 × 4.5–5.5	Palavouzis i sur., 2015.
Konidije vrste <i>Pestalotiopsis biciliata</i> (D × Š) (μm)	Referenca
(21–)22–28.5(–30) × (5.5–) 6–7.5(–8)	Maharachchikumbura i sur., 2014.

D × Š – duljina × širina konidije

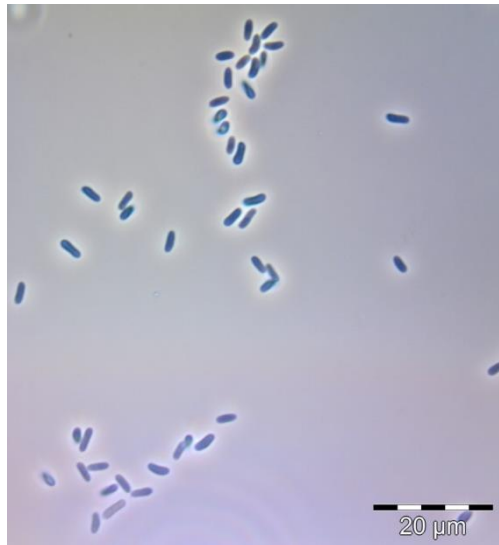
Naziv *Pestalotiopsis biciliata* vrsta je dobila prema 2 biča koja se nalaze se na bazi konidije. Konidije su fuziformne, eliptične, ravne do blago zakrivljene, višestruko septirane (četiri septe). Na apikalnom dijelu spore nalaze se 2 do 3 biča, najčešće 3 (Maharachchikumbura i sur., 2014.).



Slika 5.1.3.1. Konidije vrste *Pestalotiopsis biciliata*

Izvor: Lucija Šušić, 18.06.2021.

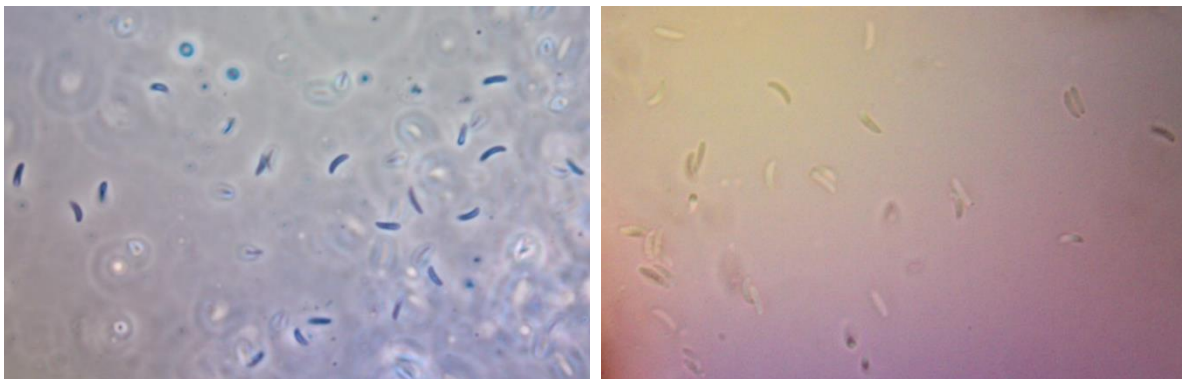
Konidije vrste *C. punicae* su hijaline do svijetlo smeđe boje pod prirodnim svjetlom. Aseptirane su i alantoidne. Na slici 5.1.3.2., prikazane su pod faznim kontrastom.



Slika 5.1.3.2. Konidije vrste *Cytospora punicae*. Mjerna skala= 20 $\mu$ m

Izvor: Lucija Šušić, 17.06.2021.

Konidije vrste *C. acaciae* su hijaline, alantoidne, do 5  $\mu$ m dugačke i do 1,5  $\mu$ m široke. Zakrivljenije su od konidija vrste *C. punicae*, ali su sličnih dimenzija (Tablica 5.1.3.1., str. 27).



Slika 5.1.3.3. Konidije vrste *Cytospora acaciae* promatrane pod faznim kontrastom (lijevo) i bez kontrasta (desno)

Izvor: Lucija Šušić, 16.06.2021.

#### 5.1.4. Rezultati testa patogenosti

Kako bi se utvrdio patogeni potencijal izolata iz Grupa 1/2, 3, 5 i 9 i zadovoljili Kochovi postulati, proveden je test patogenosti kako je ranije opisano. U navedenome testu patogenosti korišteno je dvanaest reprezentativnih izolata i sterilni komadić PDA kao negativna kontrola. Šest mjeseci nakon umjetne inokulacije jednogodišnjih sadnica šipka sorte Barski slatki nisu utvrđeni nikakvi vanjski simptomi koji bi upućivali na bolesti 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 svjetlije do tamnije smeđu boju. Pojedini izolati izazvali su izrazite nekrotične promjene vidljive na kori gdje je nekroza rezultirala rak-ranom.

Na temelju provedenih rezultata testa patogenosti vidljivo je da izolati provizorno identificirani kao vrsta *C. punicae* pokazuju široki raspon virulentnosti na sadnicama šipka (Slika 5.1.4.1. B-E).



Slika 5.1.4.1. A) Uzdužni presjek kontrolne D) Poprečni presjek stabla sadnice šipka inokulirane izolatom *C. punicae* B) C) i E) Rak-rane na grančicama inokuliranim s *C. punicae*

Izvor: Lucija Šušić



Virulentnost se očitovala kroz dva odvojena parametra - duljina nekrotične promjene u mm (bez obzira na njenu širinu) koja označava brzinu kolonizacije biljnog tkiva, dok je drugi parametar virulentnosti bio razvitak rak-rana u koloniziranom tkivu (Tablica 5.1.4.1.).

Tablica 5.1.4.1. Rezultati testa patogenosti s prosječnim vrijednostima duljine nekrotičnih promjena (prosječna duljina nekroze  $\pm$  S.D., u milimetrima) za izolate iz ovog istraživanja na sadnicama sorte šipka Barski slatki sa sterilnim PDA kao negativnom kontrolom. Prosječne vrijednosti praćene istim slovom nisu značajno različite pri vrijednosti  $P < 0,05$ .

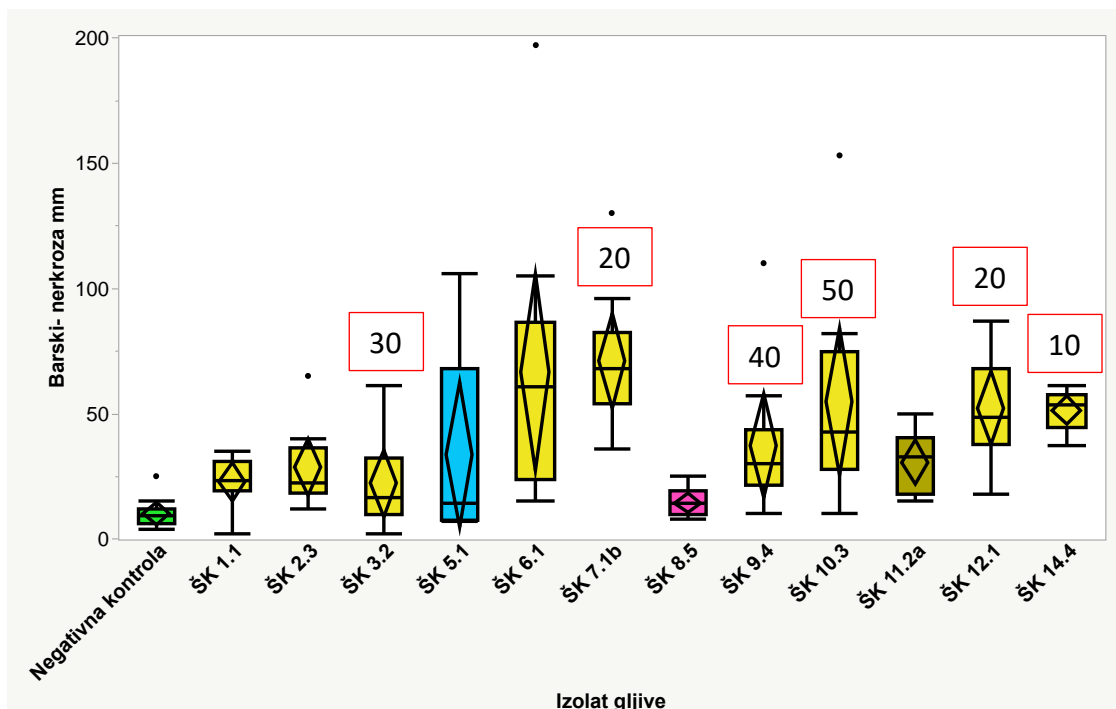
Izolat gljive	Prosječan duljina nekroze (mm $\pm$ S.D.)	% pojave rak-rana
ŠK7-1b	71 $\pm$ 26 a	20
ŠK14-4	51 $\pm$ 8 ab	10
ŠK6-1	67 $\pm$ 55 ab	0
ŠK12-1	52 $\pm$ 21 ab	20
ŠK10-3	55 $\pm$ 41 ab	50
ŠK9-4	37 $\pm$ 29 abc	40
ŠK11-2a	31 $\pm$ 12 abc	0
ŠK2-3	29 $\pm$ 16 abc	0
ŠK5-1	34 $\pm$ 37 bcd	0
ŠK1-1	23 $\pm$ 10 bcd	0
ŠK3-2	22 $\pm$ 19 cd	30
ŠK8-5	14 $\pm$ 5 cd	0
Negativna kontrola	10 $\pm$ 6 d	0

Zaključeno je da su visoku virulentnost pokazali izolati ŠK7-1b, ŠK10-3, ŠK12-1, ŠK14-4 koji su uspješno kolonizirali drvo šipka i ujedno pokazali sposobnost izazivanja rak-rana. Izolat ŠK6-1 po pitanju kolonizacije tkiva pokazao je sličnu virulentnost kao i prethodna grupa izolata, ali nije izazvao pojavu rak-rana. Izolati ŠK9-4, ŠK2-3, ŠK1-1 i ŠK3-2 pokazali su se srednje do slabo virulentni po pitanju kolonizacije pri čemu su izolat ŠK9-4 u 40 %, odnosno izolat ŠK3-2 u 30 % slučajeva izazvali i rak-rane (Tablica i Graf 5.1.4.1.). Navedeni rezultati testa patogenosti u skladu su s rezultatima drugih istraživanja gdje je *C. punicae* također

pokazala značajan stupanj patogenosti na šipku (Lawrence i sur., 2018.; Hand i sur., 2014.; Samouel i Kanetis, 2016.; Mahdikhani i Davoodi, 2017.).

Za izolat Grupe 9, provizorno identificiran kao vrsta *Cytospora acaciae*, te izolat Grupe 3, provizorno identificiran kao vrsta *Pestalotiopsis biciliata*, na temelju provedenih rezultata testa patogenosti utvrđena je slaba do srednja virulentnost na šipku, a nije bilo pojave rak-rana.

Izolat Grupe 5 nije pokazao značajan stupanj patogenosti na šipku.



Graf 5.1.4.1. „Box-plot“ vrijednosti nekroza izazvanih izolatima gljiva, pri čemu romb označava granice 95 % intervala povjerenja, a % pojave rak-rana (kada je bio veći od 0 %) prikazan je u crvenim okvirima

## 5.2. Rezultati genotipske karakterizacije izolata Grupa 1/2, 3, 5 i 9

Kako bi se potvrdile pretpostavke o taksonomskoj pripadnosti izolata Grupe 1/2, 3, 5 i 9, provedena je molekularna identifikacija izolata te njihova filogenetska analiza.

### 5.2.1. Molekularna identifikacija izolata

Pomoću molekularnih markera ITS i EF1- $\alpha$  korištenjem metode PCR za izolate Grupa 1/2, 3 i 9 provedena je molekularna identifikacija. Za izolat Grupe 5 korišten je samo molekularni marker ITS. Primjenom molekularnih markera i metode PCR dobiveni su sljedeći produkti: a) Grupa 1/2 – ITS (560 nukleotida), EF1- $\alpha$  (306 nukleotida); b) Grupa 3 - ITS (581 nukleotida); EF1- $\alpha$  (291 nukleotida); c) Grupa 5 – ITS (555 nukleotida); d) Grupa 9 - ITS (581 nukleotida); EF1- $\alpha$  (279 nukleotida). Na temelju provedene usporedbe dobivenih sekvenci, pomoću programa BLAST, s bazom podataka GenBank, utvrđena je vjerojatna taksonomska pripadnost izolata rodu ili vrsti što je bio temelj za filogenetsku analizu.

### 5.2.2. Filogenetska analiza

Za izolate Grupa 1/2 i 9, 3 i 5 kreirana su filogenetska stabla metodom Maximum Likelihood.

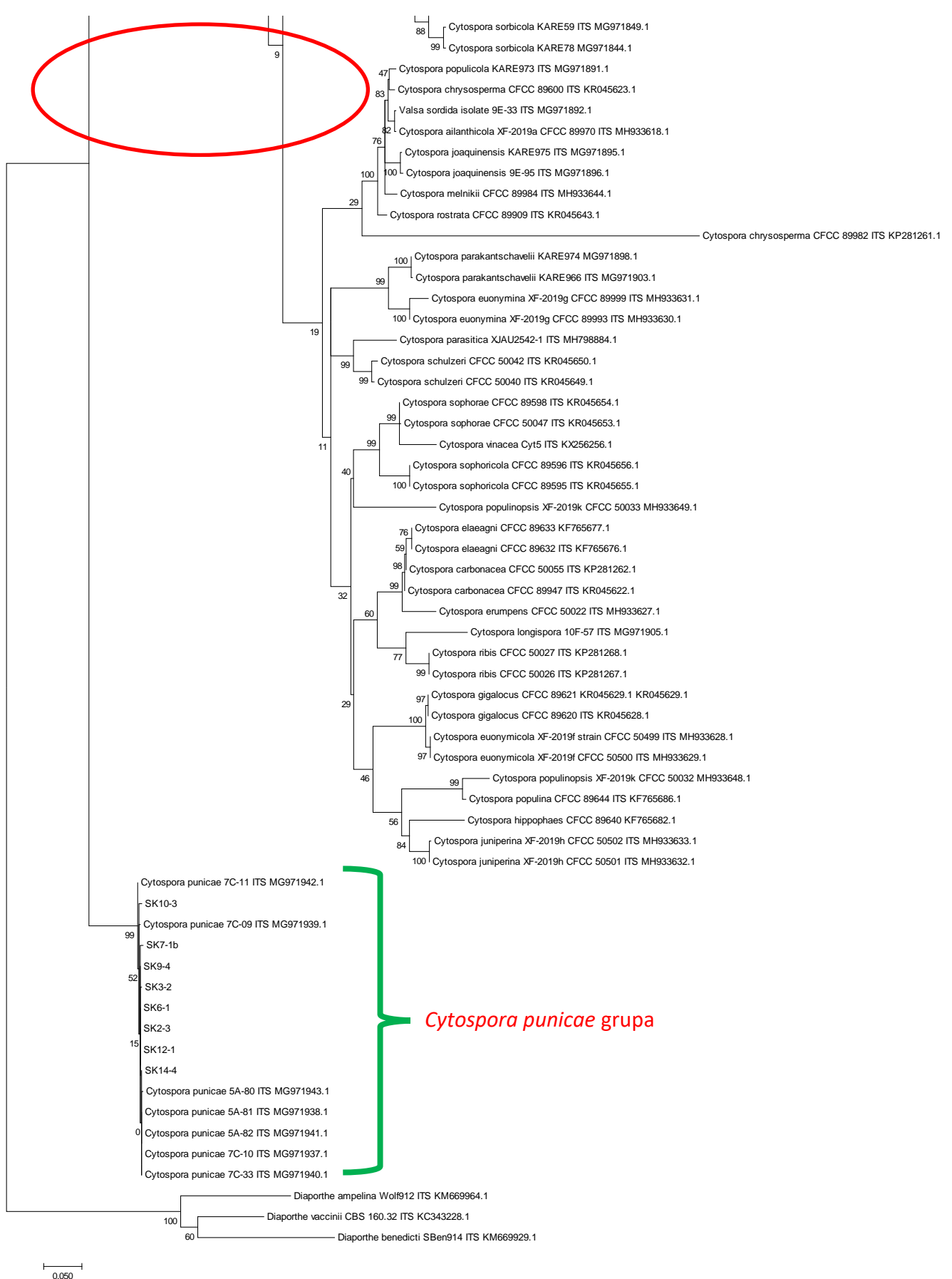
Izolati Grupe 1/2 grupiraju se na dobro podržanom ogranku (99 %) unutar grupe referentnih izolata vrste *Cytospora punicae* (Slika 5.2.2.1., str. 35) te su na temelju toga identificirani kao vrsta *C. punicae*.

Izolat ŠK11-2a Grupe 9 grupirao se s referentnim izolatom *Cytospora acaciae*, ali u okviru prikazanog *C. acaciae* / *C. magnoliae* kompleksa pa te dvije vrste nisu jasno razgraničene (Slika 5.2.2.1., str. 34).

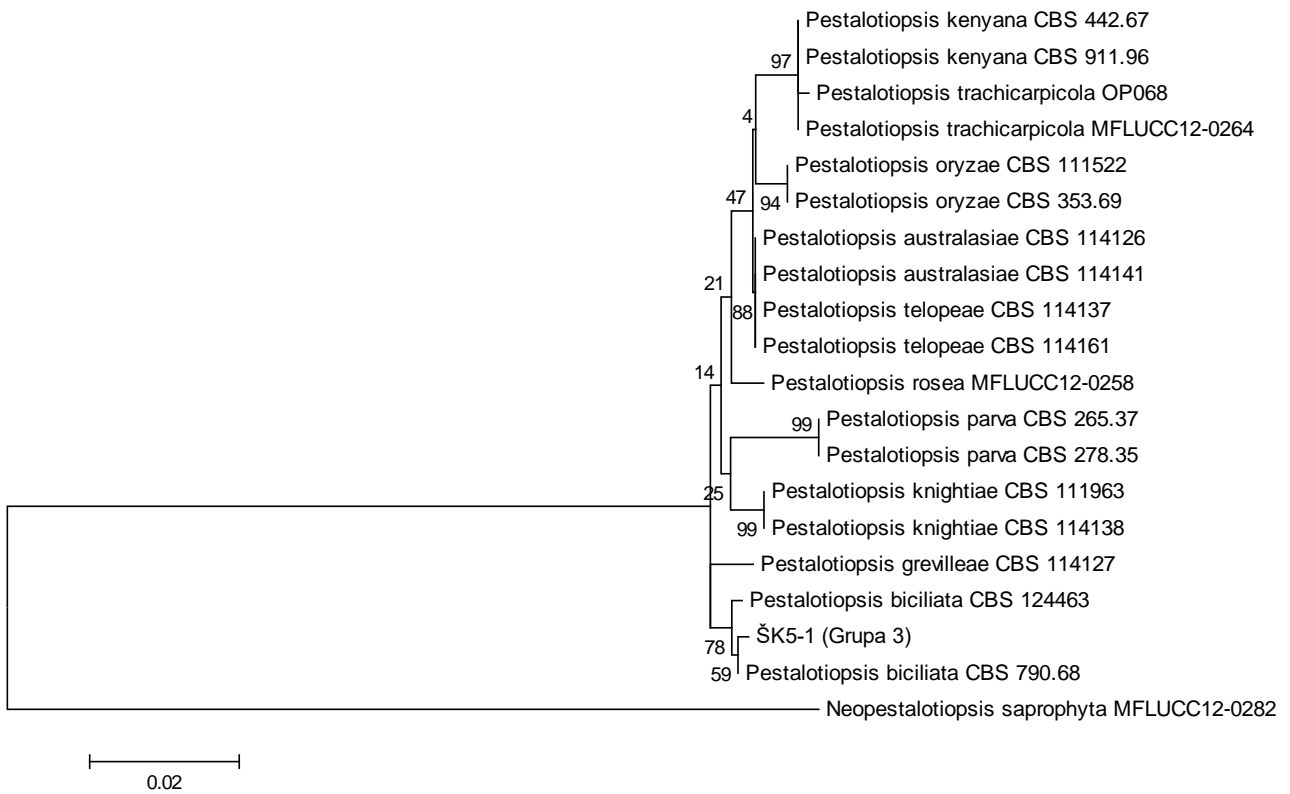
Izolat ŠK5-1 Grupe 3 se grupirao, na dobro podržanom ogranku (78 %), s referentnim izolatom vrste *Pestalotiopsis biciliata* (Slika 5.2.2.2., str. 36), stoga je identificiran kao *P. biciliata*.

Izolat ŠK8-5 Grupe 5 se grupirao, na dobro podržanom ogranku (100 %), s referentnim izolatima vrste *Rosellinia corticium* (Slika 5.2.2.3., str. 37) na temelju čega je zaključeno da se radi o vrsti *R. corticium*.

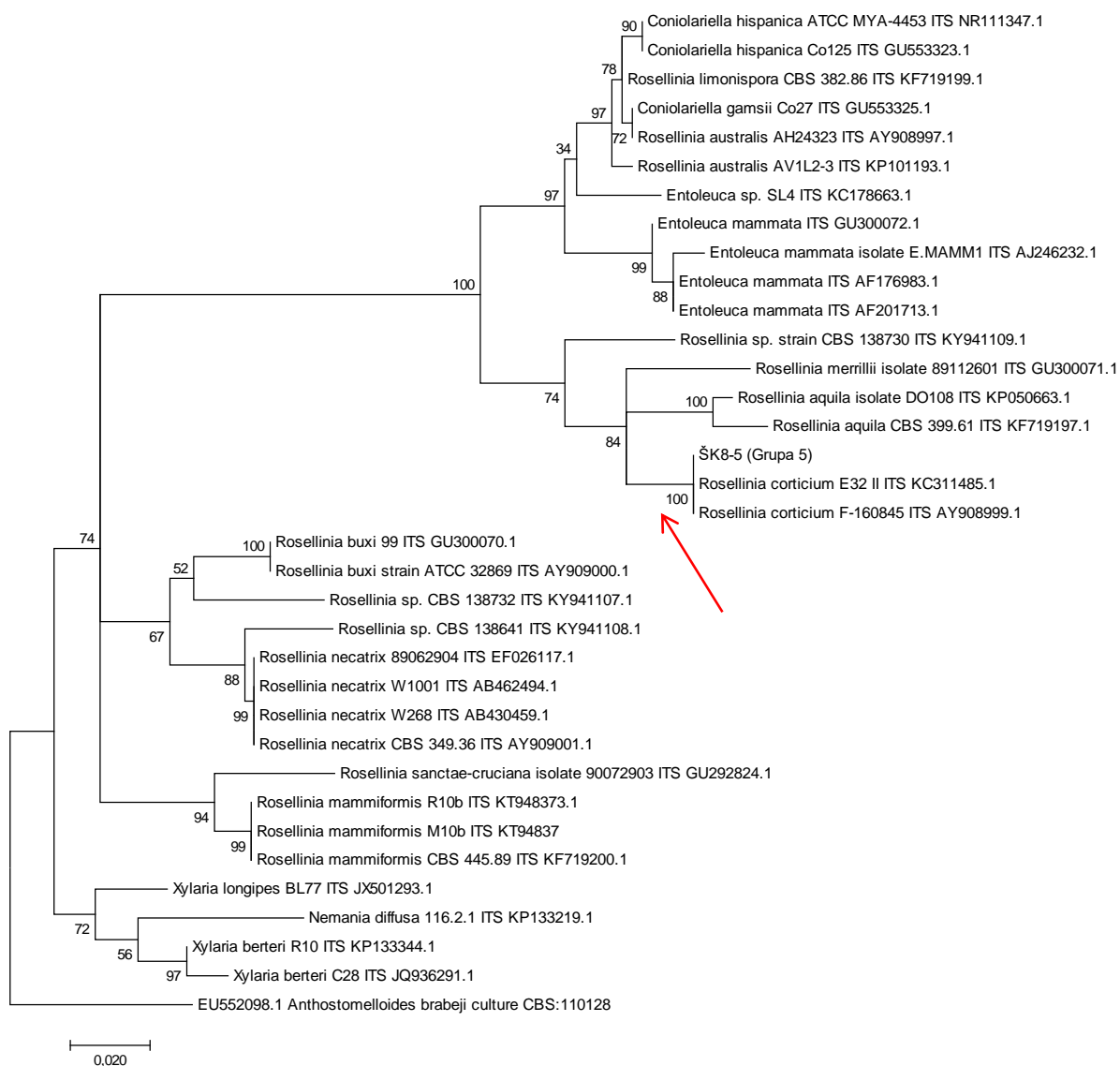




Slika 5.2.2.1. Prikaz filogenetskog stabla dobivenog metodom Maximum likelihood (logL(-14220.3945)) baziranog na analizi poravnatih kombiniranih sekvenci ITS+EF1- $\alpha$  reprezentativnih izolata Grupe 1/2 i Grupe 9 te referentnih izolata iz baze podataka GenBank za različite vrste iz roda *Cytospora*. Vrste *Diaporthe ampelina*, *D. vaccinii* i *D. benedicti* uzete su kao vanjska grupa. Brojevi iznad pojedinih ogranaka predstavljaju postotak od 1000 bootstrap ponavljanja, a pouzdanima se smatraju samo oni veći od 69 %. Mjerilo prikazuje broj nukleotidnih supstitucija po mjestu. Crvena elipsa označava prijelom filogenetskog stabla.



Slika 5.2.2.2. Prikaz filogenetskog stabla dobivenog metodom Maximum likelihood (logL(-1579.2768)) baziranog na analizi poravnatih kombiniranih sekvenci ITS+EF1- $\alpha$  reprezentativnog izolata Grupe 3 i referentnih izolata iz baze podataka GenBank za različite vrste iz roda *Pestalotiopsis*. Vrsta *Neopestalotiopsis saprophyta* uzeta je kao vanjska grupa. Brojevi iznad pojedinih ogranaka predstavljaju postotak od 1000 bootstrap ponavljanja, a pouzdanima se smatraju samo oni veći od 69 %. Mjerilo prikazuje broj nukleotidnih supstitucija po mjestu.



Slika 5.2.2.3. Prikaz filogenetskog stabla dobivenog metodom Maximum likelihood ( $\log L(-1794.3551)$ ) baziranog na analizi poravnatih sekvenci ITS reprezentativnog izolata Grupe 5 i referentnih izolata iz baze podataka GenBank za različite vrste iz roda *Rosellinia*. Vrsta *Anthostomelloides brabeji* uzeta je kao vanjska grupa. Brojevi iznad pojedinih ogranaka predstavljaju postotak od 1000 bootstrap ponavljanja, a pouzdanima se smatraju samo oni veći od 69 %. Mjerilo prikazuje broj nukleotidnih supstitucija po mjestu.

## 6. Zaključak

Na temelju provedene fenotipske i genotipske karakterizacije analiziranih izolata, u skladu s postavljenom hipotezom, doneseni su sljedeći zaključci:

1. Grupi 1/2 dodatnim je molekularnim markerom EF1- $\alpha$  potvrđena taksonomska pripadnost vrsti *Cytospora punicae*.
2. Izolatima Grupa 3, 5 i 9 utvrđena je sljedeća taksonomska pripadnost:
  - a) Izolat ŠK5-1 Grupe 3 determiniran je kao *Pestalotiopsis biciliata*.
  - b) Izolat ŠK8-5 Grupe 5 determiniran je kao *Rosellinia corticium*.
  - c) Izolat ŠK11-2a Grupe 9 determiniran je kao *Cytospora acaciae* što je potrebno potvrditi budućim istraživanjima jer se u filogenetskoj analizi izolat ŠK11-2a grupirao s vrstom *C. acaciae*, ali i *C. magnoliae*. Zbog slabe istraženosti dotičnih vrsta i njihovog nejasnog razgraničenja, u budućim istraživanjima bit će potrebno koristiti dodatne molekularne markere za identifikaciju.
3. Testom patogenosti je utvrđeno:
  - a) Izolat vrste *Pestalotiopsis biciliata* (ŠK5-1) prosječno pokazuje slab stupanj patogenosti na šipku, uz odstupanja kod nekih ponavljanja tretmana kod kojih je izolat pokazao srednje jaki do čak jaki patogeni potencijal u vidu brze kolonizacije drva šipka, no bez pojave rak-rana.
  - b) Izolat vrste *Rosellinia corticium* (ŠK8-5) ne pokazuje značajnu patogenost na šipku u odnosu na kontrolu.
  - c) Izolat vrste *Cytospora acaciae* (ŠK11-2a) pokazao je slabi do srednje jaki patogeni potencijal po pitanju kolonizacije drva šipka i nije izazivao rak-rane.
  - d) Samo izolati Grupe 1/2 koji pripadaju vrsti *Cytospora punicae* pokazuju visoku patogenost te imaju mogućnost izazvati rak-rane, stoga je zaključeno da je *C. punicae* vjerojatno primarni uzročnik sušenja šipka u Hrvatskoj.
4. U ovom radu izneseni su prvi nalazi vrsta *Cytospora acaciae*, *Pestalotiopsis biciliata* i *Rosellinia corticium* na šipku u svijetu.



## 7. Popis literature

1. Adams, G. C., Roux, J., i Wingfield, M. J. (2006). Cytosporaspecies (*Ascomycota, Diaporthales, Valsaceae*): introduced and native pathogens of trees in South Africa. *Australasian Plant Pathology*, 35(5), 521. doi:10.1071/ap06058
2. Adaskaveg, J.E., Michailides, T.J. (2018). Agriculture: Pomegranate Pest Management Guidelines. *Aspergillus Fruit Rot. Aspergillus niger*. Izvor: <https://www2.ipm.ucanr.edu/agriculture/pomegranate/Aspergillus-Fruit-Rot/> Agriculture and Colorado counties cooperating.
3. Chandra, R., Dhinesh Babu, K., Tejrao Jadhav, V., Jaime A. Teixeira da Silva (2010). Origin, History and Domestication of Pomegranate
4. Cintora-Martínez, E.A., Leyva-Mir, S.G., Ayala-Escobar, V. *et al.* (2017). Pomegranate fruit rot caused by *Pilidiella granati* in Mexico. *Australasian Plant Dis. Notes* 12, 4. <https://doi.org/10.1007/s13314-017-0230-0>
5. Ezra, D., Kirshner, B., Hershovich, M., Shtienberg, D., i Kosto, I. (2015). Heart Rot of Pomegranate: Disease Etiology and the Events Leading to Development of Symptoms. *Plant Disease*, 99(4), 496–501. doi:10.1094/pdis-07-14-0707-re
6. Golmohammadi H, Arzanlou M, Rabbani Nasab H. (2019). *Neofusicoccum parvum* associated with pomegranate branch canker in Iran. *For Path.* 2020;00:e12582.
7. Gubler, W.D., Adaskaveg, J.E., Pickel C., Olson, W.H., Niederholzer, F.J.A. (2017). Prune. Cytospora Canker. Pathogen: *Cytospora leucostoma*. Agriculture and Natural Resources, University of California.
8. Guyon, J.C., Jacobi, W. R. i McIntyre, G. A. (1996). Effects of Environmental Stress on the Development of Cytospora Canker of Aspen. Department of Bioagricultural Sciences and Pest Management, Colorado State University. Copyright 1996 The American Phytopathological Society. DOI: 10.1094/PD-80-1320.
9. Hand, F.P., 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):853-854.
10. Ivandić, M. (2020). Molekularna identifikacija gljiva izoliranih iz šipka (*Punica granatum* L.) sa simptomima citosporioznog sušenja. Diplomski rad.
11. Jacobi, W.R. (1994). Cytospora Canker. Colorado State University, U.S. Department of

12. Jadhav, V.T., i Sharma, K.K. (2011). Integrated management of diseases in pomegranate. *Acta Horticulturae*, (890), 467–473. doi:10.17660/actahortic.2011.890
13. Juretić, N., Horvat, J. (1984). Isolation of cucumber mosaic virus from pomegranate *Punica granatum* in Yugoslavia. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 19(3-4): 309-314.
14. Kahramanoglu, I., Usanmaz, S. (2016). *Pomegranate Production and Marketing*. CRC Press.
15. Kaliterna, J. (2013). Identifikacija, patogenost i rasprostranjenost vrsta gljiva iz porodica Botryosphaeriaceae i Diaporthaceae na vinovoj lozi u Hrvatskoj. Doktorski rad.
16. Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter, D.W., Stalpers, J.A. (2008). *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*. 10th edn. Wallingford, UK: CAB International.
17. Kumar, A., Singht Chahal, T. (2016). Studies of *Aspergillus* black spot disease of pomegranate caused by *Aspergillus niger* in Punjab. Punjab Agricultural University, Fruit Research Station, Jallowal- Lesriwal, Jalandhar - 144 303, Punjab.
18. Lawrence, D. P., Holland, L. A., Nouri, M. T., Travadon, R., Abramians, A., Michailides, T. J., i 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*.
19. Li, Xingqi, Xinyue Lu, Yiheng He, Mengting Deng i Yanrong Lv. (2020). Identification the Pathogens Causing Rot Disease in Pomegranate (*Punica granatum* L.) in China and the Antifungal Activity of Aqueous Garlic Extract. *Forests* 11, no. 1: 34. <https://doi.org/10.3390/f11010034>
20. Maharachchikumbura, S. S. N., Hyde, K. D., Groenewald, J. Z., Xu, J., i Crous, P. W. (2014). *Pestalotiopsis* revisited. *Studies in Mycology*, 79, 121–186. doi:10.1016/j.simyco.2014.09.005
21. Mahdikhani, M., Davoodi, A., (2017). First report of wood canker of pomegranate caused by *Cytospora punicae* in western Iran. *New Disease Reports*. 1. DOI:10.5197/j.2044-0588.2017.035.001
22. Marin, S. (2016). Molekularna identifikacija gljiva iz porodica Diaporthaceae i Botriosphaeriaceae izoliranih iz drva smokve u Hrvatskoj. Diplomski rad.

23. Miličević, T., Kaliterna, J., Vončina, D. (2017). Bolesti mediteranskih voćnih vrsta bajam, rogač, smokva, šipak, žižula. Zaklada Adris, Zagreb.
24. 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.
25. Mirabolfathy, M., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2012). *First Report of Pilidiella granati Causing Dieback and Fruit Rot of Pomegranate (Punica granatum) in Iran. Plant Disease, 96(3), 461–461.* doi:10.1094/pdis-10-11-0887.
26. Munhuweyi, K., Lennox, C. L., Meitz-Hopkins, J. C., Caleb, O. J., i Opara, U. L. (2016). Major diseases of pomegranate (*Punica granatum* L.), their causes and management—A review. *Scientia Horticulturae*, 211, 126–139.
27. Palavouzis, S.C., Tzamos, S., Paplomatas, E., Thomidis, T., (2015). First report of *Cytospora punicae* isolated from pomegranate plants with symptom of collar rot in northern Greece. *Journal of Plant Pathology*, 97(1):216. Izvor: <http://sipav.org/main/jpp/index.php/jpp/article/view/3287>
28. Palou, L., i Vicent, A. (2019). Fungal pathogens causing postharvest decay of pomegranate fruit in Spain. *Acta Horticulturae*, (1254), 243–252. doi:10.17660/actahortic.2019.1254
29. Pan, M., Zhu, H., Bonthond, G., Tian, C., i Fan, X. (2020). High Diversity of *Cytospora* Associated With Canker and Dieback of Rosaceae in China, With 10 New Species Described. *Frontiers in Plant Science*, 11. doi:10.3389/fpls.2020.00690
30. Petruzzello, M. (2021). Izvor: <https://www.britannica.com/plant/pomegranate>
31. Phillips , A. J., Lopes, J., Abdollahzadeh, J., Bobev, S., Alves, A. (2012). Resolving *Diplodia* complex on apple and other Rosaceae hosts. *Persoonia* 29, 29-38.
32. Piškurić, I. (2019). Identifikacija gljiva povezanih sa sušenjem šipka (*Punica granatum* L.) u Dalmaciji. Diplomski rad.
33. Šakić-Bobić, B. (2016). Uzgoj nara i troškovi proizvodnje. Izvor: <https://gospodarski.hr/rubrike/agroekonomika/ekonomika-proizvodnje-nara/> (pristupljeno: 16.08.2021.)
34. Samouel, S., Kanetis, L. (2016). First report of *Cytospora punicae* causing trunk canker of pomegranate (*Punica granatum*) in Cyprus. *Plant Disease*. 100 (1), 222. DOI:10.1094/PDIS-03-15-0356-PDN

35. Santos, J.M. i Phillips, A.J.L. (2009). Resolving the complex of *Phomopsis* species and their *Diaporthe* teleomorphs on *Foeniculum vulgare*. *Fungal Diversity* 34: 111-125.
36. Sharma, J., Manjunath, G., Xavier, K.V., Vallad, G.E. (2021). *The Pomegranate: Botany, Production and Uses*
37. Singh, M.P., Janso, J.E., Brady, S.F. (2007). Cytoskyrins and Cytosporones Produced by *Cytospora* sp. CR200: Taxonomy, Fermentation and Biological Activities. *Marine Drugs* 2007, 5, 71-84.
38. Snowdon, A.L. (2010). *A colour Atlas of Post-Harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables. Volume 1: General Introduction and Fruits.* Manson Publishing Ltd, London.
39. Thomidis, T. (2014). Fruit rots of pomegranate (cv. Wonderful) in Greece. *Australasian Plant Pathology*, 43(5), 583–588. doi:10.1007/s13313-014-0300-0
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. Venter, E., Lennox, C. L., i Meitz-Hopkins, J. C. (2017). First Report of *Cytospora punicae* Causing Post-Harvest Fruit Rot on Pomegranate in South Africa. *Plant Disease*, 101(4), 631–631. doi:10.1094/pdis-08-16-1157-pdn
42. Viuda-Martos, M., Fernandez-L'opez, J. i P'erez-Alvarez, J.A. (2010). Pomegranate and its Many Functional Components as Related to Human Health: A Review
43. Vučković, K. (2018). Šipak- superhrana s visokim potencijalnom uzgoja u Dalmaciji. Izvor: <https://www.agroklub.com/vocarstvo/sipak-superhrana-s-visokim-potencijalom-uzgoja-u-dalmaciji/44519/> (pristupljeno: 9.08.2021.)
44. White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S.B. i Taylor, J.W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. U: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications.* Academic Press. 315-322.
45. Włodarczyk, Z. (2020). *The Seven Plant Species - A Basis of Nutrition of Ancient Israel* Department of Ornamental Plants, University of Agriculture in Krakow, Poland
46. Xavier, K.V., Achala N. KC, Vallad G. E. (2019). Diseases of pomegranate (*Punica granatum*) in Florida.

## 8. Prilog

### 8.1. Tablice referentinih sekvenci preuzetih iz baze podataka GenBank

#### 8.1.1. Tablica referentinih sekvenci preuzetih iz baze podataka GenBank za filogenetsko stablo vrsta *Cytospora punicae* i *C. acaciae* / *C. magnoliae*

Vrsta gljive	Izolat	Biljka domaćin	ITS	EF1- $\alpha$
<i>Cytospora ailanthicola</i>	CFCC 89970	<i>Ailanthus altissima</i>	MH933618	MH933494
<i>Cytospora amygdali</i>	LH357/ CBS 144233	<i>Prunus dulcis</i>	MG971852*	MG971659
<i>Cytospora amygdali</i>	CMW 6735	<i>Prunus dulcis</i>	MG971853	
<i>Cytospora atrocirrhatta</i>	CFCC 89615	<i>Juglans regia</i>	KR045618	KP310858
<i>Cytospora atrocirrhatta</i>	CFCC 89616	<i>Juglans 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>Cytospora berberidis</i>	CFCC 89927	<i>Berberis dasystachya</i>	KR045620	KU710913
<i>Cytospora berberidis</i>	CFCC 89933	<i>Berberis dasystachya</i>	KR045621	KU710914
<i>Cytospora bungeanae</i>	CFCC 50495T	<i>Pinus bungeana</i>	MH933621	
<i>Cytospora bungeanae</i>	CFCC 50496	<i>Pinus bungeana</i>	MH933622	MH933498
<i>Cytospora californica</i>	9C-24 / CBS 144234	<i>Juglans regia</i>	MG971935*	MG971645
<i>Cytospora californica</i>	KARE1104	<i>Prunus dulcis</i>	MG971928	MG971638
<i>Cytospora carbonacea</i>	CFCC 50055	<i>Ulmus pumila</i>	KP281262*	
<i>Cytospora carbonacea</i>	CFCC 89947	<i>Ulmus pumila</i>	KR045622	CFCC 89947
<i>Cytospora carpobroti</i>	CMW 48981	<i>Carpobrotus edulis</i>	MH382812	MH411212
<i>Cytospora cedri</i>	CMW 196.50		AF192311	
<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>Cytospora chrysosperma</i>	9E-33 / CBS 144242		MG971892	MG971602
<i>Cytospora chrysosprema</i>	CFCC 89619	<i>Juglans regia</i>	KF225614*	
<i>Cytospora chrysosprema</i>	MFLUCC 15-0865	<i>Juglans regia</i>	KF225614	

<i>Cytospora chrysosprema</i>	CFCC 89982	<i>Ulmus pumila</i>	KP281261	KP281261
<i>Cytospora elaeagni</i>	CFCC 89632	<i>Elaeagnus angustifolia</i>	KF765676*	KU710918
<i>Cytospora elaeagni</i>	CFCC 89633	<i>Elaeagnus angustifolia</i>	KF765677	KU710919
<i>Cytospora erumpens</i>	MFLUCC 16-0580	<i>Salix xfragilis</i>	KY417733*	
<i>Cytospora erumpens</i>	CFCC 50022	<i>Prunus padus</i>	MH933627	MH933502
<i>Cytospora eucalypti</i>	KARE1585/ CBS 144241	<i>Prunus dulcis</i>	MG971907	MG971617
<i>Cytospora eucalypti</i>	KARE888	<i>Prunus dulcis</i>	MG971909	MG971619
<i>Cytospora euonymicola</i>	CFCC 50499	<i>Euonymus auschovicus</i>	MH933628	MH933503
<i>Cytospora euonymicola</i>	CFCC 50500	<i>Euonymuski auschovicus</i>	MH933629	MH933504
<i>Cytospora euonymina</i>	CFCC 89993	<i>Euonymuski auschovicus</i>	MH933630	MH933505
<i>Cytospora euonymina</i>	CFCC 89999	<i>Euonymuski auschovicus</i>	MH933631	MH933506
<i>Cytospora gigalocus</i>	HMBF 155	<i>Juglans regia</i>	KF225609*	
<i>Cytospora gigalocus</i>	CFCC 89620	<i>Juglans regia</i>	KF225609	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>Cytospora granati</i>	6F-45 / CBS 144237	<i>Punica granatum</i>	MG971799*	MG971514
<i>Cytospora hippophaes</i>	CFCC 89640	<i>Hippophaë rhamnoides</i>	KF765682	KP310865
<i>Cytospora joaquinensis</i>	9,00E-95	<i>Juglans regia</i>	MG971896	
<i>Cytospora joaquinensis</i>	KARE975/ CBS 144235	<i>Populus deltoides</i>	MG971895*	MG971605
<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 junipera</i>	CFCC 50502	<i>Juniperus przewalskii</i>	MH933633	MH933508
<i>Cytospora longispora</i>	10F-57/ CBS 144236	<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>Cytospora melnikii</i>	MFLUCC 15-0851	<i>Malus domestica</i>	KY417735*	
<i>Cytospora melnikii</i>	CFCC 89984	<i>Rhus typhina</i>	MH933644	MH933515
<i>Cytospora nivea</i>	CFCC 89641	<i>Elaeagnus angustifolia</i>	KF765683	KU710929
<i>Cytospora oleicola</i>	KARE1021/ CBS 144248	<i>Olea europaea</i>	MG971944*	
<i>Cytospora parakantschavelii</i>	MFLUCC 15-0857	<i>Populus xsibirica</i>	KY417738*	
<i>Cytospora parakantschavelii</i>	KARE966	<i>Populus fremontii</i>	MG971903	MG971613
<i>Cytospora parapistaciae</i>	KARE270/ CBS 144506	<i>Pistacia vera</i>	MG971804*	MG971519
<i>Cytospora parapistaciae</i>	KARE269	<i>Pistacia vera</i>	MG971805	MG971520
<i>Cytospora parasitica</i>	XJAU 2542-1	<i>Malus sp.</i>	MH798884	MH813452
<i>Cytospora pistaciae</i>	KARE443/ CBS 144238	<i>Pistacia vera</i>	MG971802	MG971517
<i>Cytospora pistaciae</i>	KARE444	<i>Pistacia vera</i>	MG971801	MG971516
<i>Cytospora platycladi</i>	CFCC 50504	<i>Platycladus orientalis</i>	MH933645	MH933516
<i>Cytospora platycladi</i>	CFCC 50505	<i>Platycladus orientalis</i>	MH933646	MH933517
<i>Cytospora plurivora</i>	9F-01	<i>Juglans regia</i>	MG971873	MG971584
<i>Cytospora plurivora</i>	KARE1452/ CBS 144239	<i>Olea europaea</i>	MG971861*	MG971572
<i>Cytospora populicola</i>	KARE973/ CBS 144240	<i>Populus deltoides</i>	MG971891	MG971601
<i>Cytospora populina</i>	CFCC 89644	<i>Salix psammophila</i>	KF765686	KU710930
<i>Cytospora populinopsis</i>	CFCC 50032	<i>Sorbus aucuparia</i>	MH933648	MH933520
<i>Cytospora populinopsis</i>	CFCC 50033	<i>Sorbus aucuparia</i>	MH933649	MH933521
<i>Cytospora pruinosis</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>Cytospora ribis</i>	CFCC 50026	<i>Ulmus pumila</i>	KP281267	KP310856
<i>Cytospora ribis</i>	CFCC 50027	<i>Ulmus pumila</i>	KP281268	KP310857
<i>Cytospora rosae</i>	MFLUCC 14-0845	<i>Rosa canina</i>	MF190131	
<i>Cytospora rostrata</i>	CFCC 89909	<i>Salix cupularis</i>	KR045643	KU710932

<i>Cytospora sacculus</i>	CFCC 89624	<i>Juglans regia</i>	KR045645	KP310860
<i>Cytospora sacculus</i>	CFCC 89625	<i>Juglans regia</i>	KR045646	KP310861
<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>Cytospora sibiraeae</i>	CFCC 50045	<i>Sibiraea angustata</i>	KP340987*	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>Cytospora sophorae</i>	CFCC 89598	<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 sorbi</i>	MFLUCC 16-0631	<i>Sorbus aucuparia</i>	KY417752*	
<i>Cytospora sorbicola</i>	MFLUCC 16-0584	<i>Acer pseudoplatanus</i>	KY417755*	
<i>Cytospora sorbicola</i>	KARE59	<i>Prunus dulcis</i>	MG971849	MG971562
<i>Cytospora sorbicola</i>	KARE78	<i>Prunus dulcis</i>	MG971844	MG971557
<i>Cytospora vinacea</i>	CBS 141585	<i>Vitis interspecific hybrid 'Vidal'</i>	KX256256*	
<i>Cytospora vinacea</i>	CFCC53151	<i>Quercus mongolica</i>	MT360050	
<i>Cytospora viticola</i>	CBS 141586	<i>Vitis vinifera</i>	KX256239*	
<i>Cytospora punicae</i>	7C-33	<i>Punica granatum</i>	MG971940	MG971651
<i>Cytospora punicae</i>	7C-10	<i>Punica granatum</i>	MG971937	MG971648
<i>Cytospora punicae</i>	5A-82	<i>Punica granatum</i>	MG971941	MG971652
<i>Cytospora punicae</i>	5A-81	<i>Punica granatum</i>	MG971938	MG971649
<i>Cytospora punicae</i>	5A-80/ CBS 144244	<i>Punica granatum</i>	MG971943	MG971654
<i>Cytospora punicae</i>	7C-09	<i>Punica granatum</i>	MG971939	MG971650
<i>Cytospora punicae</i>	7C-11	<i>Punica granatum</i>	MG971942	MG971653
<i>Diaporthe ampelina</i>	Wolf912		KM669964	KM669820
<i>Diaporthe benedicti</i>	SBen914	<i>Salix</i> sp.	KM669929	KM669785
<i>Diaporthe vaccinii</i>	CBS 160.32	<i>Oxycoccus macrocarpos</i>	KC343228	KC343954



8.1.2. Tablica referentinih sekvenci preuzetih iz baze podataka GenBank za filogenetsko stablo vrste *Pestalotiopsis biciliata*

Vrsta gljive	Izolat	Biljka domaćin	ITS	EF1- $\alpha$
<i>Pestalotiopsis australasiae</i>	CBS 114126	<i>Knightia</i> sp.	KM199297	KM199499
<i>Pestalotiopsis australasiae</i>	CBS 114141	<i>Protea</i> sp.	KM199298	KM199501
<i>Pestalotiopsis biciliata</i>	CBS 790.68	<i>Taxus baccata</i>	KM199305	KM199507
<i>Pestalotiopsis biciliata</i>	CBS 124463	<i>Platanus</i> × <i>hispanica</i>	KM199308	KM199505
<i>Pestalotiopsis grevilleae</i>	CBS 114127	<i>Grevillea</i> sp.	KM199332	KM199475
<i>Pestalotiopsis kenyana</i>	CBS 442.67	<i>Coffea</i> sp.	KM199302	KM199502
<i>Pestalotiopsis kenyana</i>	CBS 911.96	Agar	KM199303	KM199503
<i>Pestalotiopsis knightiae</i>	CBS 111963	<i>Knightia</i> sp.	KM199311	KM199495
<i>Pestalotiopsis knightiae</i>	CBS 114138	<i>Knightia</i> sp.	KM199310	KM199497
<i>Pestalotiopsis oryzae</i>	CBS 111522	<i>Telopea</i> sp.	KM199294	KM199493
<i>Pestalotiopsis oryzae</i>	CBS 353.69	<i>Oryza sativa</i>	KM199299	KM199496
<i>Pestalotiopsis parva</i>	CBS 265.37	<i>Delonix regia</i>	KM199312	KM199508
<i>Pestalotiopsis parva</i>	CBS 278.35	<i>Leucothoe fontanesiana</i>	KM199313	KM199509
<i>Pestalotiopsis rosea</i>	MFLUCC 12-0258	<i>Pinus</i> sp.	JX399005	JX399069
<i>Pestalotiopsis telopeae</i>	CBS 114137	<i>Protea neriifolia</i> × <i>susannae</i>	KM199301	KM199559
<i>Pestalotiopsis telopeae</i>	CBS 114161	<i>Telopea</i> sp.	KM199296	KM199500
<i>Pestalotiopsis trachicarpicola</i>	OP068	<i>Trachycarpus fortunei</i>	JQ845947	JQ845946
<i>Pestalotiopsis trachicarpicola</i>	MFLUCC 12-0264	<i>Chrysophyllum</i> sp.	JX399004	JX399068

8.1.3. Tablica referentinih sekvenci preuzetih iz baze podataka GenBank za filogenetsko stablo vrste *Rosellinia corticium*

Vrsta gljive	Izolat	Biljka domaćin	ITS
<i>Anthostomelloides brabeji</i>	CBS:110128	<i>Brabejum stellatifolium</i>	EU552098
<i>Coniolarrella gamsii</i>	Co27	<i>Hordeum vulgare</i>	GU553325
<i>Coniolarrella hispanica</i>	ATCC MYA-4453		NR111347
<i>Coniolarrella hispanica</i>	Co125	<i>Eryngium campestre</i>	GU553323
<i>Entoleuca mammata</i>	100	<i>Fagus sp.</i>	GU300072
<i>Entoleuca mammata</i>	E.MAMM1		AJ246232
<i>Entoleuca mammata</i>		<i>Populus tremula</i>	AF176983
<i>Entoleuca mammata</i>	ATCC 58108		AF201713
<i>Entoleuca sp.</i>	SL4		KC178663
<i>Nemania diffusa</i>	116.2.1	<i>Solanum leptopodum</i>	KP133219
<i>Rosellinia aquila</i>	DO108	<i>Dendrobium officinale</i>	KP050663
<i>Rosellinia aquila</i>	CBS 399.61		KF719197
<i>Rosellinia australis</i>	AH24323		AY908997
<i>Rosellinia australis</i>	AV1L2-3		KP101193
<i>Rosellinia buxi</i>	99	<i>Buxus sempervirens</i>	GU300070
<i>Rosellinia buxi</i>	ATCC 32869		AY909000
<i>Rosellinia corticium</i>	E32_II	<i>Castanea sativa</i>	KC311485
<i>Rosellinia corticium</i>	F-160		AY908999
<i>Rosellinia limonispora</i>	CBS 382.86		KF719199
<i>Rosellinia mammiformis</i>	R10b	<i>Fraxinus excelsior</i>	KT948373
<i>Rosellinia mammiformis</i>	M10b		KT94837
<i>Rosellinia mammiformis</i>	CBS 445.89	<i>Fraxinus excelsior</i>	KF719200
<i>Rosellinia merrillii</i>	89112601		GU300071
<i>Rosellinia necatrix</i>	89062904	<i>Hevea brasiliensis</i>	EF026117
<i>Rosellinia necatrix</i>	W1001		AB462494
<i>Rosellinia necatrix</i>	W268		AB430459
<i>Rosellinia necatrix</i>	CBS 349.36		AY909001

<i>Rosellinia sanctae-cruciana</i>	90072903	<i>Arenga engleri</i>	GU292824
<i>Rosellinia</i> sp	CBS 138730		KY941109
<i>Rosellinia</i> sp.	CBS 138732		KY941107
<i>Rosellinia</i> sp.	CBS 138641		KY941108
<i>Xylaria berteri</i>	R10		KP133344
<i>Xylaria berteri</i>	C28	<i>Glycine max</i>	JQ936291
<i>Xylaria longipes</i>	BL77		JX501293

## Životopis

Lucija Šušić rođena je u Zadru 21.06.1997. godine. Osnovnu i srednju školu završava u Zadru. 2016. godine završava opći smjer Gimnazije Jurja Barakovića. Iste godine upisuje preddiplomski studij Zaštite bilja na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Studij završava 2019. godine obranom završnog rada pod naslovom „Bolesti smokve i bajama“ i stječe titulu prvostupnice agronomije. Diplomski studij Fitomedicine upisuje na Agronomskom fakultetu na Sveučilištu u Zagrebu 2019. godine. Od stranih jezika aktivno se služi engleskim jezikom (C1 razina), a koristi se i njemačkim jezikom (A2 razina).