

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Sanja Marin

**MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA
GLJIVA IZ PORODICA
DIAPORTHACEAE I
BOTRYOSPHERACEAE IZOLIRANIH
IZ DRVA SMOKVE U HRVATSKOJ**

DIPLOMSKI RAD

ZAGREB, 2016.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET
Fitomedicina

SANJA MARIN

**MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA
GLJIVA IZ PORODICA
DIAPORTHACEAE I
BOTRYOSPHAERIACEAE IZOLIRANIH
IZ DRVA SMOKVE U HRVATSKOJ**

DIPLOMSKI RAD

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

Zagreb, 2016.

Ovaj diplomski rad je ocijenjen i obranjen dana _____

s ocjenom _____ pred Povjerenstvom u sastavu:

1. izv. prof. dr. sc. Tihomir Miličević _____

2. izv. prof. dr. sc. Aleksandar Mešić _____

3. izv. prof. dr. sc. Boris Duralija _____

SAŽETAK

MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA GLJIVA IZ PORODICA DIAPORTHACEAE I BOTRYOSPHAERIACEAE IZOLIRANIH IZ DRVA SMOKVE U HRVATSKOJ

Mikoze drva smokve (*Ficus carica* L.) su biljne bolesti koje uzrokuju fitopatogene gljive. Do danas u Hrvatskoj bolesti drva smokve nisu istraživane, dok su u svijetu ta istraživanja ukupno gledano relativno rijetka. Od gljiva patogena drva smokve najvažnijima se smatraju one iz porodice Diaporthaceae, no u posljednje vrijeme u svijetu gljive iz porodice Botryosphaeriaceae dobivaju na važnosti kao novi patogeni smokve. S ciljem utvrđivanja prisutnosti i taksonomske pripadnosti gljiva iz porodica Diaporthaceae i Botryosphaeriaceae na smokvi u Hrvatskoj, s više lokaliteta na području Dalmacije tijekom 2014. i 2015. godine prikupljeni su uzorci bolesnog drva smokve. Iz uzoraka su izolirani izolati gljiva u čistoj kulturi, a oni koje su prema fenotipskim obilježjima pripadali u porodicu Diaporthaceae ili Botryosphaeriaceae izdvojeni su od ostalih izolata te podvrgnuti molekularnoj analizi. U navedenoj analizi svim navedenim izolatima izolirana je ukupna genomska DNA, a potom je metodom lančane reakcije polimerazom (PCR), za izolate iz obiju porodica, umnožen molekularni marker ITS korištenjem para početnica ITS5/ITS4, odnosno za izolate iz porodice Botryosphaeriaceae dodatno još i molekularni marker EF1- α korištenjem para početnica EF1-728F/EF1-986R. Dobiveni PCR produkti umnažanja molekularnih markera pročišćeni su uporabom kita za pročišćavanje PCR produkata, te je sekvenciranjem utvrđen nukleotidni slijed njihovih sekvenci. Sve sekvence uspoređene su s odgovarajućim sekvencama referentnih izolata u međunarodnoj banci gena GenBank korištenjem metode BLAST te dodatno i filogenetskom analizom. Navedenim metodama identificirane su sljedeće vrste iz porodice Botryosphaeriaceae: *Neofusicoccum parvum*, *Dothiorella omnivora*, *Dothiorella sempervirentis*, *Spencermartinsia viticola* te *Spencermartinsia plurivora*. Jedinom izoliranom izolatu gljive iz porodice Diaporthaceae nije uspješno sekvenciran molekularni marker ITS te je stoga, prema morfološkim karakteristikama kolonije na KDA, identificiran do razine roda kao *Diaporthe* sp. Donesen je zaključak da, suprotno očekivanom, gljive iz porodice Botryosphaeriaceae na smokvi u Hrvatskoj imaju znatno veću zastupljenost od vrsta iz porodice Diaporthaceae. Također, od pet vrsta gljiva iz porodice Botryosphaeriaceae prvi put u svijetu nađenih na smokvi, čak dvije, *N. parvum* i *S. viticola* bi mogli biti potencijalno važni patogeni na smokvi.

Ključne riječi: *Ficus carica*, molekularna identifikacija, mikoze drva, Botryosphaeriaceae, Diaporthaceae

ABSTRACT

MOLECULAR IDENTIFICATION OF FUNGI FROM FAMILIES DIAPORTHACEAE AND BOTRYOSPHAERIACEAE ISOLATED FROM WOOD OF FIGS IN CROATIA

Mycoses of wood of fig (*Ficus carica* L.) are plant diseases caused by phytopathogenic fungi. To date in Croatia diseases of wood of figs have not been investigated, while worldwide, researches on this topic are overall relatively rare. Among fungi which are wood pathogens of figs, the most important ones are considered those from the family Diaporthaceae, but lately fungi from the family Botryosphaeriaceae are gaining importance as new pathogens of figs. In order to determine their presence and identify fungi from families Diaporthaceae and Botryosphaeriaceae on fig trees in Croatia, during the 2014 and 2015 samples of diseased wood of figs were collected from several locations in Dalmatia. From the samples, isolates of fungi were obtained in pure cultures, and those who have to phenotypic characteristics typical to the families Diaporthaceae or Botryosphaeriaceae were separated from other isolates and subjected to molecular analysis. The analysis included isolation of genomic DNA followed by polymerase chain reaction (PCR) amplification of molecular markers ITS (for isolates from both families) using primer pair ITS5 / ITS4, and EF1- α (for isolates from family Botryosphaeriaceae) using primer pair EF1-728F / EF1-986R. The PCR amplification products were purified using a kit for the purification of PCR products, and their nucleotide sequences were determined by DNA sequencing. All the sequences were compared with corresponding reference sequences in the international gene database GenBank using BLAST and by phylogenetic analysis. The following species were identified, belonging to the family Botryosphaeriaceae: *Neofusicoccum parvum*, *Dothiorella omnivora*, *Dothiorella sempervirentis*, *Spencermartinsia viticola* and *Spencermartinsia plurivora*. The only isolate in this study belonging to the family Diaporthaceae didn't have its molecular marker ITS successfully sequenced and therefore, according to the morphological characteristics of its colonies on PDA, it was only identified to the genus level as *Diaporthe* sp.. It was concluded that, opposite to the expectations, the fungi from the family Botryosphaeriaceae have significantly greater prevalence on fig trees in Croatia than those from the family Diaporthaceae. Also, among the five species of fungi from the family Botryosphaeriaceae for the first time in the world found on fig trees in this study, even two species, *N. parvum* and *S. viticola*, may potentially be important pathogens of fig.

Keywords: *Ficus carica*, molecular identification, wood mycoses, Botryosphaeriaceae, Diaporthaceae

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Pregled literature.....	2
2.1. Gljive iz porodice Botryosphaeriaceae na smokvi u svijetu.....	2
2.1.1. <i>Lasiodiplodia theobromae</i> na smokvi.....	3
2.1.2. <i>Neoscytalidium dimidiatum</i> i <i>N. Novaehollandiae</i> na smokvi.....	3
2.2. Gljive iz porodice Diaporthaceae na smokvi.....	3
2.2.1. <i>Diaporthe cinerescens</i>	4
3. Materijali i metode.....	7
3.1. Sakupljanje uzoraka drva smokve.....	7
3.2. Izolacija gljiva i dobivanje čiste kulture.....	7
3.3. Identifikacija gljiva na temelju morfoloških obilježja kolonija na KDA.....	7
3.4. Molekularna identifikacija.....	8
3.5. Izolacija ukupne genomske DNA izolata gljiva.....	8
3.6. Umnažanje DNA molekularnih markera lančanom reakcijom polimeraze (PCR).....	9
3.7. Horizontalna gel elektroforeza.....	10
3.8. Pročišćavanje PCR produkata.....	10
3.9. Sekvenciranje produkata PCR reakcije.....	11
3.10. Analiza sekvenciranih uzoraka.....	11
4. Rasprava i rezultati.....	14
4.1. Rezultat sakupljanja uzoraka drva smokve i izolacija gljiva u čistu kulturu.....	14
4.2. Selekcija izolata prema morfološkim obilježjima kolonija na KDA.....	14
4.3. Rezultat identifikacije izolata molekularnim metodama.....	14
4.3.1. Molekularna identifikacija izolata iz porodice Botryosphaeriaceae.....	15
4.3.1.1. <i>Neofusicoccum parvum</i>	15
4.3.1.2. <i>Dothiorella omnivora</i> (<i>Diplodia coryli</i> / <i>Diplodia juglandis</i>).....	19
4.3.1.3. <i>Dothiorella sempervirentis</i>	20
4.3.1.4. <i>Spencermartinsia viticola</i>	21
4.3.1.5. <i>Spencermartinsia plurivora</i>	22
4.3.2. Molekularna identifikacija izolata iz porodice Diaporthaceae.....	23
5. Zaključci.....	24
6. Literatura.....	25

1. UVOD

Smokva (*Ficus carica* L.) je jedna od najstarijih kultiviranih voćaka na svijetu i pripada porodici dudova (Moraceae), (Vego i dr., 2008). Od oko 1.100.000 tona svjetske proizvodnje smokve više od 80% proizvodi Sredozemlje (Faostat, 2016). Najveći proizvođači pa time i izvoznici su Turska, Grčka, Alžir, Maroko i Španjolska. U Hrvatskoj, poslije masline, smokva je najraširenija voćka od Istre do Dubrovačkog primorja, a u manjoj je mjeri rasprostranjena u Dalmatinskoj zagori i dolini Neretve. Broj stabala se tijekom godina znatno smanjio i smokva uglavnom raste pojedinačno ili po nekoliko desetaka stabala, često u okviru vinograda (Anonimno, 2016a). Prema podacima Zavoda za statistiku proizvodnja smokve se znatno smanjila u odnosu na 2010. godinu koja je tada iznosila 2123 t, a 2014. godine svega 987 t. Intenzivna proizvodnja za tržište je od 2010. godine bila u porastu, ali naglo pada u 2014. godini, dok je proizvodnja smokava za vlastite potrebe u stalnom padu. Ukupna proizvodnja i prirod smokve prema podacima Zavoda za statistiku je od 2010. godine bila u porastu, ali je naglo počela padati 2014. godine dok su površine pod smokvom u stalnom padu. Radi revitalizacije proizvodnje koja je u opadanju bitno je poznavati bolesti koje napadaju ovu kulturu. Približno 75% od ukupnog broja biljnih bolesti izazivaju gljive. Gljive se hrane parazitirajući na drugim organizmima koristeći hranu izravno od njih ili kao saprofiti razgradnjom nežive organske tvari (Brzica, 2016). Bolesti se najčešće javljaju u vidu simptoma karakterističnih za određenu bolest. Simptomi predstavljaju posljedice različitih procesa koji se dešavaju u ili na biljci pod utjecajem patogena i reakcije biljke na određenog patogena. Uzročnici mikoza drva mogu dovesti do rak rana na kori biljke, začepjenja provodnih snopova biljke, sušenja pupova i izboja, venuće i dr., dok progresija navedenih simptoma naposljetku dovodi do potpunog sušenja i propadanja čitavih biljaka. Smokva je drvenasta biljka koja je također podložna napadu gljiva koje uzrokuju bolesti drva, a za koje je karakteristična pojava rak rana, a može doći i do sušenja izboja ili čitavih biljaka. Rak rane javljaju se na kori stabla i grana smokve te zahvaćaju stanice kore koje zatim odumiru. Oko odumrlog tkiva dolazi do hipertrofije stanica što dovodi do stvaranja rak rane, a okolno tkivo postaje hrapavo, ulegnuto, tamno smeđe do crne boje s korom koja postaje deformirana. (Cvjetković, 2010). Kao najvažniji uzročnici bolesti drva smokve navode se gljive iz porodice Diaporthaceae i to gljiva *Diaporthe cinerascens* (Abdollahzadeh i sur., 2014), no gljive iz porodice Botryosphaeriaceae, poznati gljivični patogeni drva mnogih drvenastih biljaka, također su u posljednje vrijeme prepoznati kao značajni patogeni drva smokve (Gonzalez-Dominguez i sur., 2016).

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Gljive iz porodice Botryosphaeriaceae na smokvi

Porodica Botryosphaeriaceae prema sistematskoj klasifikaciji pripada redu Botryosphaeriales Schoch, Crous & Shoemaker (2006), razredu Dothideomycetes Erikss. & Winka i odjelu Ascomycota. Ova porodica prema Kirk i sur. (2008) sadrži 26 rodova gljiva s tim da ima više od 1500 vrsta te je to čini jednom od najbrojnijih porodica u carstvu gljiva. Prema filogenetskim analizama gljiva iz porodice Dothideomycetes Schoch i sur. (2006) su ustanovili red Botryosphaeriales, s tim da taj red ima samo jednu porodicu Botryosphaeriaceae.

Ova brojna i taksonomski kompleksna porodica se u zadnjih nekoliko godina detaljnije istražuje (Slippers i sur., 2004a; 2004b i 2004c; Crous i sur., 2006; Slippers i sur., 2007a; Phillips i sur., 2008) što je znatno doprinijelo boljem poznavanju same taksonomije pripadajućih vrsta kojih ima preko 1600 vrsta unutar 29 rodova (*Aplosporella*, *Auerswaldia*, *Auerswaldiella*, *Barriopsis*, *Botryobambusa*, *Botryosphaeria*, *Cophinforma*, *Diplodia*, *Dothiorella*, *Guignardia*, *Lasiodiplodia*, *Leptoguignardia*, *Macrophoma*, *Macrophomina*, *Macrovalsaria*, *Melanops*, *Neodeightonia*, *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium*, *Phaeobotryon*, *Phaeobotryosphaeria*, *Phyllachorella*, *Phyllosticta*, *Pseudofusicoccum*, *Pyrenostigme*, *Saccharata*, *Sivanesania*, *Spencermartinsia* i *Vestergrenia*), (Liu i sur., 2012).

Liu i sur. (2012) su svojim istraživanjima otkrili da su vrste iz porodice Botryosphaeriaceae jako raširene diljem svijeta i to u različitim klimatskim i geografskim područjima. Sam način života ovih vrsta gljiva pokazuje veliku raznolikost pa tako mogu biti nepatogeni endofiti na drvenastim biljnim vrstama, ali i patogeni na raznim biljkama domaćinima s tim da najviše prevladavaju na drvenastim vrstama Slippers i Winfield (2007) što uključuje i smokvu.

Prema on-line bazi Fungal databases (2016) gljive iz ove porodice koje su nađene na smokvi su *Lasiodiplodia theobromae* Griffon & Maubl koja je pronađena u Turskoj, *Neoscytalidium dimidiatum* Crous & Slippers i *N. Novaehollandiae* Pavlić, Burgess & Wingf. pronađene u Australiji, *Botryosphaeria disrupta* Arx & Müll i *Barriopsis fusca* Phillips, Alves & Crous pronađene na Floridi, *Botryosphaeria berengeriana* De Not. i *Botryosphaeria dothidea* Ces. & De Not. pronađene u Italiji, *Botryosphaeria quercuum* (Schwein.) Sacc. na Floridi, kao i *Neofusicoccum ribis* Crous, Slippers & Phillips koja je nađena na Floridi. Više podataka

postoji za vrste *Lasiodiplodia theobromae*, *Neoscytalidium dimidiatum* i *N. novaehollandiae* što je ukratko prikazano u nastavku.

2.1.1. *Lasiodiplodia theobromae* na smokvi

Lasiodiplodia theobromae na smokvi uzrokuje rak rane, pucanje kore, truljenje i propadanje. Bolest je uočena 2008. godine u Turskoj gdje je uzrokovala teška sušenja izbojaka i grana smokve. Do danas bolest nije značajno proširena, te se smatra da se pojavljuje samo na pojedinim sortama. Bolest je zabilježena na sorti Beyazorak. Ipak, preliminarne studije patogenosti pokazale su da je *Lasiodiplodia theobromae* također izazvao pucanje kore na sorti Sarilop koja se u velikoj mjeri uzgaja u Turskoj. Ovaj patogen također izaziva simptome na drugim kulturama kao što su vinova loza, mango i kakao. Prema našim saznanjima, ovo je prvo izvješće u svijetu koje potvrđuje ovog patogena na smokvi (Çelike i Michailides 2012).

2.1.2. *Neoscytalidium dimidiatum* i *N. novaehollandiae* na smokvi

Neoscytalidium novaehollandiae prvi put je otkrivena u Australiji 2008. godine gdje je ova gljiva na smokvi uzrokovala propadanje, trulež korijena i rak drveta (Ray i sur., 2010). U Kini je 2011. godine također na stablima zamijećena pojava okruglih, crvenkasto – smeđih mrlja. Mrlje su se kontinuirano širile i stvarale velike površine raka, a analizom je utvrđeno da se radilo o gljivi *Neoscytalidium dimidiatum* (Lan i He, 2012).

2.2. Gljive iz porodice Diaporthaceae na smokvi

Prema sistematskoj pripadnosti porodica Diaporthaceae pripada redu Diaporthales, podrazredu Sordariomycetidae, razredu Sordariomycetes, odjelu Ascomycota (Kirk i sur., 2008). Ovaj red obuhvaća još i porodice Cryphonectriaceae, Gnomoniaceae, Melanconidaceae, Schizoparmeaceae, Pseudovalsaceae, Sydowiellaceae, Togniaceae i Valsaceae (Rossman i sur., 2007). Sadrži ukupno 144 rodova i 1196 vrsta s tim da mnoge vrste predstavljaju veliku ekonomsku opasnost na raznim kulturnim biljkama pa tako i na smokvi. Ova porodica obuhvaća 5 rodova od kojih je nama najznačajniji rod *Diaporthe* Nitschke, a ostali rodovi su *Allantoportha* Petr., *Diaporthopsis* Fabre., *Mazzantia* Mont. i *Phomopsis* (Sacc.) Bubák. Prema načinu života ove gljive mogu biti fitopatogene, endofitne, epifitne i saprofitne (Kirk i sur. 2008).

Prema Kirk i sur. (2008) rod *Diaporthe* obuhvaća 92 vrste, dok prema novijim istraživanjima koje su proveli Gomes i sur. (2013) rod *Diaporthe* obuhvaća 95 vrsta. Prema nekim starijim taksonomskim i filogenetskim istraživanjima (Uecker, 1988) rod *Phomopsis* imao je više od 900 vrsta dok je rod *Diaporthe* imao više od 800 vrsta. Zahvaljujući novim razvijenim molekularnim metodama identifikacije gljiva (Santos i sur., 2010; Shenoy i sur., 2007; Crous, 2005) broj vrsta ovih rodova je u stalnoj reviziji (Gomes i sur., 2013; Udayanga i sur., 2011 i 2012), odnosno nove metode su znatno smanjile njih broj zbog lakše i jednostavnije identifikacije.

Prema on-line bazi Fungal databases (2016) gljive iz porodice Diaporthaceae na smokvi u svijetu do sada su pronađene samo gljive iz roda *Diaporthe* i to samo vrsta *Diaporthe cinerescens* koja je pronađena u Bugarskoj i vrsta *Diaporthe eres* Nitschke koja je pronađena u Italiji. Više podataka postoji za vrstu *Diaporthe cinerescens* Sacc. što je ukratko prikazano u nastavku.

2.2.1. *Diaporthe cinerescens*

Početni simptomi *Diaporthe cinerescens* se najčešće javljaju na dijelovima biljke koji su na bilo koji način oštećeni. Oštećenja nastaju mehaničkim putem ili kao posljedica smrzavanja, zbog toga se ova gljiva ubraja u parazite ozljeda. U Svijetu je prisutna u Iranu i SAD-u, u Hrvatskoj na području Istre i Dalmacije, te na pojedinim lokalitetima u Ravnim kotarima, u Hercegovini je česta i opasna bolest koja izaziva znatne štete (Cvjetković, 2010).

Optimalna temperatura za rast ove gljive je 25 °C. Testovi patogenosti su pokazali da gljiva može zaraziti inokulirane grane na temperaturama od 15-25 °C, a infekcija se ne događa na temperaturi manjoj od 5 °C ili na više od 30 °C. U prirodnim uvjetima patogen vrši zarazu na granama od jeseni do sredine proljeća, a u vlažnim uvjetima stvaraju piknide koji sadrže konidije pomoću kojih se razmnožavaju. Patogen preživljava u rak ranama na drveću ili na granama u voćnjacima (Slika 1), a rezidba i alat za rezidbu su glavni načini prijenosa ove bolesti. Uzročnik je aktivan tijekom mirovanja domaćina, a kretanjem vegetacije domaćin se brani od patogena. Na plantažama u Kaliforniji smokva je se pokazala imunom na infekciju ovom gljivom od travnja pa do kraja vegetacije, ali se pokazala osjetljivom od studenog do veljače. Utvrđeno je i da temperatura i vlaga imaju jako važnu ulogu kod ovog patogena tj. važna je za pojavu rak rana, a micelij za njezino održavanje u nepovoljnim uvjetima. Kada su temperatura i vlaga povoljni dolazi do stvaranja novih piknida s konidijama koji uzrokuju nove infekcije i tako uzrokuju širenje bolesti (Zia i Ali, 2009).



Slika 1. Rak rana u presjeku kroz izboj smokve

(Izvor: <http://ucanr.edu/datastoreFiles/391-292.pdf> [Pristupljeno 11.07.2016.])

Simptomi se najčešće javljaju na dijelovima biljke koji su na neki način oštećeni, stoga se ova gljiva ubraja u parazite ozljeda. Na zaraženim dijelovima grana i debla nastaju ulegnuća koja rezultiraju zastoj u rastu zaraženog dijela kore. Kroz godine ulegnuća bivaju sve veća, dolazi do pucanja (Slika 2) i opadanja pojedinih suhih dijelova kore. Na starijim i debljim granama dolazi do nastanaka crne strome s piknidima. Kada ulegnuće prstenuje granu ili deblo dolazi do sušenja dijelova iznad zaraženog mjesta. Štete uslijed djelovanja ove bolesti značajnije su ukoliko su napadnute deblje grane ili deblo (Cvjetković, 2010).



Slika 2. Pukotine kore na grani smokve

(Izvor: <http://ucanr.edu/datastoreFiles/391-292.pdf>,
<https://forum.giardinaggio.it/threads/corteccia-del-fico-si-sta-spaccando-in-pi%C3%B9-punti.159115/> [Pristupljeno 11.07.2016.])

Na temelju pregledane literature postavljeni su sljedeći ciljevi istraživanja:

1. Sakupiti uzorke drva smokve na više lokaliteta u Hrvatskoj i iz njih izolirati gljive u čistu kulturu
2. Prema morfološkim obilježjima kolonija na KDA selektirati one izolate gljiva koje pripadaju porodicama Diaporthaceae ili Botryosphaeriaceae
3. Uporabom molekularnih i bioinformatičkih metoda identificirati izolate gljiva iz dviju porodica i to po mogućnosti do razine vrste.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Sakupljanje uzoraka drva smokve

Tijekom 2014. i 2015. godine skupljeni su uzorci zaraženog drva smokve koji su pokazivali simptome bolesti drva kakvi se povezuju s gljivama iz porodica Botryosphaeriaceae i Diaporthaceae na lokalitetima Kaštela A, Kaštela B, Naklice-Mosor A, Naklice-Mosor B, Tugare, Split, Kaštela C, Stobreč, Klis-Solin A, Klis-Solin B, te su uzorci označeni te u što kraćem vremenu dopremljeni u laboratorij na daljnju obradu.

3.2. Izolacija gljiva i dobivanje čiste kulture

Sa simptomatičnog drva uzoraka smokve uklonjena je kora, te su na granici zdravog i zaraženog drva uzeti komadići drva koji su potom isprani pod mlazom tekuće vode. Nakon ispiranja uzorci su podvrgnuti površinskoj sterilizaciji koja je uključivala uranjanje komadića drva u 3% otopinu natrijevog hipoklorita (NaOCl) u trajanju od 15 sekundi, zatim su komadići drva isprani sa sterilnom destiliranom vodom te osušeni u sterilnoj komori (VBH Compact, Steril, Italija) postavljanjem na sterilni filter papir gdje su se sušili strujanjem zraka oko 10 min. Nakon sušenja, komadići drva su u sterilnim uvjetima postavljeni u Petrijeve zdjelice na hranjivu podlogu KDA (krumpirov dekstrozni agar) s dodatkom $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ antibiotika streptomycin sulfata (Krka d.o.o., Slovenija) (KDA+Strep) tako da se komadić drva prisloni i blago pritisne na površinu hranjive podloge. Uzorci se potom inkubiraju u termostatu na $25 \text{ }^\circ\text{C}$ u mraku do pojave mladih kolonija gljiva. Da bi dobili čistu kulturu uzimaju se vrhovi hifa mladih kolonija i u sterilnim se uvjetima precjepljuju u nove Petrijeve zdjelice na hranjivu podlogu KDA kojoj nije dodan streptomycin sulfat.

3.3. Identifikacija gljiva na temelju morfoloških obilježja kolonija na KDA

Izolati koji su prema morfološkim obilježjima kolonija na KDA (boja i izgled zračnog micelija, boja kolonije na naličju Petrijeve zdjelice), razvrstane su u porodicu Diaporthaceae odnosno Botryosphaeriaceae, te su na taj način odvojene od ostalih gljiva. Svi izolati su kultivirani u mraku na KDA na temperaturi od $25 \text{ }^\circ\text{C}$, prikladnoj za kultivaciju vrsta iz obiju porodica. Pregled kolonija provoden je nakon 3, 7 i 30 dana za porodicu Diaporthaceae, odnosno 2, 7 i 30 dana za Botryosphaeriaceae, a na temelju opaženih morfoloških

karakteristika kolonija izolata donesena je odluka o tome da li i koje izolate treba u nastavku istraživanja obraditi molekularnim i bioinformatičkim metodama.

3.4. Molekularna identifikacija

Kako bi utvrdili točnu taksonomsku pripadnost izolata u ovom istraživanju, neophodna je analiza odgovarajućih molekularnih markera u njihovom genomu. Za analizu molekularnih markera korištena je metoda lančane reakcije polimerazom (PCR) gdje je za umnažanje molekularnog markera ITS korišten par početnica ITS5/ITS4, a za izolate iz porodice Botryosphaeriaceae dodatno je umnožen i molekularni marker EF1- α korištenjem para početnica EF1-728F/EF1-986R. Nakon umnažanja molekularnih markera ITS i EF1- α , dobiveni PCR produkti su podvrgnuti pročišćavanju uz uporabu kita za pročišćavanje PCR produkata, a potom im je sekvenciranjem utvrđen redosljed nukleotida. Dobivene sekvence su uspoređene s referentnim sekvencama iz međunarodne baze podataka GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), korištenjem metode BLAST, a dodatno je provedena i filogenetska analiza.

3.5. Izolacija ukupne genomske DNA izolata gljiva

Zbog različite brzine rasta izolati iz porodice Botryosphaeriaceae kultivirani su na KDA u trajanju od dva dana, a izolati iz porodice Diaporthaceae u trajanju od pet dana na sobnoj temperaturi u termostatu u mraku. Zatim je kružnim sječivom promjera 3 mm uzeto šest komadića koloniziranog rubnog dijela KDA i preneseno u novu Petrijevu zdjelicu promjera 90 cm na KDA preko kojeg je prethodno stavljena plastična folija s mikroporama. Komadići su ravnomjerno posloženi po površini Petrijeve zdjelice tako da je kolonizirani dio KDA prislonjen na foliju. Inkubacija na 25 °C trajala je sve do pojave dovoljne količine mladog micelija koji se potom sakupljao nježnim struganjem pomoću sterilne metalne lopatice (50 - 100 μ g micelija po uzorku) i pohranjivao u 2 mL Eppendorf tubice s ciljem korištenja odmah ili su bile pohranjene na -20 °C sve do početka izolacija DNA.

U tubice sa sakupljenim micelijem je dodano po 50 μ g autoklaviranih staklenih kuglica (Sigma Aldrich, SAD). Tubice su potopljene u tekući dušik na pet minuta, te su stavljene na led do sljedećeg koraka. Unutar digestora u svaku tubicu s micelijem dodano je po 250 μ L fenola (Sigma, Aldrich SAD), 250 μ L kloroforma (Kemika, Zagreb) i 0,5 mL pufera za lizu. Puffer za lizu prethodno je pripremljen, a sadržavao je sljedeće komponente: 100 mM NaCl,

10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA, 2 % Triton X-100, 1 % SDS i 1 % PVP (Sigma-Aldrich, SAD). Sadržaj tubica se potom miješao vorteksiranjem 20 min pri 1400 okretaja u minuti, te se centrifugiraju na 13500 okretaja u minuti, 25 minuta na temperaturi od 4 °C. Supernatant s vodenom otopinom DNA i RNA (300 – 400 µL) prenesen je u novu eppendorf tubicu od 1,5 µL u koju je dodan isti volumen hladnog izopropanola (-20 °C), (Kemika, Zagreb). Nakon blagog miješanja, tubice su centrifugirane pri 13500 okretaja u minuti 10 min pri temperaturi od 4 °C. Dobiveni talog na dnu tubica sadržavao je nukleinske kiseline koje su, nakon odlijevanja supernatanta, isprane s 1 mL 70% hladnog etanola (-20°C), a tubice su potom centrifugirane pri 13500 okretaja u minuti na 10 minuta i pri 4 °C. Nakon centrifugiranja opet 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 µL TE pufera (pH 8.0, Promega, Madison, SAD) s dodatkom 1 µL RNaze-A (50µg/mL, Sigma-Aldrich, SAD), a tubica je potom inkubirana na 55 °C, 15 minuta (Santos i sur. 2009).

3.6. Umnažanje DNA molekularnih markera lančanom reakcijom polimeraze (PCR)

Metodom lančane reakcije polimerazom (PCR) umnoženi su specifični odsječci DNA molekularnih markera EF1- α i ITS. Za PCR reakcije korištene su odgovarajuće početnice i to ITS5 i ITS4 za umnažanje molekularnog markera ITS kod izolata iz obiju porodica i početnice EF1-728F i EF1- 986R za umnažanje molekularnog markera EF1- α kod izolata iz porodice Botryosphaeriaceae.

Za umnažanje ITS molekularnog markera korištena je reakcijska smjesa koja je sadržavala 25 µL reakcijske smjese iz PCR kita Emerald Amp® MAX PCR MasterMix (Takara BIO INC, Japan), 1 % DMSO (Merck, Njemačka), 12,5 pmol svake od početnica i 50 ng DNA predložka u volumenu od 50 µL.

Reakcija umnažanja ITS regija odvijala se u termocikleru Mastercycler (Eppendorf AG, Hamburg, Njemačka) gdje su se vrijednosti i trajanje reakcije mijenjali pri određenim temperaturama: početno zagrijavanje odvijalo se na temperaturi od 95 °C u trajanju od 10 minuta nakon čega je slijedilo 35 ciklusa umnažanja. Svaki korak umnažanja uključivao je korak na 94 °C u trajanju od 30 sekundi, drugi korak na 53 °C u trajanju od 30 sekundi, te treći korak na 72 °C u trajanju od 60 sekundi. Nakon posljednjeg ciklusa slijedilo je završno produljenje na 72 °C u trajanju od 10 minuta.

Za umnažanje EF1- α molekularnog markera korištena je reakcijska smjesa koja je sadržavala 25 µL reakcijske smjese iz PCR kita Emerald Amp® MAX PCR MasterMix (Takara BIO

INC, Japan), 1 % DMSO(Merck, Njemačka), 12,5 pmol svake od početnica i 50 ng DNA predloška u volumenu od 50 μ L.

Reakcija umnažanja EF1- α regija odvijala se u istom uređaju, ali u različitim koracima reakcija. Početno zagrijavanje se odvijalo pri temperaturi na 95 °C u trajanju od 3 minute, zatim je slijedilo umnažanje od 35 ciklusa, gdje je prvi korak na 95 °C u trajanju od 30 sekundi, drugi korak na 55 °C u trajanju od 30 sekundi i posljednji korak na 72 °C u trajanju od 60 sekundi. Ciklus umnažanja završava produljenjem na 72 °C u trajanju od 5 minuta.

3.7. 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 μ L/20 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.

3.8. Pročišćavanje PCR produkata

Pročišćavanje PCR produkata je neophodno prije sekvenciranja istih, a umnoženu je DNA potrebno „očistiti“ od svih sastojaka PCR smjese. Pročišćavanje PCR produkata provedeno je pomoću kita „Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System“ (Promega, SAD) prema uputstvima proizvođača, uz manje modifikacije. Protokol je sadržavao korake ukratko opisane kako slijedi. PCR tubici s PCR produktom se dodaje dvostruki volumen otopine za vezanje na membranu. Dobivena smjesa se stavlja u tubicu s filter membranom za vezanje DNA te se inkubira 4 minute na sobnoj temperaturi. Nakon toga se tubice s filter membranom stavljaju u centrifugu na 13500 okretaja po minuti, 1 minutu. Filtrat se odbacuje, a DNA uhvaćena na membrani se ispiri sa 700 μ L otopine za ispiranje te centrifugira na 13500 okretaja po minuti, 1 minutu. Filtrat se odbaci, a ispiranje se ponovi s 500 μ L otopine za ispiranje i centrifugira 5 minuta. Tubice s filter membranom se potom ostavljaju otvorene da zaostatak otopine za ispiranje ishlapi nakon čega se prenesu u novu tubicu od 1,5 mL. Elucija DNA s membrane provodi se dodatkom 30 μ L vode molekularne čistoće uz inkubaciju od 3 minute pri sobnoj

temperaturi te konačno centrifugira pri 13500 okretaja u minuti, 1 minutu. Pročišćena DNA se pohrani na -20°C.

3.9. Sekvenciranje produkata PCR reakcije

Kako bi se utvrdio nukleotidni slijed umnoženih odsječaka DNA molekularnih markera ITS i EF1- α , isti su u pročišćenom obliku poslani u biotehnošku kompaniju Macrogen Europe (Macrogen Europe Inc., Amsterdam, Nizozemska), gdje su sekvencirani. Sekvenciranje je provedeno u oba smjera za svaki molekularni marker uz pomoć početnica koje su korištene za njihovo umnažanje, a uređaj za sekvenciranje bio je automatski sekvencer ABI3730XL (Applied Biosystems, SAD).

3.10. Analiza sekvencioniranih uzoraka

Pomoću programskog alata MEGA verzija 6 izvršena je obrada dobivenih sekvenci i filogenetska analiza. Unutar MEGA-e 6 korišten je modul „Alignment explorer“ pomoću kojeg su poravnate sekvence. U tom programu sekvence su uređene u smjeru 5' prema 3' i pohranjene su u FASTA formatu u tekstualnu datoteku. Analiza sekvenci prvo je provedena usporedbom sekvenci molekularnih markera ITS i EF1- α s odgovarajućim sekvencama referentnih izolata koji su preuzeti iz međunarodne baze podataka GenBank (<http://WWW.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Za navedenu usporedbu korišten je program BLAST (Basic Logical Alignment Search Tool) na internet adresi <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. Dobiveni postotak sličnosti odnosno homologije između analiziranih izolata iz ovog istraživanja i referentnih izolata iz baze podataka GenBank bio je temelj za donošenje zaključaka o vjerojatnoj pripadnosti izolata određenoj vrsti ili rodu. U svrhu dodatne analize, konstruirana su filogenetska stabla pomoću statističke metode „Maximum likelihood“ u okviru filogenetskog modula programskog paketa MEGA 6. Prema Phillips i sur. (2012) parametri za metodu Maximum likelihood bili su: „Substitution type“=Nucleotide; „Model/Method“=General time reversable model; „Rates among sites“=Gamma distribution with invariant sites (G+I); „No of discret Gamma categories“=6; Gap/Missing Data treatment“=Complete Deletion; „ML Heuristic Method“=Make Initial Tree Automatically (Default-NJ/BioNJ); „Branch Swap Filtar“=Very strong. Za konstrukciju filogenetskih stabala korišteni su referentni izolati odgovarajućih vrsta gljiva uzetih iz baze podataka GenBank (Tablica 1.1).

Tablica 1.1. Popis korištenih izolata i pripadajućih ITS i EF1- α sekvenci iz baze podataka GenBank za gljive iz porodice Bothryiosphaeriaceae

Vrsta gljive	Izolat	Biljka domaćin	Porijeklo	Referenca	GenBank ITS	GenBank EF1 α
<i>Do. americana</i>	CBS128310	Vitis vinifera	USA	Striegler i sur.	HQ288219	HQ288263
<i>Do. eriobotryae</i>	BN-81^{ab}	<i>Eriobotrya japonica</i>	Segorbe	Gonzalez i sur.	KT240287	KT240262
<i>Do. casuarini</i>	CMW4855	-	Sj. Africa	De Wet i sur.	DQ846773	DQ875331
<i>Do. casuarini</i>	CMW4857	-	Sj. Africa	De Wet i sur.	DQ846774	DQ875333
<i>Do. sarmentorum</i>	CBS 115038	<i>Malus pumila</i>	Nizozemska	Phillips i sur.	AY573206	AY573223
<i>Do. sarmentorum</i>	IMI 63581b	<i>Ulmus</i> sp.	V. Britanija	Phillips i sur.	AY573212	AY573235
<i>Do. iranica</i>	IRAN1587C	<i>Olea europaea</i>	Iran	Javadi i sur.	KC898231	KC898214
<i>Do. parva</i>	IRAN1579C	<i>Corylus avellana</i>	Iran	Abdollahzadeh i sur.	KC898234	KC898217
<i>Do. parva</i>	IRAN1583C	<i>Corylus avellana</i>	Iran	Abdollahzadeh i sur.	KC898235	KC898218
<i>Do. iberica</i>	CBS115041	-	Portugal	Phillips i sur.	NR111165	AY573222
<i>Do. iberica</i>	CBS113188	-	Portugal	Phillips i sur.	AY573198	EU673230
<i>Do. brevicollis</i>	CMW36463	<i>Acacia karroo</i>	Sj. Afrika	Slippers i sur.	JQ239403	JQ239390
<i>Do. brevicollis</i>	CMW36464	<i>Acacia karroo</i>	Sj. Afrika	Slippers i sur.	JQ239404	JQ239404
<i>Do. dulcispinae</i>	CBS121764	<i>Acacia mellifera</i>	Sj. Afrika	Van der Walt i sur.	EU101299	EU101344
<i>Do. dulcispinae</i>	CBS121765	-	Sj. Afrika	Slippers i sur.	KF766163	EU101345
<i>Do. dulcispinae</i>	CMW36461	<i>Acacia karroo</i>	Sj. Afrika	Jami i sur.	JQ239401	JQ239388
<i>Do. dulcispinae</i>	CMW36462	<i>Acacia karroo</i>	Sj. Afrika	Jami i sur.	JQ239402	JQ239389
<i>Do. dulcispinae</i>	CMW36460	<i>Acacia karroo</i>	Sj. Afrika	Jami i sur.	JQ239400	JQ239387
<i>Do. santali</i>	MUCC509	<i>Santalum acuminatum</i>	Australija	Taylor i sur.	EF591924	EF591975
<i>Do. santali</i>	MUCC508	<i>Eu. gomphocephala</i>	Australija	Taylor i sur.	EF591923	EF591974
<i>Do. moneti</i>	MUCC506	<i>Acacia rostellifera</i>	Australija	Taylor i sur.	EF591921	EF591972
<i>Do. moneti</i>	MUCC505	<i>Acacia rostellifera</i>	Australija	Taylor i sur.	EF591920	EF591971
<i>Do. pretoriensis</i>	CMW36480	<i>Acacia karroo</i>	Sj. Africa	Jami i sur.	JQ239405	JQ239392
<i>Do. pretoriensis</i>	CMW36481	<i>Acacia karroo</i>	Sj. Africa	Jami i sur.	JQ239406	JQ239393
<i>Do. prunicola</i>	CAP187	-	Portugal	Phillips i sur.	EU673313	EU673280
<i>Do. sempervirentis</i>	IRAN1581C	<i>C. eempervirens</i>	Iran,	Aghajani i sur.	KC898237	KC898220
<i>Do. sempervirentis</i>	IRAN1583C	<i>C. eempervirens</i>	Iran	Aghajani i sur.	KC898236	KC898219
<i>Do. striata</i>	ICMP16819	<i>Citrus sinensis</i>	New Zealand	Pennycook i sur.	EU673320	EU673287
<i>Do. striata</i>	ICMP16824	<i>Citrus sinensis</i>	New Zealand	Pennycook i sur.	EU673321	EU673288
<i>Do. longicollis</i>	CMW26166	-	Australija	Pavlic i sur.	EU144052	EU144067
<i>Do. uruguayensis</i>	UY672	<i>Hexalamis edulis</i>	Uruguay	Perez i sur.	EU080923	EU863180
<i>Diplodia coryli</i>	CBS242.51	-	Italija	Phillips i sur.	EU673317	EU673284
<i>Diplodia juglandis</i>	CBS188.87	-	Portugal	Phillips i sur.	EU673316	EU673283
<i>D. spegazziniana</i>	CBS302.75	-	Portugal	Phillips i sur.	EU673319	EU673286

<i>Sp. citricola</i>	ICMP16827	<i>Citrus sinensis</i>	New Zealand	Pennycook i sur.	EU673322	EU673289
<i>Sp. citricola</i>	ICMP16828	<i>Citrus sinensis</i>	New Zealand	Pennycook i sur.	EU673323	EU673290
<i>Sp. mangiferae</i>	IRAN1545C	<i>Mangifera indica</i>	Iran	Abdollahzadeh i sur.	KC898223	KC898206
<i>Sp. mangiferae</i>	IRAN1546C	<i>Mangifera indica</i>	Iran	Abdollahzadeh i sur.	KC898222	KC898205
<i>Sp. mangiferae</i>	IRAN1584C	<i>Mangifera indica</i>	Iran	Abdollahzadeh i sur.	KC898221	KC898204
<i>Sp. plurivora</i>	CJA257	<i>Eucalyptus</i> sp.	Iran	Abdollahzadeh i sur.	KC898224	KC898207
<i>Sp. viticola</i>	BN-53	<i>E. japonica</i>	La Mojnera	Gonzalez i sur.	KT240290	KT240266
<i>Sp. viticola</i>	BN-78	<i>E. japonica</i>	Segorbe	Gonzalez i sur.	KT240291	KT240267
<i>Sp. viticola</i>	CBS117009	-	Španjolska	Luque i sur. (2005)	AY905554	AY905559
<i>Sp. medicaginis</i>	CBS500.72	-	Portugal	Phillips i sur.	EU673318	EU673285
<i>N. vitifusiforme</i>	STE-U 5050	<i>Vitis vinifera</i>	Juž. Rep.	Niekerk i sur.	AY343382	AY343344
<i>N. vitifusiforme</i>	STE-U 5044	<i>Vitis vinifera</i>	Juž. Rep.	Niekerk i sur.	AY343381	AY343342
<i>N. vitifusiforme</i>	STE-U5252	<i>Vitis vinifera</i>	Sj. Afrika	Niekerk i sur.	AY343383	AY343343
<i>N. australe</i>	STE-U 4598	<i>Vitis vinifera</i>	Juž. Rep.	Niekerk i sur.	AY343407	AY343348
<i>N. umdonicola</i>	CMW14058	<i>Syzygium cordatum</i>	Juž. Rep.	Pavlic i sur.	EU821904	EU821874
<i>N. umdonicola</i>	CMW14079	<i>Syzygium cordatum</i>	Juž. Rep.	Pavlic i sur.	EU821915	EU821885
<i>N. kwambonambiense</i>	CMW14155	<i>Syzygium cordatum</i>	Juž. Rep.	Pavlic i sur.	EU821923	EU821893
<i>N. kwambonambiense</i>	CMW14023	<i>Syzygium cordatum</i>	Juž. Rep.	Pavlic i sur.	EU821900	EU821870
<i>N. cordaticola</i>	CMW13992	<i>Syzygium cordatum</i>	Juž. Rep.	Pavlic i sur.	EU821898	EU821868
<i>N. cordaticola</i>	CMW14056	<i>Syzygium cordatum</i>	Juž. Rep.	Pavlic i sur.	EU821903	EU821873
<i>N. batangarum</i>	CMW28315	<i>Terminalia catappa</i>	Kamerun	Pavlic i sur.	FJ900606	FJ900652
<i>N. batangarum</i>	CMW28637	<i>Terminalia catappa</i>	Kamerun	Pavlic i sur.	FJ900609	FJ900655
<i>N. occulatum</i>	MUCC296	<i>Eucalyptus pellita</i>	Australija	Sacalidis i sur.	EU301034	EU339512
<i>N. occulatum</i>	MUCC232	<i>Eucalyptus pellita</i>	Australija	Sacalidis i sur.	EU301031	EU339510
<i>N. ribis</i>	CMW7772	<i>Ribes</i> sp.	SAD	Slippers i sur.	AY236935	AY236877
<i>N. ribis</i>	CMW7773	<i>Ribes</i> sp.	SAD	Slippers i sur.	AY236936	AY236878
<i>N. ribis</i>	CBS 121.26	<i>Ribes rubrum</i>	SAD	Slippers i sur.	AF241177	AY236879
<i>N. parvum</i>	CMW9081	<i>Populus nigra</i>	Novi Zeland	Slippers i sur.	AY236943	AY236888
<i>N. parvum</i>	CMW9080	<i>Populus nigra</i>	Novi Zeland	Slippers i sur.	AY236942	AY236887
<i>N. parvum</i>	MUCC124	<i>Eucalyptus dunii</i>	Australija	Sacalidis i sur.	EU339544	EU339518
<i>N. parvum</i>	MUCC211	<i>Corymbia torrelliana</i>	Australija	Sacalidis i sur.	EU301017	EU339517
<i>N. parvum</i>	CMW9071	<i>Ribes</i> sp.	Australija	Slippers i sur.	AY236938	AY236880
<i>N. parvum</i>	MUCC673	<i>Eucalyptus globulus</i>	Australija	Sacalidis i sur.	EU339553	EU339520
<i>N. parvum</i>	CMW6235	<i>Tibouchina lepidota</i>	Australija	Slippers i sur.	AY615136	AY615128
<i>N. luteum</i>	CBS110299	<i>Vitis vinifera</i>	Portugal	Phillips i sur.	AY259091	AY573217
<i>N. luteum</i>	CMW9076	<i>Malus x domestica</i>	Novi Zeland	Slippers i sur.	AY236946	AY236893
<i>N. luteum</i>	CBS110497	-	Portugal	Phillips i sur.	EU673311	EU673277
<i>N. mangiferae</i>	CMW7024	<i>Mangifera indica</i>	Australija	Slippers i sur.	AY615185	DQ093221
<i>N. andinum</i>	CBS 117453	<i>Eucalyptus</i> sp.	Venecuela	Mohali i sur.	AY693976	AY693977
<i>N. mediterraneum</i>	CAP253	<i>Olea europaea</i>	Italija	Lazzera i sur.	EF638787	EF638746
<i>Botr. dothidea</i>	CMW8000	<i>Prunus</i> sp.	Švicarska	Slippers i sur.	AY236949	AY236898
<i>N. parvum T110</i>	HPP110	<i>Vitis vinifera</i>	Hrvatska	Kalitema J.	KF923328	KF923330
<i>N. parvum T157</i>	HPP110	<i>Vitis vinifera</i>	Hrvatska	Kalitema J.	KF923328	KF923330
<i>N. parvum T342</i>	SO334	<i>Vitis vinifera</i>	Hrvatska	Kalitema J.	KF296318	KF296319
<i>N. parvum T313</i>	SO334	<i>Vitis vinifera</i>	Hrvatska	Kalitema J.	KF296318	KF296319
<i>N. parvum T121</i>	HPP121	<i>Vitis vinifera</i>	Hrvatska	Kalitema J.	KF923329	KF923331

Podcrtani izolati odabrani su kao vanjska grupa.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Rezultat sakupljanja uzoraka drva smokve i izolacija gljiva u čistu kulturu

Tijekom 2014. i 2015. godine na ukupno deset lokaliteta u Dalmaciji sakupljeno je 30 uzoraka zaraženog drva smokve (3 po lokalitetu). Simptomi na zaraženom drvu uključivali su sušenje izboja, rak rane, nekroze, ispucalu koru, sušenje pupova i venuće. Iz obrađenih uzoraka ukupno je izolirano 38 izolata gljiva u čistu kulturu na KDA.

4.2. Selekcija izolata prema morfološkim obilježjima kolonija na KDA

Analiza morfoloških obilježja izolata temeljila se na ključevima za determinaciju gljiva Richard (1998) ali i na opisu gljiva kod različitih autora (Kaliterna, 2013.; Gomes i sur., 2013; Urbez-Torres, 2011; Crous i sur., 2009; Abdollahzadeh, 2014).

Kolonije gljiva iz porodice Botryosphaeriaceae u početku razvoja, na naličju Petrijeve zdjelice, maslinasto su zelene boje, a kasnije kada dosegnu svoj potpuni razvoj su tamno modre do crne boje. Ove gljive su relativno brzorastuće s obično dobro razvijenim zračnim micelijem koji može biti izrazito gust i ponekad kod nekih vrsta dodirivati poklopac Petrijeve zdjelice, no kod nekih rodova može biti i slabije razvijen, pa se kao primarno selekcijsko svojstvo koristila boja kolonije na naličju.

Za razliku od porodice Botryosphaeriaceae porodicu Diaporthaceae karakteriziraju relativno spororastuće kolonije. Kolonija gljiva je bijele do žuto-bijele ili bijelo-sive boje, a zračni micelij je slabo do srednje razvijen.

Na temelju navedene selekcije izdvojeno je 38 jedinstvenih izolata koji su pripadali u porodicu Botryosphaeriaceae, odnosno 1 iz porodice Diaporthaceae. Svi dotični izolati u nastavku istraživanja podvrgnuti su molekularnim metodama identifikacije.

4.3. Rezultat identifikacije izolata molekularnim metodama

Ukupno je identificirano pet različitih taksona iz porodice Botryosphaeriaceae i to kako slijedi: 1. *Neofusicoccum parvum*, 2. *Dothiorella omnivora*, 3. *Dothiorella sempervirentis*, 4. *Spencermartinsia viticola* i 5. *Spencermartinsia plurivora*.

Zbog neuspjelog sekvenciranja ITS markera izolata SDAL4.33 koji je bio jedini predstavnik porodice Diaporthaceae, dotični izolat identificiran je samo na temelju morfoloških obilježja kolonije na KDA kao *Diaporthe* sp..

4.3.1. Molekularna identifikacija izolata iz porodice Botryosphaeriaceae

4.3.1.1. *Neofusicoccum parvum*

Izolati SDAL1.33 i SDAL6.21, sakupljenih sa lokaliteta Neklince-Mosor A i Split, imali su kolonije s brzorastućim micelijem koji je u početku bio bijele, a starenjem je poprimio maslinasto-sivu boju sa smeđe-sivim zonama. Dobro razvijen zračni micelij dosezao je poklopac Petrijeve zdjelice (Slika 3.). Navedene morfološke karakteristike upućivale su na vrstu *N. parvum*, ali budući da ta vrsta pripada skupini morfološki i filogenetski vrlo sličnih vrsta tj. kompleksu vrsta „*Neofusicoccum parvum* - *N. ribis*“ (Kaliterna, 2013.; Pavlic i sur., 2007.) te zbog toga što je vrsta *N. ribis* već zabilježena na smokvi na Floridi, SAD (Anonymous 1960), zaključeno je da je neophodna dodatna molekularna i filogenetska analiza kako bi se jasno utvrdila taksonomska pripadnost dvaju navedenih izolata.



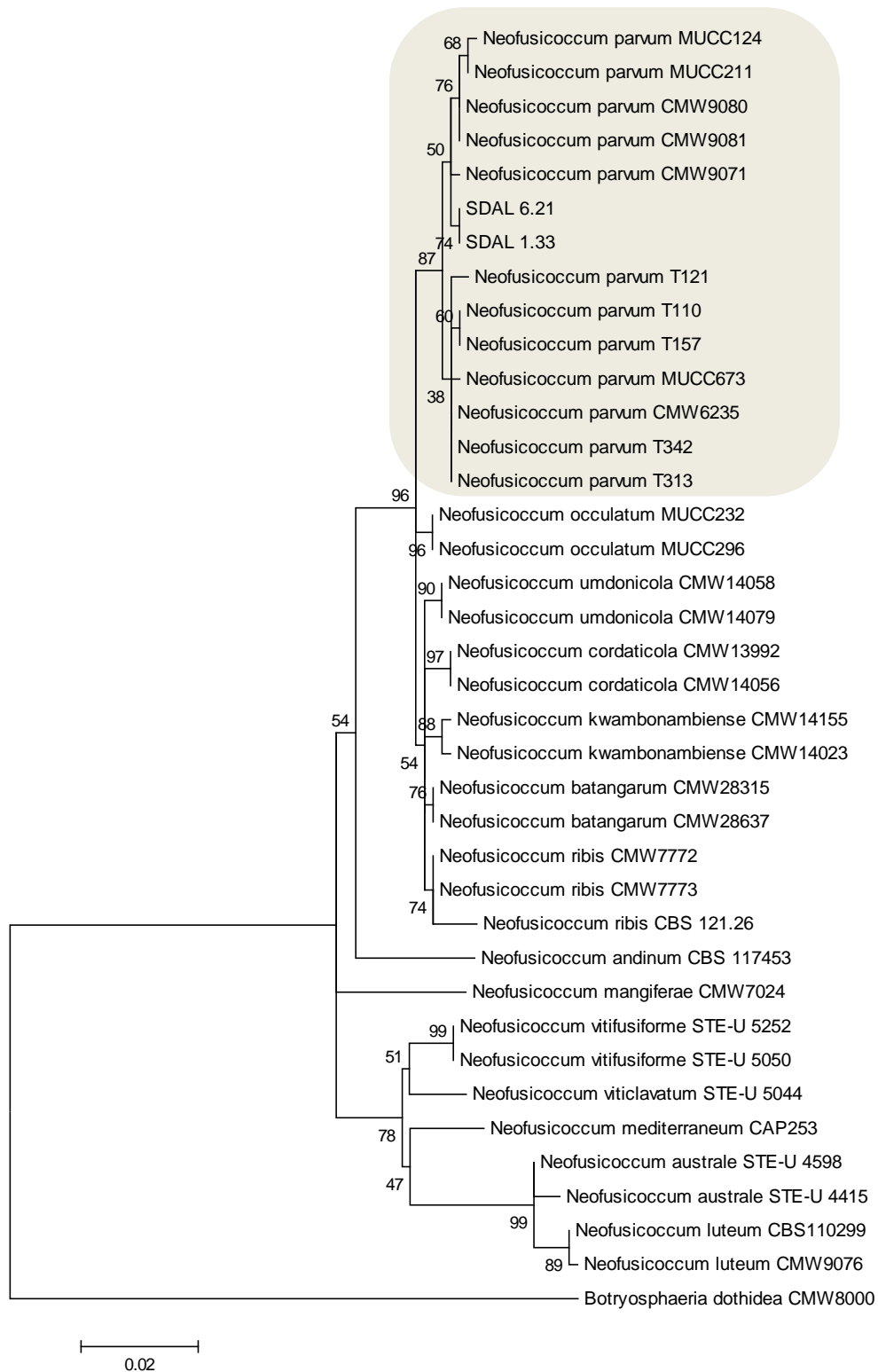
Slika 3. Kolonija na KDA vrste *N. parvum* nakon 2 dana inkubacije

U okviru molekularne analize molekularnog markera ITS za izolate SDAL1.33 i SDAL6.21 metodom PCR dobiveni su produkti veličine 561 parova baza, s postotkom homologije većim od 99 % s odgovarajućom sekvencom referentnog izolata **CMW9080** za vrstu *N. parvum* (GenBank AY236942), odnosno kod analize molekularnog markera EF1- α PCR produkti su bili

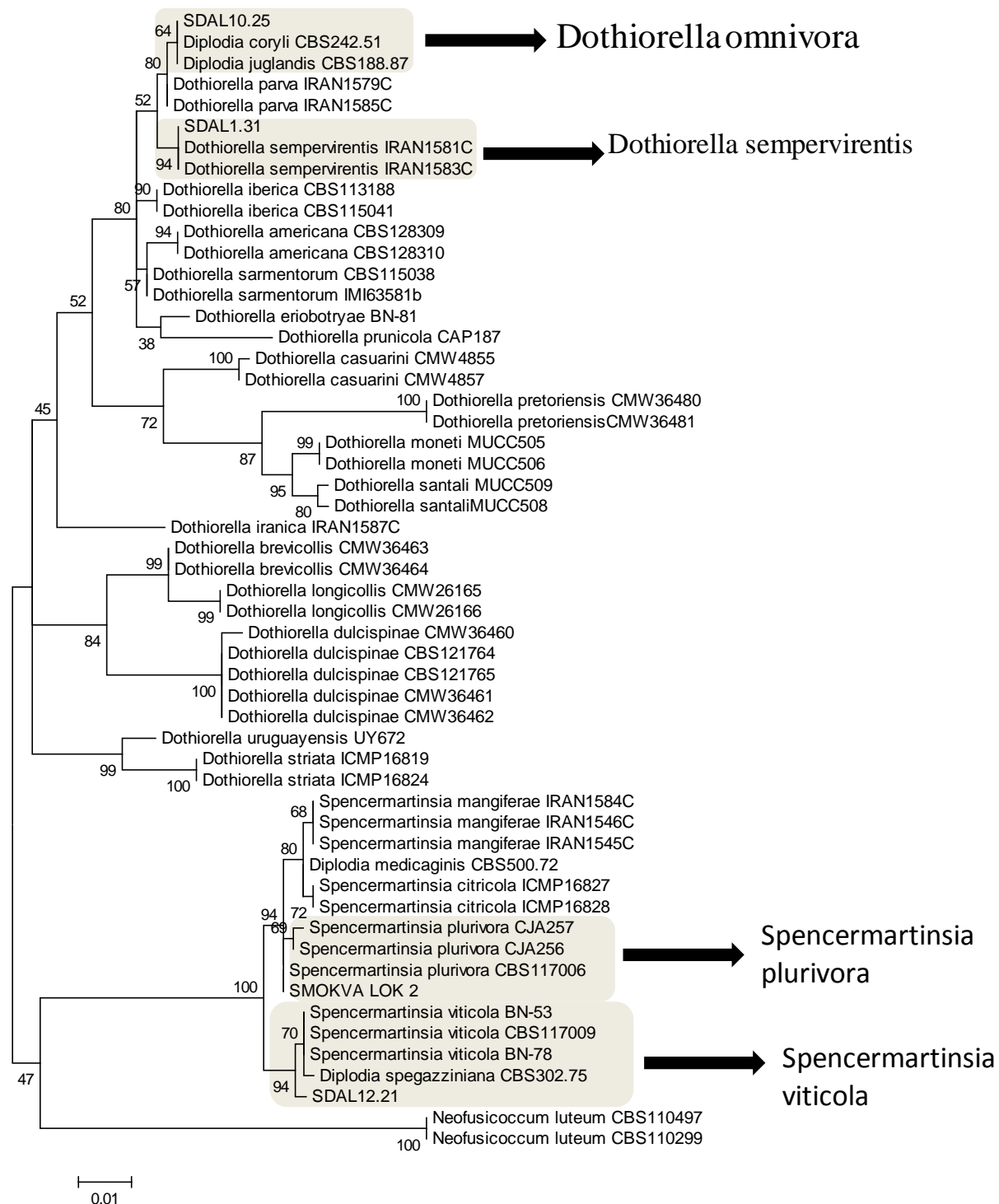
veličine 251 parova baza, a postotak homologije s referentnim izolatom **CMW9080** (GenBank AY236887) bio je 100 %.

U svrhu konačne potvrde taksonomske pripadnosti izolata SDAL1.33 i SDAL6.21, provedena je filogenetska analiza njihovih kombiniranih ITS i EF1- α sekvenci pri čemu su navedene sekvence uspoređene s odgovarajućim ITS+EF1- α sekvencama referentnih izolata vrsta iz roda *Neofusicoccum*. Rezultat filogenetske analize, bilo je jedno filogenetsko stablo (Slika 4.) na kojem se vidi da su se izolati SDAL1.33 i SDAL6.21 grupirali s izolatima za vrstu *N. parvum* u dobro podržanom ogranku s bootstrap vrijednošću od 87 %, čime je potvrđen raniji zaključak da navedeni izolati doista pripadaju vrsti *N. parvum*.

Do sada je ova vrsta u svijetu pronađena na vinovoj lozi i mnogim drugim kulturama (Urbez-Torres, 2011.), a u Hrvatskoj je pronađena na vinovoj lozi gdje se pokazala kao jaki patogen (Kaliterna, 2013.). *Neofusicoccum parvum* u svijetu nije pronađen na smokvi pa je ovo prvi nalaz te izrazito patogene gljive na ovoj kulturi. Da bi provjerili patogenost ove vrste i da bi se ovaj nalaz mogao objaviti kao „First report“ potrebno je s izolatima utvrđenima u ovom istraživanju provesti testove patogenosti na smokvi.



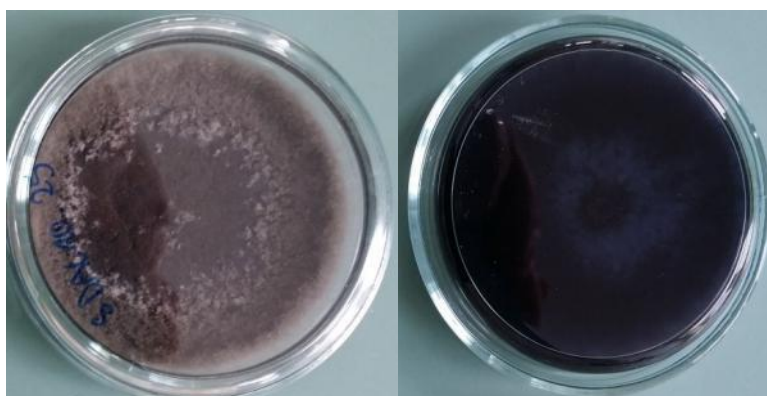
Slika 4. Prikaz filogenetskog stabla dobivenog metodom Maximum likelihood baziranog na analizi poravnatih sekvenci (ITS + EF1- α) izolata SDAL6.21 i SDAL1.33 i referentnih izolata iz banke gena GenBank za različite vrste iz roda *Neofusicoccum*. Vrsta *Botryosphaeria dothidea* uzeta je kao vanjska grupa. Brojevi iznad pojedinih ogranaka predstavljaju postotak od 1000 bootstrap ponavljanja.



Slika 5. Prikaz filogenetskog stabla dobivenog metodom Maximum likelihood baziranog na analizi poravnatih sekvenci (ITS + EF1- α) izolata SDAL12.21, SDAL1.31, SDAL10.25, SMOKVA LOK 2 i referentnih izolata iz banke gena GenBank za različite vrste iz rodova *Dothiorella* i *Spencermartinsia*. Vrsta *Neofusicoccum luteum* uzeta je kao vanjska grupa. Brojevi iznad pojedinih ogranaka predstavljaju postotak od 1000 bootstrap ponavljanja.

4.3.1.2. *Dothiorella omnivora* (*Diplodia coryli*/*Diplodia juglandis*)

Izolat SDAL10.25, sakupljen na lokalitetu Split, imao je koloniju na KDA kojoj je micelij nakon 7 dana bio sivo-maslinaste do sivo-crne boje sa slabije razvijenim zračnim micelijem u središtu kolonije, a nešto svjetlije boje i izdignutiji od površine bio je bliže rubu kolonije. Na naličju je kolonija bila sivo-modre boje (Slika 6). Navedene morfološke karakteristike upućivale su na gljive iz roda *Dothiorella*, što je i potvrđeno molekularnom identifikacijom kojom je potvrđena podudarnost izolata s vrstom *Dothiorella omnivora* kojoj pripadaju taksoni do nedavno poznati pod nazivima *Diplodia coryli* i *Diplodia juglandis*. Do sada je u svijetu vrsta *Dh. omnivora* pronađena na lijeski, crnom grabu, orahu, vinovoj lozi i nekim drugim drvenastim vrstama biljaka, a u Hrvatskoj je nađena na vinovoj lozi gdje se pokazala kao slabo patogena vrsta (Linaldeddu i sur. 2016; Abdollahzadeh i sur., 2014.; Pavlic-Zupanc i sur., 2015; Kaliterna, 2013.).



Slika 6. Kolonija vrste *Dothiorella omnivora* na KDA

U okviru molekularne analize molekularnog markera ITS za izolat SDAL10.25 metodom PCR dobiven je produkt veličine 544 parova baza, s postotkom homologije od 100 % s odgovarajućom sekvencom referentnog izolata **CBS 242.51** za vrstu *Dothiorella omnivora* (GenBank EU673317), odnosno kod analize molekularnog markera EF1- α PCR produkt bio je veličine 238 parova baza, a postotak homologije s referentnim izolatom **CBS 242.51** (GenBank EU673284) bio je 100 %.

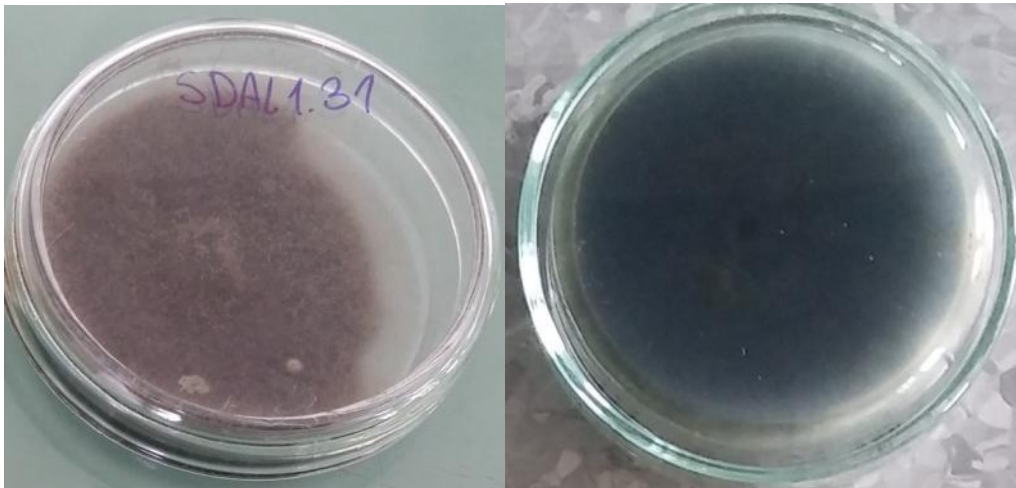
U svrhu konačne potvrde taksonomske pripadnosti izolata SDAL10.25, provedena je filogenetska analiza njihovih kombiniranih ITS i EF1- α sekvenci pri čemu je navedena sekvenca uspoređena s odgovarajućim ITS+EF1- α sekvencom referentnog izolata vrste iz rodova *Dothiorella* i *Spencermartinsia*. Rezultat filogenetske analize, bilo je jedno

filogenetsko stablo (Slika 5.) na kojem se vidi da je izolat SDAL10.25 grupiran s izolatima *Diplodia coryli* i *Diplodia juglandis* u relativno dobro podržanom ogranku s bootstrap vrijednošću od 64%, čime je potvrđen raniji zaključak da navedeni izolat doista pripada vrsti *Dothiorella omnivora*.

Dothiorella omnivora u svijetu nije pronađena na smokvi pa je ovo prvi nalaz te vrste na ovoj kulturi. Da bi utvrdili patogenost ove vrste na smokvi potrebno je provesti testove patogenosti s dotičnim izolatom.

4.3.1.3. *Dothiorella sempervirentis*

Izolat SDAL1.31, sakupljen na lokalitetu Kaštel A, imao je koloniju na KDA kojoj je micelij nakon 7 dana bio maslinasto-crne boje sa slabo razvijenim zračnim micelijem, a na naličju je kolonija bila tamno-zelena do modra (Slika 7).



Slika 7. Kolonija vrste *Dothiorella sempervirentis* na KDA

U okviru molekularne analize molekularnog markera ITS za izolat SDAL1.31 metodom PCR dobiven je produkt veličine 544 parova baza, s postotkom homologije od 100 % s odgovarajućom sekvencom referentnog izolata **IRAN1583C** za vrstu *Dothiorella sempervirentis* (GenBank KC898236), odnosno kod analize molekularnog markera EF1- α PCR produkt bio je veličine 241 parova baza, a postotak homologije s referentnim izolatom **IRAN1583C** (GenBank KC898219) bio je 100 %.

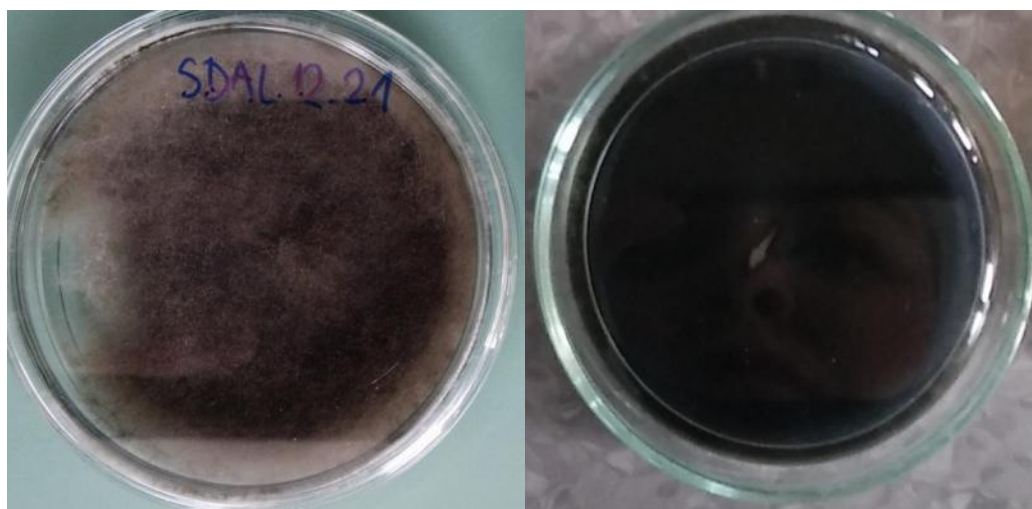
Iz provedene filogenetske analize s referentnim izolatima za vrste *Dothiorella* i *Sempermartinsia* (Slika 5) vidljivo je da se izolat SDAL1.31 grupirao s izolatima za vrstu

Dothiorella sempervirentis u dobro podržanom ogranku s bootstrap vrijednošću od 94 %, pa je zaključeno da navedeni izolat doista pripada dotičnoj vrsti.

Ova je vrsta do sada pronađena samo u Iranu i to na čempresu, stoga nalaz vrste *D. sempervirentis* predstavlja prvi nalaz na smokvi na svijetu. Također je potrebno provjeriti patogenost ove vrste gljive na smokvi.

4.3.1.4. *Spencermartinsia viticola*

Izolat SDAL12.21, sakupljen na lokalitetu Kaštela C, imao je koloniju na KDA s gustim pamučastim zračnim micelijem koji je tamno sive boje, a prelazi starenjem u maslinasto-sivu. Na naličju, kolonija je tamno-modra do crna (Slika 8).



Slika 8. Kolonija vrste *Spencermartinsia viticola* na KDA

U okviru molekularne analize molekularnog markera ITS za izolat SDAL12.21 metodom PCR dobiven je produkt veličine 532 parova baza, s postotkom homologije od 100 % s odgovarajućom sekvencom referentnog izolata **CBS117009** za vrstu *Spencermartinsia viticola* (GenBank AY905554.1), odnosno kod analize molekularnog markera EF1- α PCR produkt bio je veličine 228 parova baza, a postotak homologije s referentnim izolatom **CBS117009** (GenBank AY905559.1) bio je veći od 98 %.

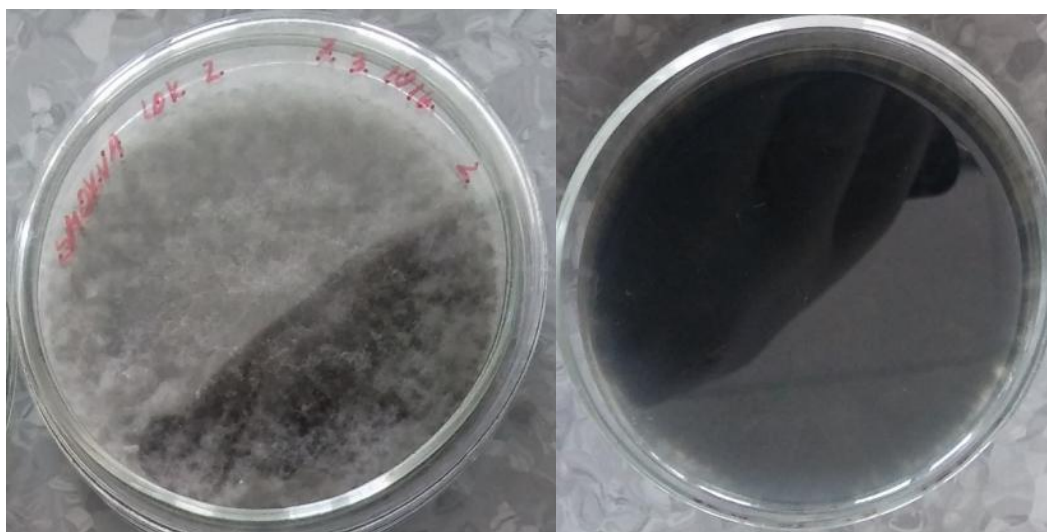
Iz provedene filogenetske analize s referentnim izolatima za vrste *Dothiorella* i *Sempermartinsia* (Slika 5) vidljivo je da se izolat SDAL12.21 grupirao s izolatima za vrstu *Spencermartinsia viticola* u dobro podržanom ogranku s bootstrap vrijednošću od 94 %, čime je potvrđen raniji zaključak da navedeni izolat doista pripada dotičnoj vrsti.

Spencermartinsia viticola kozmopolitna je i omnivorna vrsta poznata s različitih drvenastih voćnih vrsta kao što su bajam, maslina, limun, nešpola, i posebno vinova loza (Gonzalez i sur., 2016). Na vinovoj lozi poznata je kao slabo patogena vrsta, dok se u testovima patogenosti na nešpoli pokazala kao srednje jaki do jaki patogen (Gonzalez i sur., 2016).

U svijetu nije pronađena na smokvi pa je ovo prvi nalaz te vrste na ovoj kulturi, a zbog utvrđivanja virulentnosti na smokvi, bilo bi neophodno provesti testove patogenosti.

4.3.1.5. *Spencermartinsia plurivora*

Izolat SMOKVA LOK 2, sakupljen na lokalitetu Klis-Solin B, imao je koloniju na KDA s dobro razvijenim gustim zračnim micelijem, sivo-maslinaste boje, te tamno-modre do crne boje na naličju kolonije (Slika 9).



Slika 9. Kolonija vrste *Spencermartinsia plurivora* na KDA

U okviru molekularne analize molekularnog markera ITS za izolat SMOKVA LOK 2, metodom PCR dobiven je produkt veličine 531 parova baza, s postotkom homologije od 100% s odgovarajućom sekvencom referentnog izolata **IRAN1557C** za vrstu *Spencermartinsia plurivora* (GenBank KC898225), odnosno kod analize molekularnog markera EF1- α PCR produkt bio je veličine 228 parova baza, a postotak homologije s referentnim izolatom **IRAN1557C** (GenBank KC898208) bio je veći od 99 %.

Iz provedene filogenetske analize s referentnim izolatima za vrste *Dothiorella* i *Sempermartinsia* (Slika 5) vidljivo je da se izolat SMOKVA LOK 2 grupirao s izolatima za vrstu *Spencermartinsia plurivora* u dobro podržanom ogranku s bootstrap vrijednošću od

94%, čime je potvrđen raniji zaključak da navedeni izolat doista pripada vrsti *Spencermartinsia plurivora*.

Vrsta je također omnivorna, a zabilježena je u Iranu, Španjolskoj i Australiji i to na ovim biljnim vrstama: limun, čempres, eukaliptus, orah, jabuka, marelica, nešpola i vinova loza (Abdollahzadeh i sur. 2014; Wayne i sur., 2015). U testu patogenosti provedenom na nešpoli, pokazala se kao slabo patogena vrsta. Ovo je prvi nalaz vrste *S. plurivora* na smokvi u svijetu, stoga bi bilo važno provjeriti stupanj patogenosti ove vrste na smokvi.

4.3.2. Molekularna identifikacija izolata iz porodice Diaporthaceae

Jedinom izoliranom izolatu gljive iz porodice Diaporthaceae SDAL4.33, sakupljenom na lokalitetu Kaštel B, nije uspješno sekvencioniran molekularni marker ITS te je stoga, prema morfološkim karakteristikama kolonije na KDA (Santos, 2010), identificiran do razine roda kao *Diaporthe* sp. (Slika 10), a prema obilježjima zračnog micelija moglo bi se raditi o vrsti *Diaporthe eres* koja je već nađena na smokvi u Italiji, a u Hrvatskoj na vinovoj lozi (Fungal database 2016; Kaliterna, 2013).

Razlog za malom zastupljenošću izolata iz porodice Diaporthaceae u ovom istraživanju mogao bi biti vezan za činjenicu da brzorastuće Botryosphaeriaceae moguće prerastu spororastuće Diaporthaceae (ukoliko su istodobno prisutne u drvu), pa ne budu zamijećene prilikom monohifalne izolacije ili potonjih jednostavno nije bilo u drvu uzorkovanih smokava. Također, piknidi na uzorkovanom drvu smokve nisu uočeni.



Slika 10. Kolonija vrste *Diaporthe* sp. na KDA

5. ZAKLJUČCI

Na temelju proučene literature i provedenih istraživanja doneseni su sljedeći zaključci:

1. U simptomatskom drvu smokve analiziranom u ovom istraživanju prisutne su vrste gljiva iz porodica Botryosphaeriaceae i Diaporthaceae.
2. Bioraznolikost vrsta gljiva iz porodice Botryosphaeriaceae na smokvi, utvrđena u ovom istraživanju, značajna je i predstavljena otkrićem čak pet vrsta (*Neofusicoccum parvum*, *Dothiorella omnivora*, *Dothiorella sempervirentis*, *Spencermartinsia viticola*, *Spencermartinsia plurivora*) po prvi puta nađenih na smokvi u svijetu.
3. Bioraznolikost vrsta gljiva iz porodice Diaporthaceae na smokvi u ovom istraživanju pokazala se malom, a predstavljena je samo jednim izolatom identificiranim kao *Diaporthe* sp..
4. Suprotno pretpostavkama, vrste gljiva iz porodice Botryosphaeriaceae na smokvi u Hrvatskoj imaju znatno veću zastupljenost od vrsta iz porodice Diaporthaceae.
5. Identificiranim vrstama gljiva iz porodica Botryosphaeriaceae i Diaporthaceae iz ovog istraživanja potrebno je utvrditi stupanj patogenosti na smokvi, s posebnim naglaskom na vrste *N. parvum* i *S. viticola* koje bi potencijalno mogle biti značajni patogeni smokve.
6. Potrebna su daljnja istraživanja bioraznolikosti, patogenosti i rasprostranjenosti vrsta gljiva povezanih s bolestima drva vinove loze kako bi se dobila jasnija slika svih uzroka bolesti drva smokve u Hrvatskoj.

6. LITERATURA

Abdollahzadeh J., Javadi A., Zare R., Phillips A.J.L. (2014). A phylogenetic study of *Dothiorella* and *Spencermartinsia* species associated with woody plants in Iran, New Zealand, Portugal and Spain.

Anonymous. (1960). Index of Plant Diseases in the United States. U.S.D.A. Agric. Handb. 165: 1-531. (94)Anonimno. (2016a). Uzgoj smokava, dostupno na < http://www.opcina-stariograd.hr/HTML/Uzgoj_smokve.html>, (pristupljeno 07.06.2016.).

Braun, U. (2012). The impacts of the discontinuation of dual nomenclature of pleomorphic fungi: the trivial facts, problems, and strategies. *IMA Fungus* 3 (1): 81-86.

Brzica, M., (2016). Mikoze, <<http://www.poljoprivreda.ba/preporucujemo/leksikon-mainmenu-143/2991-mikoze>>, (pristupljeno 07.06.2016.).

Çeliker N. M., Michailides T. J. (2012). First report of *Lasiodiplodia theobromae* causing canker and shoot blight to fig in Turkey, dostupno na: <http://www.ndrs.org.uk/article.php?id=025012#>, (pristupljeno: 19.07.2016.).

Crous, P.W (2005). Impact of molecular phylogenetics on the taxonomy and diagnostics of fungi. *OEPP/EPPO Bulletin* 35: 47-51.

Crous, P.W., Slippers, B., Wingfield, M.J., Rheeder, J., Marasas, W.F.O., Phillips, A.J.L., Alves, A., Burgess, T., Barber, P., Groenewald, J.Z. (2006). Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. *Studies in Mycology* 55: 235-253.

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

Cvjetković, B. (2010). Mikoze i pseudomikoze voćaka i vinove loze. *Zrinski d.d. Čakovec*. 290-294.

Gonzalez-Dominguez E., Alves A., Leon M., Armengol J. (2016). Characterization of Botryosphaeriaceae species associated with diseased loquat (*Eriobotrya japonica*) in Spain. *Plant Pathology*

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

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

Kirk, P.M., Cannon, P.F, Minter, D.W., Stalpers, J.A. (2008). *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*. 10th edition. UK: CABI Europe.

Lan, G. B., He, Z.F. (2012). First Report of Brown Spot Disease Caused by *Neoscytalidium dimidiatum* on *Hylocereus undatus* in Guangdong, Chinese Mainland, dostupno na: http://www.apsnet.org/publications/plantdisease /2012/November/ Pages/96_11_1702.2.aspx, (pristupljeno: 19.07.2016.).

Linaldeddu B. T., Deidda A., Scanu B., Franceschini A., Alves A., Abdollahzadeh J.,Phillips A. J. L. (2016). Phylogeny, morphology and pathogenicity of Botryosphaeriaceae, Diatrypaceae and Gnomoniaceae associated with branch diseases of hazelnut in Sardinia (Italy). *Plant Pathol.*

Liu, J.K., Phookamsak, R., Doilom, M., Wikkee, S., Li, Y.M., Ariyawansha, H., Boonmee, S., Chomnunti, P., Dai, D.Q., Bhat, J.D., Romero, A.I., Zhuang, W.Y., Monkai, J., Gareth, J.E.B., Chukeatirote, E., Ko Ko, T.W., Zhao, Y.C., Wang, Y., Hyde, K.D. (2012). Towards a natural classification of Botryosphaeriales. *Fungal Diversity* 57: 149-210.

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

Pavlic, D., Slippers, B., Coutinho, T. A., Wingfield, M. J. (2007). Botryosphaeriaceae occurring on native *Syzygium cordatum* in South Africa and their potential threat to *Eucalyptus*. *Plant Pathology*, 56 (4): 624-636.

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

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

Ray, J. D., Burge, T., Lanoiselet, V. M. (2010). First record of *Neoscytalidium dimidiatum* and *N. novaehollandiae* on *Mangifera indica* and *N. dimidiatum* on *Ficus carica* in Australia, dostupno na: <http://link.springer.com/article/10.1071%2FDN10018>, (pristupljeno: 29.07.2016.).

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

Rossmann, A.Y., Farr, D.F., Castlebury, L.A. (2007). A review of the phylogeny and biology of the Diaporthales. *Mycoscience* 48: 135-144.

Santos, J.M., Phillips, A.J.L. (2009). Resolving the complex of *Phomopsis* species and their Diaporthe teleomorphs on *Foeniculum vulgare*. *Fungal Diversity* 34: 111-125.

Santos, J.M., Correia, V.G, Phillips, A.J.L. (2010). Primers for mating-type diagnosis in Diaporthe and Phomopsis: their use in teleomorph induction in vitro and biological species definition. *Fungal Biology* 114: 255-270.

Santos, J.M., Vrandečić, K., Čosić, J., Duvnjak, T., Phillips, A.J.L. (2011). Resolving the Diaporthe species occurring on soybean in Croatia. *Persoonia* 27: 9-19.

Schoch, C., Shoemaker, R.A., Seifert, K.A., Hambleton, S., Spatafora, J.W., Crous, P.W. (2006). A multigene phylogeny of the Dothideomycetes using four nuclear loci. *Mycologia* 98: 1043-1054.

Shenoy, B.D., Jeewon, R., Hyde, K.D. (2007). Impact of DNA sequence-data on the taxonomy of anamorphic fungi. *Fungal Diversity* 26: 1-54.

Slippers, B., Crous, P.W., Coutinho, T.A., Wingfield, B.D., Wingfield, M.J. (2004a). Multiple gene sequences delimit *Botryosphaeria australis* sp. nov. from *B. lutea*. *Mycologia* 96: 8-101.

Slippers, B., Crous, P.W., Denman, S., Coutinho, T.A., Wingfield, B.D., Wingfield, M.J. (2004b). Combine multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. *Mycologia* 96: 83-101.

Slippers, B., Fourie, G., Crous, P.W., Coutinho, T.A., Wingfield, B.D., Wingfield, M.J. (2004c). Multiple gene sequences delimit *Botryosphaeria australis* sp. nov. from *B. lutea*. *Mycologia* 96: 1028-1039.

Slippers, B., Smit, W.A., Crous, P.W., Coutinho, T.A., Wingfield, B.D., Wingfield, M.J. (2007). Taxonomy, phylogeny and identification of *Botryosphaeriaceae* associated with pome and stone fruit trees in South Africa and other regions of the world. *Plant Pathology* 56 (1): 128-139.

Udayanga, D., Xingzhong, L., Crous, P.W., McKenzie, E.H.C., Chukeatirote, E., Hyde, K. D. (2012). A multi-locus phylogenetic evaluation of *Diaporthe* (*Phomopsis*). *Fungal Diversity* 56: 157-171.

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

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

Wayne M. Pitt, Ramón José, Úrbez-Torres, Florent P. T. (2014). *Dothiorella* and *Spencermartinsia*, new species and records from grapevines in Australia. *Australasian Plant Pathology Society*.

Vego D., Ostojić I., Rotim N. (2008). Smokva. *Agroklub*. <<http://www.agroklub.com/sortna-lista/voce/smokva-28/>>, (pristupljeno 07.06.2016.).

Zia Banihashemi i Ali Reza Javadi, (2009). *Phytopathol. Mediterr.*, Further in vestigations on the biology of *Phomopsis cinerascens*, the cause of fig canker in Iran, 48, 454–46, (pristupljeno: 19.07.2016.).