

Molekularna identifikacija gljiva izoliranih iz šipka (*Punica granatum* L.) sa simptomima citosporioznog sušenja

Ivandić, Marijela

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:204:048571>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



Molekularna identifikacija gljiva izoliranih iz šipka (*Punica granatum* L.) sa simptomima citosporioznog sušenja

DIPLOMSKI RAD

Marijela Ivandić

Zagreb, rujan, 2020.



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



Diplomski studij:

Fitomedicina

**Molekularna identifikacija gljiva izoliranih iz šipka
(*Punica granatum* L.) sa simptomima citosporioznog
sušenja**

DIPLOMSKI RAD

Marijela Ivandić

Mentor:

Doc.dr.sc. Joško Kaliterna

Zagreb, rujan, 2020.



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



IZJAVA STUDENTA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, Marijela Ivandić, JMBAG0178120267, rođen/a 08.05.1995. u Žepču, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

Molekularna identifikacija gljiva izoliranih iz šipka (*Punica granatum* L.) sa simptomima citosporioznog sušenja

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

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



IZVJEŠĆE O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta/ice Marijele Ivandić, JMBAG0178120267, naslova

Molekularna identifikacija gljiva izoliranih iz šipka (*Punica granatum* L.) sa simptomima
citosporioznog sušenja

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

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

Zahvala

Ovime zahvaljujem svojim roditeljima koji su mi omogućili ovo školovanje i bili potpora u svakom trenutku moga školovanja. Također, zahvaljujem sestri koja mi je pomagala pri pronalasku rješenja za organizaciju, lakše i brže učenje onda kada to ja nisam mogla ili znala i smirila me onda kada je bilo potrebno. Hvala vam na ohrabrenju, strpljenju, razumijevanju i velikoj pomoći jer bez vas ovo danas ne bih postigla.

Zahvaljujem prijateljima i kolegama koji su bili uz mene i imali riječi ohrabrenja i pomogli onda kada mi je pomoć bila potrebna, poštovali moje odluke i uputili na pravi put onda kada bih imala određene dvojbe.

Zahvale velike idu i djelatnicima Zavoda za fitopatologiju jer su me uvijek pri mom dolasku na zavod dočekali nasmijani i učinili mi taj dan u laboratoriju boljim i vedrijim i bili spremni pomoći i time mi olakšali rad na ovom istraživanju.

Veliko hvala i mom mentoru doc.dr.sc. Jošku Kaliterni koji me je uveo u mikološki svijet, laboratorijski rad i pomogao pri izradi diplomskog rada. Bila mi je čast raditi ovaj diplomski rad sa Vama i učiti od Vas. Hvala Vam na razumijevanju, strpljenju i velikoj pomoći tijekom izrade diplomskog rada jer je uz Vas ovaj rad pretvoren u djelo.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Pregled literature.....	3
2.1. Bolesti drva šipka uzrokovane fitopatogenim gljivama	3
2.2. Fitopatogene gljive iz roda <i>Cytospora</i>	3
2.2.1. <i>Cytospora</i> granati na šipku	4
2.2.2. <i>Cytospora</i> <i>punicae</i> na šipku.....	6
3. Cilj i hipoteza	10
4. Materijali i metode	11
4.1. Uzorkovanje drva šipka	11
4.2. Izolacija gljiva i dobivanje čistih kultura izolata	11
4.3. Analiza morfoloških obilježja izolata grupe 1 i 2 (<i>Cytospora</i> spp.)	14
4.4. Molekularna identifikacija izolata grupe 1 i 2	15
4.5. Izolacija ukupne genomske DNA izolata gljiva	15
4.6. Umnažanje odsječaka ITS metodom lančane reakcije polimerazom	16
4.7. Horizontalna gel elektroforeza	17
4.8. Sekvenciranje PCR produkata	17
4.9. BLAST i filogenetska analiza.....	17
5. Rezultati i diskusija	19
5.1. Rezultati uzorkovanja drva šipka	19
5.2. Selekcija i provizorna identifikacija izolata prema morfološkim obilježjima kolonija i konidija na hranjivoj podlozi PDA.....	20
5.3. Molekularna identifikacija izolata grupe 1 i grupe 2	25
5.4. Filogenetska analiza ITS sekvenci izolata grupe 1 i grupe 2	25
6. Zaključak.....	27
7. Popis literature	28
8. Prilog	31
8.1. Tablica referentnih sekvenci preuzetih iz baze podataka GenBank	31
Životopis.....	38

Sažetak

Diplomskog rada studenta/ice Marijele Ivandić, naslova

Molekularna identifikacija gljiva izoliranih iz šipka (*Punica granatum* L.) sa simptomima citosporioznog sušenja

Šipak je u Hrvatskoj biljna vrsta koja je relativno slabo istražena. Podložan je napadu mnogih patogena, od toga u najvećem broju fitopatogenih gljivama. Tijekom 2019. godine u Dalmaciji je uočeno sušenje šipaka što je prema simptomima, uočenima u prethodnim istraživanjima, upućivalo na citosporiozno sušenje uzrokovano fitopatogenom vrstom *Cytospora punicae*. Iako se vrsta *Cytospora punicae* smatra patogenom slabosti ona može uzrokovati i ozbiljna oštećenja i propadanja cijele biljke. Izolirane gljive identificirane su provizorno prema morfološkim obilježjima kolonija i konidija na PDA. Reprezentativni izolati su dodatno istraženi analizom DNA sekvenci molekularnog markera ITS primjenom metode PCR. Dobivene ITS sekvence su uspoređene s odgovarajućim sekvencama izolata *C. punicae* iz baze podataka GenBank primjenom bioinformatičkog programa BLAST, a za filogenetsku analizu je korištena metoda Maximum Likelihood. Svi analizirani izolati iz ovog istraživanja su identificirani kao vrsta *C. punicae*.

Ključne riječi: šipak, *Cytospora punicae*, citosporiozno sušenje, gljive

Summary

Of the master's thesis— student Marijela Ivandić, entitled

The molecular identification of fungi isolated from Pomegranate (*Punica granatum* L.) with symptoms cytosporic drying

In Croatia, pomegranate is a plant species that is relatively poorly researched. It is susceptible to attack by many pathogens, of which in the largest number of phytopathogenic fungi. During 2019, drying of pomegranates was observed in Dalmatia, which according to the symptoms, observed in previous studies, indicated cytosporic drying caused by the phytopathogenic species *Cytospora punicae*. Although *Cytospora punicae* is considered a pathogen of weakness, it can also cause severe damage and decay of entire plants. Isolated fungi of identification are provisional according to the morphological characteristics of colonies and conidia on PDA. Representative isolates were further investigated by DNA sequence analysis of the ITS molecular marker using PCR methods. The obtained ITS sequences were compared with the corresponding sequences of *C. punicae* isolates from the GenBank data base using the BLAST bioinformatics program and the Maximum Likelihood method was used for phylogenetic analysis. All analyzed isolates from this study were identified as *C. punicae* species.

Keywords: pomegranate, *Cytospora punicae*, cytosporic drying, fungi

1. Uvod

Šipak (*Punica granatum* L.) je višegodišnja voćna vrsta koja je poznata još od davnina. Osim naziva šipak postoje još dva sinonima: nar i mogranj. Šipak pripada porodici mogranja (*Punicaceae*) i podrazredu *Rosidae*. Podrijetlom šipka smatra se šire područje od Irana do sjevernog dijela Indije (Stover i Mercure 2007.). Glede klimatskih uvjeta šipku najviše odgovara mediteranska klima s toplim ljetima, gdje su se šipci prilagodili uvjetima suše (Celik i Ercisli 2009., preuzeto iz Gadže 2013.) i hladnim zimama. Budući da može izdržati i visoke temperature, i do 48°C, moguć je uzgoj i u tropskim i suptropskim područjima (Jain i Desai, 2018.). Zrela starija stabla u fazi mirovanja dobro podnose mraz i niske temperature, dok su mlada stabla, do 3 godine starosti, osjetljiva na niske temperature. Na tim mladim stablima oštećenja mogu nastati pri temperaturama nižima od -11°C (Morton 1987.). Može rasti u različitim tipovima tla, a najviše mu odgovaraju duboka ilovasta ili aluvijalna tla bogata humusom i velike propusnosti. Osim neutralnih tala (pH 5,5-7,0) dobro podnosi i alkalna tla (do pH 7,5). Zahtijeva 500 do 800 mm padalina godišnje za dobar rast. Osim oborina, važno je i redovito i optimalno navodnjavanje. Kao najbolje se pokazalo navodnjavanje po principu „kap po kap“ (Jain i Desai 2018.). Pogodna područja za uzgoj šipka jesu mediteransko područje, gdje pripada i Hrvatska, nekoliko država Sjeverne i Južne Amerike, te jug Azije (Stover i Mercure 2007.). U Hrvatskoj se šipak uzgaja duž obale, najviše u dolini rijeke Neretve i oko Dubrovnika, većina kao zasebna stabla, dok je komercijalnih nasada mali broj (Šakić-Bobić, 2016.). Šipak se tradicionalno konzumira kao svježe voće ili u obliku prerađenog soka. Obzirom na potrebe uzgoja, šipak je skromna biljka, a daje velike prinose, no u Hrvatskoj je sama proizvodnja mala i prodaja se uglavnom odnosi na lokalne tržnice ili supermarkete (Gadže 2013.). Najveći proizvođači šipka u svijetu su Indija, Kina, Iran, Turska i SAD, koji čine 76% ukupne svjetske proizvodnje dok su Španjolska, Egipat i Izrael vodeće zemlje izvoza šipka (Jain i Desai 2018.). Iran se smatra jednim od najvećih izvoznika šipka u svijetu s više od 150 000 tona izvezenog šipka te se taj broj iz godine u godinu povećava (Gadže 2013.). Španjolska je najveći europski izvoznik šipka, ali i najveći europski proizvođač s 50.000 tona, od čega je većina sorata sa zaštićenim nazivom podrijetla, Mollar de Elche. Ujedno je i najveći europski dobavljač šipka (CBI, 2019.). U svijetu postoji preko 500 različitih sorti šipka, a od toga je oko 50 kultiviranih (IPGRI, 2001.).

Šipak je podložan napadu raznih štetnika i uzročnika bolesti. Uzročnici većine bolesti šipka su fitopatogene gljive, ali i bakterije te virusi. U zemljama koje imaju veliku proizvodnju šipka veliki problem može predstavljati bakterijska palež, koju uzrokuje bakterija *Xanthomonas axonopodis* pv. *punicae*, zasad jedina poznata i glavna bakterioza na šipku (Bozkurt i sur. 2014.). U Indiji, kao najvećem proizvođaču šipka na svijetu, bakterijska palež smanjuje proizvodnju do 80% kako domaću, tako i izvoznu (Poovarasan i sur. 2013.). Virus koji najviše šteti šipku su CLRV, AMV, ArMV, CMV, TRSV i ToRSV, prema Bichcheri i sur. (2015.) i mogu utjecati na proizvodnju. Međutim, većinu značajnijih bolesti na šipku uzrokuju fitopatogene gljive. Glavni uzročnici gljivičnih bolesti na šipku su: *Botrytis cinerea*, *Alternaria*

alternata, *Coniella granati*, *Penicillium implicatum* i *Aspergillus niger* (Munhuweyi i sur. 2016.). Gljivične bolesti se mogu podijeliti na bolesti lista i ploda te bolesti drva, koje su dobile na važnosti u novije vrijeme. Prema istraživanju provedenom u Španjolskoj 2005. i 2006. godine Palou i sur. (2013.) su utvrdili da su najznačajnija gljivična oboljenja uzrokovana gljivama *Botrytis cinerea* i *Penicillium* spp. Osim glavnih uzročnika, izolirani su i drugi patogeni koji su se povremeno javljali. Među njima se našao i patogen koji je ujedno i tema ovoga diplomskog rada, *Cytospora punicae*, uzrokujući rak rane ili propadanje stabala. Na temelju uočenih simptoma sušenja i propadanja stabala šipka u Dalmaciji 2019. godine, odlučeno je provesti identifikaciju gljiva prisutnih u drvu simptomatskih biljaka, s naglaskom na identifikaciju gljiva s *Cytospora* sp. fenotipom. Precizna identifikacija jedan je od nužnih koraka u točnom utvrđivanju uzročnika biljnih bolesti, odnosno za proučavanje njihove biologije i interakcije s biljkom domaćinom, kao i razvoju mjera njihova suzbijanja. Međutim, identifikacija na temelju fenotipa nije potpuno precizna zbog variranja morfologije gljiva u ovisnosti o promjenjivim vanjskim čimbenicima, stoga se za potpunu identifikaciju koristi molekularna identifikacija na bazi molekularnih DNA markera.

2. Pregled literature

2.1. Bolesti drva šipka uzrokovane fitopatogenim gljivama

Prema Munhuweyi i sur. (2016.) uzročnicima najvažnijih gljivičnih bolesti šipka smatraju se *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium* spp., *Ceratocystis fimbriata*, *Coniella granati* i *Colletotrichum gloesporoides*. Simptomatski su ti uzročnici uglavnom vezani za sam plod šipka i mogu uzrokovati njegovo direktno propadanje, kako u voćnjaku, tako i prilikom transporta i skladištenja (Snowdon 2010.). Među uzročnicima bolesti drva šipka spominju se vrste gljiva iz rodova *Ceratocystis* i *Cytospora*. Bolesti drva su posljedica kolonizacije i začepljenja provodnih snopova u drvu, a zbog čega se te bolesti još nazivaju traheomikoze, pa mogu indirektno štetno utjecati na plod šipka i prinos same biljke. Direktna šteta utjecaj bolesti drva proizlazi iz sušenja pojedinih grana, dijela ili cijeloga stabla pa je šteta za proizvođača u konačnici znatno veća. Kao najznačajniji uzročnici bolesti drva šipka navode se vrste gljiva iz roda *Cytospora* (Munhuwei i sur. 2016., Palou i sur. 2013.).

2.2. Fitopatogene gljive iz roda *Cytospora*

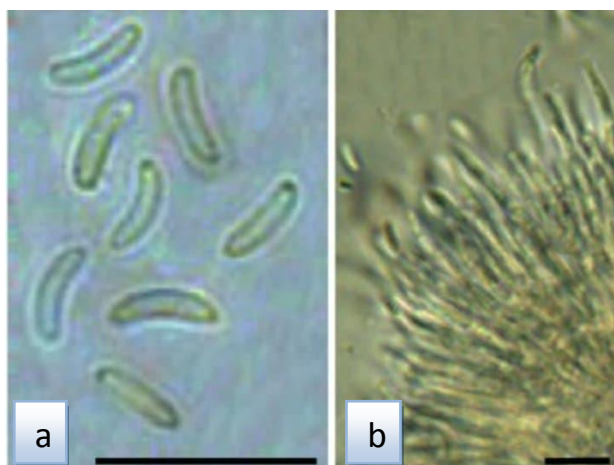
Rod *Cytospora* (Sordariomycetes, Diaporthales, Cytosporaceae) je osnovao Ehrenberg 1818. godine s četiri pripadajuće vrste u rodu. Često se koriste sinonimi za ovaj rod poput *Valsa* i *Leucostoma*. Prema Wingfield i sur. (2012.) nazivi gljiva su godinama činili probleme pri identifikaciji i određivanju taksonomske pripadnosti te su odlučili radi lakšeg nazivlja prednost dati starijem nazivu. Među prvima koji su to počeli koristiti bili su autori Fan i sur. (2014a, 2014b) i mnogi drugi po uzoru na njih upotrebljavaju naziv anamorfnog stadija *Cytospora* umjesto teleomornog stadija *Valsa* (Adams i sur. 2005.). Vrste iz roda *Cytospora* se javljaju kao endofiti, saprofiti ili fitopatogeni. Prema Adams i sur. (2005.) one mogu kod asimptomatskih domaćina biti prisutne kao endofiti ili latentni patogeni. Od posebnog značaja su fitopatogene vrste jer uzrokuju bolesti drva biljaka koje se često očituju u vidu rana kao simptoma (Fan i sur. 2019.). Poznato je preko 85 drvenastih biljaka koje su domaćini fitopatogenim gljivama iz roda *Cytospora* (Adams i sur. 2006.). Osim drvenastih biljaka domaćini mogu biti i četinjače i listopadne vrste. Kod voćnih vrsta poput jabuke, breskve, trešnje ili šljive, mogu prouzrokovati značajne ekonomske štete unutar nasada (Adams i sur. 2005.). Većina patogena, tako i *Cytospora* spp., uglavnom ne napadaju zdrave, neoštećene biljke. One biljke koje su izložene nekom okolišnom stresu (vodni stres, suša, smrzavanje i dr.) su podložnije napadu patogena jer im je olakšan ulazak u biljku (Schoeneweiss, 1981a, 1981b). Kao ključan i odlučujući čimbenik za pojavu citosporioznog sušenja pokazala se suša, što je Schoeneweiss (1983.) dokazao u svome eksperimentu. Ovisno o vrsti domaćina i stadiju bolesti simptomi mogu biti različiti. Uglavnom su simptomi

vidljivi na najnižim granama starijih stabala. Prepoznatljivi simptomi su žućenje i venuće listova, pucanje kore, nekroza drva, narušena ili prekinuta provodnost putem ksilema, što uzrokuje sušenje i odumiranje grana. Neke vrste su dominantne u ksilemu, dok se druge u lišću. (Adams i sur. 2005.). Prema Internet bazi *Index Fungorum* (www.IndexFungorum.org) opisano je oko 612 vrsta iz ovog roda, dok je oko 110 prihvaćenih vrsta roda *Cytospora*. Vrsta *C. chrysosperma* uzrokuje bolesti na preko 260 biljnih vrsta, dok su na šipku značajne dvije vrste *C. granati* i *C. punicae* (Lawrence i sur. 2018.).

U prirodi je pojava nespolnog stadija češća od pojave spolnog stadija. U nespolnom stadiju se formiraju piknidi u stromama (piknostrome). U piknidima se razvijaju alantoidne prozirne konidije, u obliku „kobasice“, odnosno cilindrične, blago zakrivljene s više ili manje zaobljenim krajevima (Grove 1923.), koje izlučuju konidije na površinu preko otvora ostiola. Širenje konidija, tj. infektivnog inokuluma, u prirodi se odvija pomoću konidija koje su preko kišnih kapi nošene vjetrom. Preduvjet za infekciju biljke jest pukotina ili rana na kori koja je nastala na kori pri rezidbi, ožiljak na listu, ozljeda nastala od kukaca, ozljeda pupa, grančice ili grane oštećenih zbog hladnoće. Kada se konidija nađe u takvim odgovarajućim uvjetima počinje klijati i tako započinje zarazu (Lawrence i sur. 2018.). Za identifikaciju vrste na temelju fenotipskih svojstava gljive koriste se primarno morfološke karakteristike anamorfa (nespolni stadij), budući da se teleomorfi rijetko javljaju i imaju ograničenu ulogu u identifikaciji (Adams i sur. 2005.).

2.2.1. *Cytospora granati* na šipku

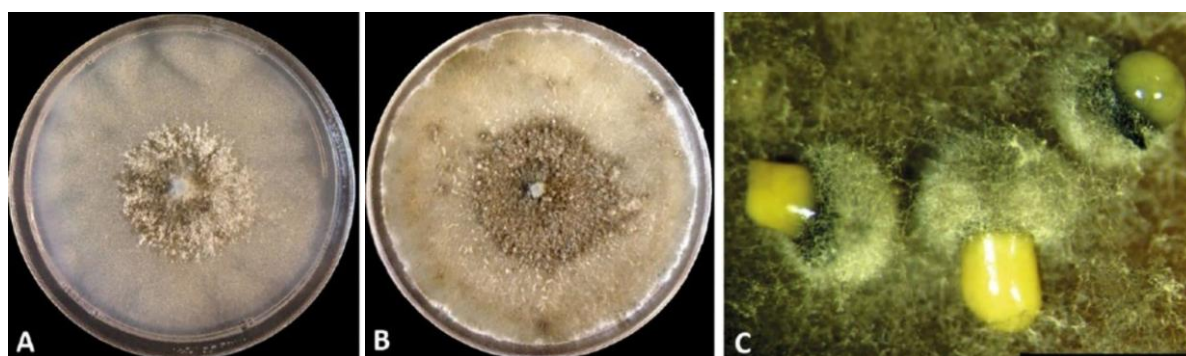
Ova vrsta je dobila ime prema domaćinu, šipku, na kojem je prvi put pronađena, pripada rodu *Cytospora*, zajedno s drugim vrstama koje uzrokuju rak rane i sušenje biljaka. Vrsta *Cytospora granati*, kao i *Cytospora punicae*, povezana je s citosporioznim sušenjem šipka. Otkrivena je 2018. godine u Kaliforniji, SAD, izolacijom iz šipka s vidljivim simptomima zaraze, tj. iz rak rana. Na hranjivoj podlozi PDA (engl. potato dextrose agar – krumpir dekstrozni agar) gljiva formira konidiomate, nespolna plodna tijela. Konidiomate su piknidijalne, većinom solitarne, ali mogu se pojaviti i u skupinama. Okruglasta, stožasta do diskoidalna su oblika, bijele do svijetlosive boje sa žutim konidijskim eksudatom. Konidije su jednostanične, prozirne do svijetlosmeđe boje i alantoidne, dok su konidiofori reducirani na filamentozne konidiogene stanice (slika 2.2.1.1.). Izoliran je samo nespolni stadij, anamorf, dok spolni stadij, teleomorf, nije primijećen (Lawrence i sur. 2018.).



Slika 2.2.1.1. Konidije (a) i konidiofori (b) vrste *C. granati*

Izvor: 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
<https://link.springer.com/article/10.5598/imafungus.2018.09.02.07> - pristup 13.06.2020.

Nakon 7 dana pri temperaturi 25°C kolonija gljive na hranjivoj podlozi PDA, će dosegnuti promjer od 87,3 mm pa se zbog toga smatra brzorastućom gljivom (slika 2.2.1.2.) Iako su na šipku pronađene dvije patogene vrste iz istog roda *C. granati* i *C. punicae* one se lako mogu razlikovati. Razlikuju se u veličini piknida, koji su kod *C. granati* promjera (610-) 673-897 (-975) μm , što je u prosjeku gotovo dvostruko veće od promjera piknida *C. punicae* (210-) 237-383 (-490) μm ; brzini rasta kolonija, kolonije *C. granati* (87,3 mm u 7 d) imaju znatno brži rast od kolonija *C. punicae* (64,7 mm u 7 d); boji i samoj morfologiji kolonija, kolonije *C. granati* su bijele do žućkaste boje, a kolonije *C. punicae* su karakteristične tamnocrvene boje.



Slika 2.2.1.2. Kolonija vrste *C. granati* na hranjivoj podlozi PDA nakon 7 dana (A), 14 dana (B), piknidi (C)

Izvor: 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
<https://link.springer.com/article/10.5598/imafungus.2018.09.02.07> - pristup 13.06.2020.

2.2.2. *Cytospora punicae* na šipku

Kao uzročnik truleži u Grčkoj navode se fitopatogene gljive iz 8 rodova, među kojima se nalazi i rod *Cytospora*, točnije vrsta *Cytospora punicae*, čija je pojava tijekom 2013. godine iznosila 5,1% od ukupno 433 izoliranih izolata (Kanetis i sur. 2015.). *Cytospora punicae* je opisana kao patogen stabljike, grančica i grana na šipku uzrokujući rak (Paloui sur. 2017.).

U proljeće 2011. godine na području sjeverne Grčke primijećeni su simptomi apopleksije šipka, koji su bili povezani s truleži korijenova vrata. Nakon izolacije sa simptomatičnih stabala identificiran je uzročnik, *C. punicae*, što je ujedno i prva pojava te vrste u Grčkoj (Palavouzis i sur. 2015.).

Povezanost sušenja šipka s ovom vrstom bilježe Peduto Hand i sur. (2014.) nakon velikog oštećenja nasada šipka u Kaliforniji (SAD) tijekom 2012. godine u vidu odumiranja grana šipka sorte „Wonderful“. Osim odumiranja primijećeni su simptomi žućenja listova, lezija na drvetu i rak rane.

U Cipru, 2013. godine na sorti šipka „Ermioni“ uočene su znatne deformacije na deblu dvogodišnjih stabala. Na oko 30% stabala primijećena je pojava uleknutih rak rana duljine i do 30 cm. Na mjestima gdje se javila rak rana kora je bila raspuknuta, a tkivo ispod kore je bilo crvenkasto smeđe boje. Međutim, na granama nije bilo formiranja rak rana. Osim pojave rak rana na kori, listovi su žutjeli, dok je u nekoliko slučajeva došlo do propadanja cijelog stabla. Provedbom istraživanja i ispunjavanja Kochovih postulata utvrđena je vrsta *C. punicae* kao uzročnik pojave rak rana na deblu šipka (Samouel i Kanetis 2016.).

Tijekom ljetnih mjeseci 2014. godine u Tunisu je primijećeno oboljenje šipka, čiji je postotak infekcije iznosio 8%, na sorti „Gabsi“ u vidu odumiranja grana, žućenja listova, lezija na drvetu i formiranja rak rana; što je ukazivalo na pojavu citosporioznog sušenja, što su i dokazali nakon izolacije i sekvenciranja, uzrokovanog od *C. punicae*. To je ujedno i prva pojava rak rana na stablu i odumiranje grana čiji je uzročnik *C. punicae* (Triki i sur. 2015.).

U Iranu, jednom od najvećih proizvođača šipka u svijetu, točnije u zapadnom dijelu države, tijekom 2015. godine su primijećena znatna odumiranja grana šipka na sorti „Atabaki“ na oko 30% stabala u svakom nasadu šipka. Kao simptomi bolesti, osim odumiranja grana, javilo se žućenje listova i pojava rak rana. Na kori, gdje se javila rak rana, uočeno je pucanje (omogućen ulaz i drugim patogenima u biljku i predstavlja dodatno oštećenje biljke), a tkivo ispod kore je promijenilo boju iz svijetle u tamno smeđu (Mahdikhani i Davoodi, 2017.).

U Južnoafričkoj Republici se šipak uzgaja zadnjih 20-ak godina, te je relativno nova voćna proizvodnja na tom području. Glavni problem nakon berbe pri skladištenju predstavlja trulež plodova. Na kori ploda su se javile žute lezije koje su prodirale do unutrašnjosti ploda

formirajući žuto plutasto tkivo i crne plodne strukture na kori ploda (slika 2.2.2.1.). Prema istraživanju Venter i sur. (2016.) sa simptomatičnih plodova šipka sorte „Herskovitz“ su uzeli uzorke za analizu. Na temelju morfoloških i morfometrijskih karakteristika izoliranog patogena identificirali su kao *C. punicae*. Iako je *C. punicae* identificirana kao uzročnik odumiranja grana i formiranja rak rana na deblu, ovo je prva pojava ove vrste na plodu. Autori ukazuju na moguće posljedice pri pojavi skladišnih bolesti šipka, kako u JAR-u tako i u drugim državama gdje je otkrivena prisutnost vrste *C. punicae*.



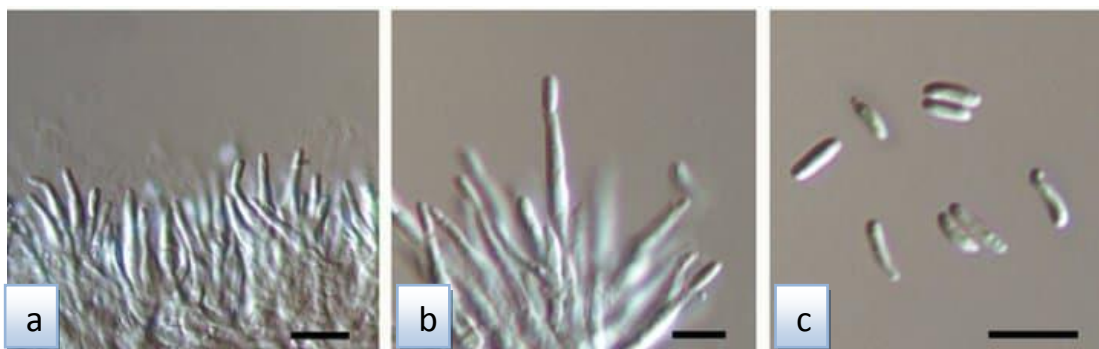
Slika 2.2.2.1. Piknidi na kori šipka 14 dana nakon inokulacije

Izvor: First Report of *Cytospora punicae* causing post-harvest fruit rot on pomegranate in South Africa

<https://doi.org/10.1094/PDIS-08-16-1157-PDN> pristup 23.06.2020.

Nadalje, u 2016. godini u Italiji su primijećeni simptomi truleži na plodovima šipka, sa oko 5%-tnom pojavom, na sorti „Wonderful“ na lokalnim tržnicama. Simptomi su se ogledali u obliku okruglih kremasto smeđih lezija sa tamnijim središtem i smekšavanju tkiva. Nakon izolacije uzročnika utvrđeno je da se radi o vrsti *C. punicae*, prema njenim morfološkim karakteristikama, što se dodatno potvrdilo nakon sekvenciranja odsječka DNA, sa podudarnosti od 100% sa sekvencama *C. punicae* iz GenBank-a (Mincuzzi i sur. 2017.).

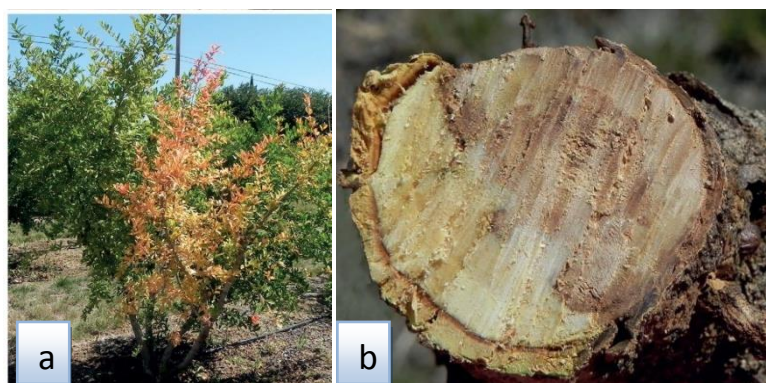
Prema istraživanju provedenom između 2010. i 2017. godine u Kaliforniji Lawrence i sur. (2018.) među izoliranim *Cytospora* vrstama izolirana je i vrsta *C. punicae* kao uzročnik sušenja i propadanja šipka. Vrsti *C. punicae*, prema filogenetskoj analizi iz ovog istraživanja, najsrodnija je vrsta *Cytospora myrtagena* (slika 2.2.2.2.). Na istim simptomatičnim stablima je pronađena i ranije opisana vrsta *C. granati*. Iako su slične, lako se mogu morfološki razlikovati, što je opisano u prethodnom poglavlju (str. 5).



Slika 2.2.2.2. Prikaz konidiofora (a,b) i konidija (c) vrste *Cytospora myrtagena* izoliranih iz kineskog kestena (*Castanea mollissima*)

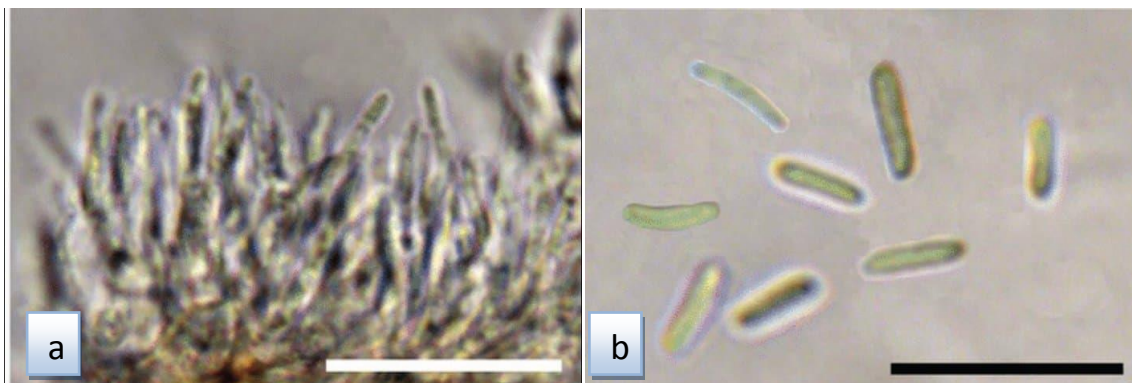
Izvor: Identification of six *Cytospora* species on Chinese chesnut in China
<https://doi.org/10.3897/mycokeys.62.47425> - pristup: 23.06.2020.

Sa simptomatičnih stabala šipka (slika 2.2.2.3.) izolirana je *C. punicae* koja je formirala u skupinama konidiomate (piknostrome) (slika 2.2.2.5.c), okruglog do jajolikog oblika, bez konceptakula, crno sive boje s bijelim površinskim hifama, te s više unutarnjih lokula sa podijeljenim uvučenim stijenkama. Konidiofori (slika 2.2.2.4.a) su pojedinačni s ravnim filamentoznim konidiogenim stanicama. Konidije (slika 2.2.2.4.b) su pojedinačne, obilne su tj. nastaju u velikom broju, prozirne do svijetlosmeđe boje, alantoidne su i bez septi, dimenzija (3,5-) 3,8-4,6 (-5,0) x (0,5-) 0,8-1,0 (-1,0) μm . Autori bilježe kako spolni stadij nije primijećen (Lawrence i sur. 2018.).



Slika 2.2.2.3. Simptomi sušenja stabla šipka (a) i promjena boje u unutrašnjosti drva (b)

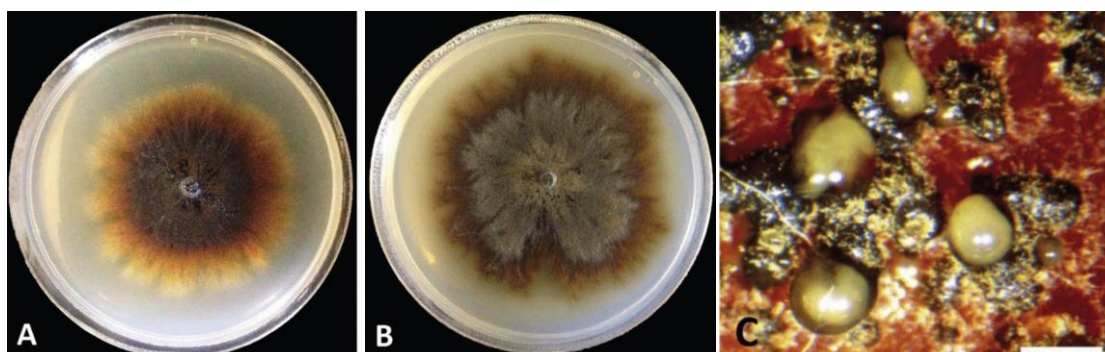
Izvor: Izvor: Molecular phylogeny of *Cytospora* species associated with canker diseases of fruit and nut crops in California, with the descriptions of ten new species and one new combination
<https://link.springer.com/article/10.5598/imafungus.2018.09.02.07> - pristup: 23.06.2020.



Slika 2.2.2.4. Prikaz konidiofora (a) i konidija (b) vrste *C. punicae*

Izvor: Izvor: 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
<https://link.springer.com/article/10.5598/imafungus.2018.09.02.07> - pristup: 23.06.2020.

Kolonije gljiva uzgojene na hranjivoj podlozi PDA postižu promjer od 64,7 mm nakon 7 dana na 25 °C. Takva kolonija uzgojena na hranjivoj podlozi PDA ima tamnocrvenu boju koja s vremenom postaje svjetlija (slika 2.2.2.5.). Hife gljive su glatke, ravne, prozirne, razgranate i septirane. Prema brzini rasta *C. punicae* pripada skupini srednje rastućih gljiva.



Slika 2.2.2.5. Kolonija vrste *C. punicae* na hranjivoj podlozi PDA nakon 7 dana (A) i 14 dana (B); piknostrome (C)

Izvor: 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
<https://link.springer.com/article/10.5598/imafungus.2018.09.02.07> - pristup: 23.06.2020.

3. Cilj i hipoteza

Budući šipak nije dovoljno istražena biljna vrsta u Republici Hrvatskoj, a od potencijalno je većeg gospodarskog značaja, poznavanje fitopatološkog statusa ovih biljaka je od velike važnosti. Tijekom 2019. godine, na području Dalmacije uočene su biljke šipka sa simptomima citosporioznog sušenja, stoga je cilj ovog istraživanja uzorkovati drvo simptomatskih biljaka, iz tih uzoraka izolirati gljive i provizorno ih morfološki identificirati te u konačnici reprezentativne izolate s *Cytospora* spp. fenotipom točno identificirati do razine vrste kombinacijom molekularnih i bioinformatičkih metoda.

Hipoteze su da su u biljkama sa simptomima citosporioznog sušenja prisutne gljive iz roda *Cytospora* i to vjerojatno vrsta *Cytospora punicae*.

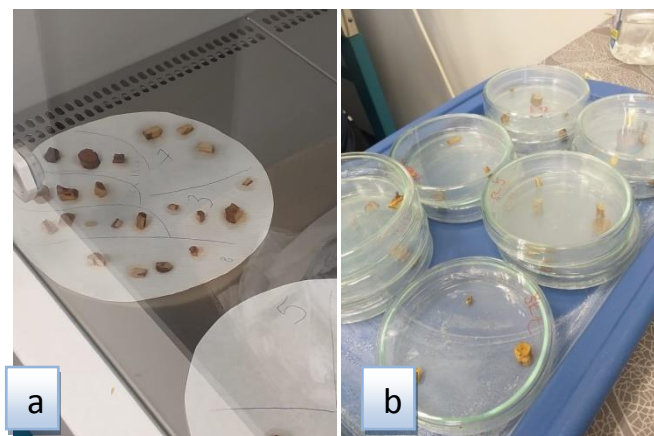
4. Materijali i metode

4.1. Uzorkovanje drva šipka

Na području Dalmacije tijekom 2019. godine sakupljeni su uzorci drva šipka sa simptomima citosporioznog sušenja. Za rezidbu uzoraka, odnosno izboja i grana, korištene su etanolom sterilizirane škare. Uzorci su označeni, spakirani i otpremljeni u što kraćem roku u laboratorije Zavoda za fitopatologiju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu gdje su se provodile daljnje etape ovog istraživanja od same izolacije gljiva do očitavanja rezultata sekvenci reprezentativnih izolata.

4.2. Izolacija gljiva i dobivanje čistih kultura izolata

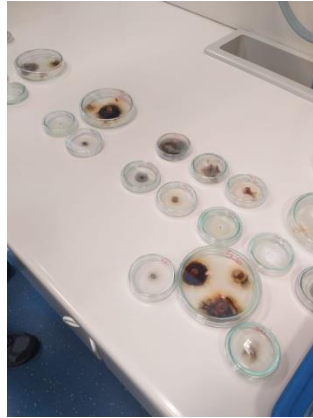
Sa uzorkovanih izboja i grana šipka sterilnim su škarama odrezani mali fragmenti drva s granice zdravog i zaraženog dijela izboja. Fragmentima je sterilnim nožićem uklonjena kora. Nakon toga su isprani pod mlazom vode. Iz uzoraka sa svakog lokaliteta uzeto je nekoliko fragmenata istog drva, koji su podvrgnuti površinskoj sterilizaciji. Površinska sterilizacija podrazumijevala je uklanjanje saprofita koji se mogu naći na površini biljnog materijala i predstavljaju zapreku, odnosno otežavaju daljnju analizu izolata. Sam postupak obuhvaća uranjanje fragmenata drva u 70%-tni etanol u trajanju od 30 sekundi, nakon čega se fragmenti uranjaju, a pri tome i steriliziraju, u 3%-tnoj otopini natrijeva hipoklorita (NaOCl) u trajanju od 15 sekundi. Nakon sterilizacije slijedilo je ispiranje fragmenata u sterilnoj destiliranoj vodi, a uzorci se ostavljaju na sušenje kroz 10-ak minuta na sterilnom filter papiru u sterilnoj komori, tzv. „laminaru“ (VBH Compact, Steril, Italija). Nakon sušenja (slika 4.2.1.a) pomoću sterilne pincete se fragmenti drva se postavljaju na Petrijeve zdjelice sa prethodno pripremljenom hranjivom podlogom (slika 4.2.1.b). Svaki izolat označen je jedinstvenom oznakom.



Slika 4.2.1. Sušenje fragmenata drva na filter papiru u sterilnoj komori (a), postavljane fragmenata drva na hranjivu podlogu PDA (b)

Izvor: foto M. Ivandić, slikano 27.09.2019.

Hranjivoj podlozi PDA, pripremljenoj na Zavodu za fitopatologiju agronomskog fakulteta u Zagrebu, dodan je antibiotik streptomycin-sulfat (Krka d.o.o., Slovenija) u koncentraciji 50 $\mu\text{g/mL}$ hranjivog medija. Hranjiva podloga PDA se čuva na +4 °C do upotrebe, kada se zagrijava u mikrovalnoj pećnici i u laminaru izlije u autoklavirane Petrijeve zdjelice u tankom sloju. Petrijeve zdjelice su kultivirane u inkubatoru bez svjetlosti na temperaturi od 25 °C. Nakon pojave mladih kolonija gljiva, presađene su u nove Petrijeve zdjelice u sterilnim uvjetima u sterilnoj komori odvajanjem dijela hranjive podloge s vrhovima hifama gljiva (slika 4.2.2.), tzv. monohifalnom metodom, kako bi se u konačnici dobile čiste kulture gljiva. Tako dobiveni, monohifalni izolati gljiva su dobili jedinstvenu oznaku, s korijenom matične oznake od koje potječu. Presađivanje pojedinih izolata se obavljalo više puta kako bi se osiguralo da se dobila čista kultura koja bi se dalje mogla koristiti u analizi. Izolati koji su sporulirali tijekom kultivacije na hranjivoj podlozi, korišteni su za dobivanje čistih kultura izolata iz samih spora, tzv. monospornom metodom, čime su dobivene monosporene čiste kulture izolata. Pod binokularom su sa plodnih tijela koja su sporulirala, pomoću sterilne eze, navlažene sterilnom vodom zbog lakše adhezije, konidije prenesene u novu Petrijevu zdjelicu i inkubirane kako je ranije opisano.



Slika 4.2.2. Matični izolati i njihove presađene kolonije

Izvor: foto M. Ivandić, slikano 4.10.2019.

Pojedini izolati su promatrani pod svjetlosnim mikroskopom kako bi se utvrdio izgled spora i mogla dati pretpostavka o kojem se patogenu radi (slika 4.2.3.). Izolati su proizvoljno razvrstani prema fenotipskim obilježjima (izgled kolonija, karakteristike spora, itd.) te su načinjene grupe iz kojih su izdvojeni reprezentativni izolati koji su bili previđeni za daljnju analizu molekularnim metodama (slika 4.2.4.).



Slika 4.2.3. Binokular (lijevo), promatranje izolata pod binokularom (desno)

Izvor: foto M. Ivandić, slikano 11.10.2019.



Slika 4.2.4. Grupiranje izolata
Izvor: foto M. Ivandić, slikano 24.10.2019.

Izolati koji su imali obilježja roda *Cytospora* svrstani su prema obilježjima kolonija na hranjivoj podlozi PDA u dvije grupe- grupa 1 i grupa 2. Tijekom izolacije izolirane su i druge gljive koje nisu imale obilježja roda *Cytospora*, no nisu dalje analizirane u ovom istraživanju.

Svi izolati dobiveni u ovom istraživanju pohranjeni su u zbirku Zavoda za fitopatologiju, na tzv. „kosom agaru“ (slika 4.2.5.).



Slika 4.2.5. Zbirka izolata na kosom agaru
Izvor: foto M. Ivandić, slikano 19.11.2019.

4.3. Analiza morfoloških obilježja izolata grupe 1 i 2 (*Cytospora* spp.)

Analiza fenotipskih obilježja izolata iz obje grupe je uključivala izgled kolonija na hranjivoj podlozi PDA.

Kolonije gljiva iz obje grupe (1 i 2) kultivirane su na hranjivoj podlozi PDA u inkubatoru pri temperaturi od 25 °C. Boja kolonija je promatrana s lica i naličja, oblik ruba kolonije golim okom, dok su pod binokularom promatrana plodna tijela, a pod svjetlosnim mikroskopom izgled i oblik konidija. Tijekom istraživanja su u više navrata pregledavani izolati, što je zabilježeno u obliku fotografija.

4.4. Molekularna identifikacija izolata grupe 1 i 2

Kako bi se utvrdila točna taksonomska pripadnost izolata grupe 1 i 2 njihovi reprezentativni uzorci su podvrgnuti molekularnoj analizi. Za provedbu molekularne analize je potrebno izolirati ukupnu genomsku DNA reprezentativnih izolata, zatim provesti analizu odsječaka unutar nje. Odsječci DNA izolata služe kao molekularni markeri za identifikaciju gljiva. U ovom istraživanju je analiziran molekularni marker ITS (unutarnja prepisujuća razmaknica, engl. Internal transcribed spacer), za njihovo umnažanje 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.). Nakon umnažanja molekularnog markera ITS provedeno je njihovo sekvenciranje u firmi Macrogen Europe. Sve sekvence dobivene u ovom istraživanju uspoređene s odgovarajućim sekvencama iz GenBank-a pomoću bioinformatičkog alata BLAST. Nakon provedene usporedbe sekvenci određena je taksonomska pripadnost analiziranih izolata iz grupe 1 i 2. Dodatno, za analizirane izolate provedena je filogenetska analiza uz upotrebu metode Maximum Likelihood u okviru programskog paketa MEGA7.

4.5. 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. Za taj korak u istraživanju je korištena ista hranjiva podloga PDA, na koju se postavila folija s mikroporama. U laminaru se iz reprezentativnih uzoraka sa ruba mlade sa vrhovima hifa kolonije izrezalo 6 malih kvadratića zajedno sa dijelom hranjive podloge i prenesi, tj. presadi u novu Petrijevu zdjelicu promjera 9 cm na kojoj se nalaze hranjiva podloga i plastična folija. Kvadratići izolata su postavljeni u novu Petrijevu zdjelicu u obliku cvijeta (5 kvadratića okolo i 1 u sredini). Novi su izolati postavljeni u termostad na temperaturi od 25 °C kako bi započela inkubacija. Nakon 7 dana kada su miceliji gljive dosegle određenu veličinu (mjerilo za veličinu micelija je uzeta veličina kovanice kako bi se lakše mogao pratiti rast micelija gljiva i odrediti vrijeme za sljedeći korak). Kada se razvila dovoljna količina micelija, pomoću sterilne metalne lopatice micelij se sastrugao lagano i umetnuo u Eppendorf tubice (2mL). Po uzorku je korišteno 50-100 µg micelija. Nakon toga mladi micelij je pohranjen na -20 °C do njegove upotrebe. Mladi

micelij je prebačen u sterilni tarionik i dodan je tekući dušik kako bi se usitnio micelij pomoću sterilnog tučka, zatim je tako usitnjeni micelij prebačen u novu tubicu i dodano je 50 µg autoklaviranih staklenih kuglica (Sigma Aldrich, SAD) te su se tubice stavile na led. Taj postupak je ponovljen za svaki izolat. Svakoj tubici je u digestoru dodano po 250 µL fenola (Sigma Aldrich, SAD), 250 µL kloroforma (Kemika, Zagreb) i 0,5 mL pufera za lizu koji je dodatkom 100 m mol/dm³ NaCl, 10 m mol/dm³ Tris-HCl (pH 8,0), 1 m mol/dm³ EDTA, 2% Triton X-100, 1% SDS i 1% PVP (Sigma Aldrich, SAD) je prethodno pripremljen. Zatim su se tubice kratko vorteksirale, a nakon vorteksiranja su centrifugirane pri 13 500 okretaja/min kroz 25 min pri temperaturi od 4 °C. Nakon centrifugiranja je nastao supernatant s vodenom otopinom DNA i RNA (u količini 300-400 µL). Pomoću pipete odvojen je supernatant određenog volumena (različit za svaki izolat) koji je prenesen u novu Eppendorf tubicu (1,5 µL) u koju je dodan isti volumen hladnog izopropanola (-20 °C) (Kemika, Zagreb). Zatim slijedi centrifugiranje tubica pri 13 500 okretaja/min u trajanju od 10 min i pri temperaturi od 4 °C. Nakon centrifugiranja dobiven je talog na dnu tubica koji je u sebi sadržavao nukleinske kiseline. Kako bi se dobile nukleinske kiseline potrebno je odliti supernatant i isprati s 1 mL 70%-tnog etanola i ponovno centrifugirati pri 13 500 okretaja/min u trajanju od 10 min pri temperaturi od 4 °C. Supernatant je zatim uklonjen kako bi u tubici ostao samo talog u kojem su sadržane nukleinske kiseline potrebne za daljnju analizu. Talog se sušio u laminaru pomoću strujanja zraka kroz kratko vrijeme i dodano je 50 µL TE pufer (pH 8,0, Promega, Madison, SAD) koji je u sebi sadržao i 1 µL RNaze-A (50 µg/mL, Sigma Aldrich, SAD). Završni korak bila je inkubacija tubica na temperaturi od 55 °C u trajanju od 15 min (Santos i Phillips 2009., preuzeto iz Kaliterna 2013.).

4.6. Umnažanje odsječaka ITS metodom lančane reakcije polimerazom

Metodom lančane reakcije polimerazom (PCR) umnoženi su specifični odsječci DNA molekularnog markera ITS. Za njegovo umnažanje korištene su početnice ITS5 i ITS4.

Za umnažanje molekularnog markera ITS je korištena reakcijska smjesa koja je sadržavala 25 µL 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 min, zatim je provedeno 35 ciklusa umnažanja, koje se provelo u 3 koraka. Prvi korak je uključivao denaturaciju na temperaturi od 94 °C u trajanju od 30 sekundi, prilijevanje početnica u drugom koraku na 55 °C u trajanju od 30 sekundi, dok je treći 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 min (Marin 2016.).

4.7. 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 „GelRed“ (Olerup SSP, Švedska), konačne koncentracije gela 5-10 μ L/20 mL. Elektroforetski puferi korišteni za elektroforezu su 0,5%-tni TBE i 0,5%-tni TBA (Sigma Aldrich, SAD), a sama elektroforeza je provedena pri 75 V u trajanju od 30 min. Za molekularnu težinu DNA kao standardni marker je korišten „100bp Ladder“ (Ladder 100-1500 pb, Intron Biotechnology, Koreja). Zadnji korak bio je očitavanje rezultata, što se obavilo pod UV svjetlom uz upotrebu transiluminatora (Marin 2016.).

4.8. Sekvenciranje PCR produkata

Za utvrđivanje redoslijeda nukleotida umnoženih odsječaka DNA molekularnog markera ITS PCR produkti su poslani u biotehnološku kompaniju Macrogen Europe (Macrogen Europe Inc., Amsterdam, Nizozemska), gdje su pročišćeni i sekvencirani. Sekvenciranje molekularnog markera ITS je provedeno 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).

4.9. BLAST i filogenetska analiza

Pomoću programskog paketa MEGA 7 obrađene su dobivene sekvence molekularnog markera ITS izolata grupe 1 i 2, a naknadno se obavila i filogenetska analiza istih izolata. U programu MEGA 7 su sekvence DN A poravnate pomoću modula „Alignment explorer“, zatim su uređene u smjeru 5' prema 3' i pohranjene su u tekstualnu datoteku u FASTA formatu. Analiza sekvenci se provela usporedbom sekvenci molekularnog markera ITS s odgovarajućim sekvencama referentnih izolata koji su pohranjeni u međunarodnoj bazi podataka GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Za sljedeću usporedbu je upotrebljen alat BLAST (Basic Logical Alignment Search Tool) koji se nalazi na Internet stranici: <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 dotičnoj vrsti.

Za dodatnu potvrdu homologije sekvenci provedena je filogenetska analiza upotrebom metode Maximum Likelihood. Izrađeno je filogenetsko stablo bazirano na ITS sekvencama izolata grupe 1 i grupe 2 i odgovarajućih referentnih sekvenci koje su preuzete iz baze GenBank-a (prikaznih u prilogu, str 30). Pri izradi filogenetskog stabla korištena je

metoda Maximum Likelihood uređena prema sljedećim postavkama: „SubstitutionType“ = 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.). U modelu „Phylogeny“ programskog paketa MEGA 7 je vizualizirano filogenetsko stablo.

5. Rezultati i diskusija

5.1. Rezultati uzorkovanja drva šipka

Tijekom 2019. godine na području Dalmacije na 15 lokaliteta (tablica 5.1.1.) je prikupljen po barem 1 uzorak debla i grana zaraženog šipka po lokalitetu (slika 5.1.1.). Uzorkovana stabla su pronađena u urbanim i suburbanim sredinama gdje su se nalazili i kao ukrasna i voćna vrsta u okućnicama te na rubovima vinograda i polja. Na svim lokalitetim uzorkovan biljke pokazivale su jedan ili više simptoma citosporioznog sušenja. Simptomi su uključivali pucanje i odvajanje kore, pojavu rak rana na granama i deblu šipka, žućenje i otpadanje listova, a na presjeku debla ili grane uočava se promjena boje tkiva iz zdravog žućkastog, u zaraženo smeđe tkivo koje nekrotizira. Također, stabla su uključivala i djelomično ili kompletno osušene grane.



Slika 5.1.1. Pucanje kore i sušenje grana šipka (gore) i sušenje stabla šipka (dolje)

Izvor: foto J. Kaliterna, slikano 25.9.2019.

Tablica 5.1.1. Popis lokaliteta i sakupljenih uzoraka šipka

Lokaliteti	Uzorci drva šipka	GPS koordinate lokaliteta
Lok1	ŠK 1	43°32'47.4"N 16°26'58.8"E
Lok2	ŠK 2	43°32'47.9"N 16°26'53.5"E
Lok3	ŠK 3	43°33'10.1"N 16°25'20.1"E
Lok4	ŠK 4	43°33'34.3"N 16°21'55.7"E
Lok5	ŠK 5	43°33'42.5"N 16°21'57.0"E
Lok6	ŠK 6	43°33'11.9"N 16°20'44.1"E
Lok7	ŠK 7	43°33'13.1"N 16°20'41.5"E
Lok8	ŠK 8	43°33'10.3"N 16°20'44.2"E
Lok9	ŠK 9	43°31'15.8"N 16°08'20.4"E
Lok10	ŠK 10	43°30'50.1"N 16°06'22.1"E
Lok11	ŠK 11	43°31'48.5"N 16°02'03.0"E
Lok12	ŠK 12	43°32'04.0"N 15°57'57.3"E
Lok13	ŠK 13	43°32'39.2"N 15°56'43.5"E
Lok14	ŠK 14	43°31'06.7"N 16°14'10.3"E
Lok15	ŠK NN	Nepoznati lokalitet

Zeleno – utvrđena *C. punicae*; **Crveno** – nije utvrđena *C. punicae*

5.2. Selekcija i provizorna identifikacija izolata prema morfološkim obilježjima kolonija i konidija na hranjivoj podlozi PDA

Izolirana su ukupno 63 izolata gljiva, od kojih su 42 izolata grupirana prema morfologiji kolonija i konidija u više grupa, a preostali izolati su isključeni iz daljnjeg razmatranja jer su identificirani kao saprofitne gljive iz rodova *Alternaria* i *Penicillium*. Među grupiranim izolatima, oni iz grupe 1 i 2 (tablica 5.2.1.) imali su morfološka obilježja vrsta iz roda *Cytospora* te su podvrgnuti daljnjoj identifikaciji. Izolati iz ostalih grupa, koje nisu imale obilježja roda *Cytospora*, također su izuzeti iz daljnjih molekularnih analiza, no dio ih je morfološki provizorno identificiran kao pripadnici rodova *Pestalotiopsis* i *Phoma* (tablica 5.2.2.). Razlog za isključivanje iz daljnjih molekularnih analiza svih izolata osim onih iz grupa 1 i 2 jest nemogućnost nastavka istraživanja zbog pandemije COVID 19 i potresa koji se dogodio u Zagrebu u ožujku 2020. godine. Stoga bi sve preostale neidentificirane izolate u

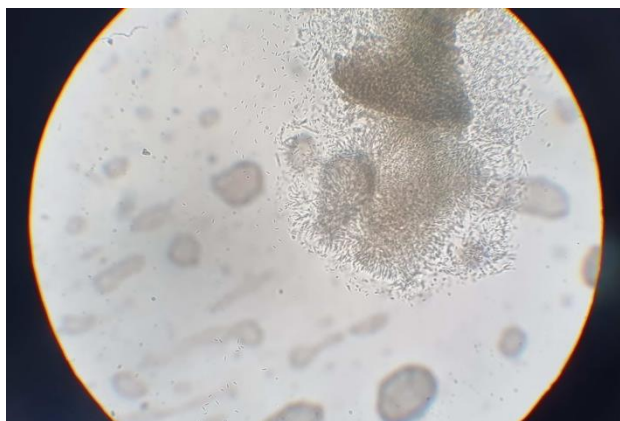
ovom istraživanju trebalo u budućnosti identificirati kako bi se dobila šira slika o patogenima drva šipka.

Tablica 5.2.1. Pregled izolata grupe 1 i grupe 2 po lokalitetima uzorkovanja

Grupa	Naziv izolata	Lokalitet
Grupa 1	ŠK 1-1	Lok1
	ŠK 1-2	
	ŠK 1-4	
	ŠK 2-3	Lok2
	ŠK 3-2	Lok3
	ŠK 6-1	Lok6
	ŠK 8-3	Lok8
	ŠK 9-1	Lok9
	ŠK 9-2	
	ŠK 9-3	
	ŠK 9-4	
	ŠK 12-1(R)	Lok12
	ŠK 12-3	
	ŠK 14-4	Lok14
Grupa 2	ŠK 7-1a	Lok7
	ŠK 7-1b	
	ŠK 10-3	Lok10

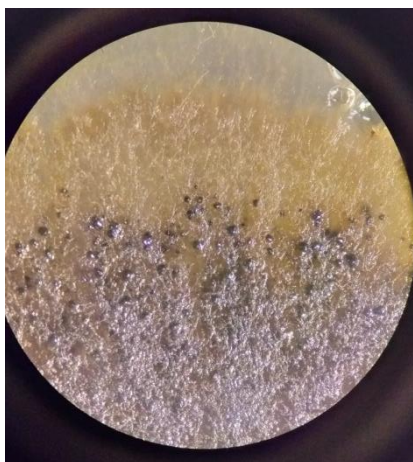
Izolati **podebljanog** fonta su molekularno identificirani

Izolati grupe 1 (ŠK 9-4 i dr.) su provizorno identificirani kao vrsta *Cytospora punicae*, budući su morfološki odgovarali opisanim vrstama iz drugih istraživanja (Peduto Hand i sur. 2014., Lawrence i sur. 2018. i dr.). Mlade kolonije gljiva na hranjivoj podlozi PDA su isprva bijele boje, zatim s vremenom prelaze u smeđu do tamno smeđu boju uz obilan broj produciranih plodnih tijela u obliku stromatičnih struktura, piknida, odnosno piknostroma i nespolnih spora (konidija) (slika 5.2.1.). Hife gljiva su glatke, prozirne, ravne i razgranate. Međutim, postoji mogućnost da pojedini izolati mogu, u ovisnosti od koncentracije hranjive podloge, temperaturi i osvjetljenju, promijeniti boju kolonije koja vremenom postaje crveno smeđa, dok je središnji dio baršunast i siv, kako navode Lawrence i sur. (2018.), što se u ovom istraživanju nije uočilo. Plodna tijela, piknostrome, su se formirale u gustom rasporedu od središta do ruba kolonije. Tamno smeđe su boje, okrugla do blago spljoštena oblika (slika 5.2.2.) što prema opisima Lawrence i sur. (2018.) i drugih autora upućuje na vrstu *C. punicae*. Konidije su obilate, prozirne do svijetlo smeđe boje i alantoidne.



Slika 5.2.1. Konidije vrste *Cytospora punicae* pod svjetlosnim mikroskopom

Izvor: foto J. Kaliterna, slikano 11.10.2019.



Slika 5.2.2. Pknostrome vrste *C. punicae*

Izvor: foto M. Ivandić, slikano 11.10.2019.

Izolati grupe 2 (ŠK 7-1b i ŠK 10-3) su se prema boji kolonije isprva razlikovali od izolata grupe 1, no nakon mikroskopske analize konidija uočeno je da se radi o istom obliku, boji i veličini konidija kao kod izolata iz grupe 1, stoga su zajedno s izolatima grupe 1 izdvojeni za daljnje istraživanje. Kolonije izolata grupe 2 su u početku bijele do žućkaste boje, sa središnjim maslinasto zelenim do sivkastim središnjim dijelom (slika 5.2.3.). Pojedini izolati su rasli brže i mijenjali boju iz bijele u smeđu, dok je pojedinim izolatima trebalo dulje vremena da formiraju stromatične strukture. Neki izolati su u ranijoj fazi rasta kolonije imali obilje stromatičnih struktura za razliku od prethodno navedenih izolata. U središtu počinje formiranje stromatičnih struktura, pknostroma, čija boja varira od svjetlo do tamno smeđe (slika 5.2.4.). Primijećeno je da su stromatične strukture različito producirane (slika 5.2.5.), kako veličinom tako i mjestom gdje su formirane, ovisno o lokalitetu s kojeg su izolirane

(tablica 5.2.1.), pa tako na pojedinim izolatima nisu formirane stromatične strukture, drugi su imali velik broj stromatičnih struktura oko središta kolonije, a treći su izolati formirali stromatične strukture po cijeloj koloniji. Rastom kolonija središnji dio prelazi u tamno smeđu do sivu boju, dok su rubovi svjetlo smeđe boje i nepravilna oblika. Hife su ravne, prozirne, glatke i razgranate. Konidije su producirane u velikom broju, prozirne do svjetlo smeđe boje, blago svinute.



Slika 5.2.3. Mlada kolonija izolata grupe 2 (izolat ŠK 7-1)

Izvor: foto M. Ivandić, slikano 11.10.2019.



Slika 5.2.4. Stromatične strukture promatrane pod binokularom (izolat grupe 2, ŠK 10-3)

Izvor: foto J. Kaliterna, slikano 11.10.2019.



Slika 5.2.5. Prikaz različite produkcije stromatičnih struktura izolata grupe 2
Izvor: foto J. Kaliterna, slikano 29.10.2019.

S obzirom na zastupljenost izolata iz različitih grupa po lokalitetima, distribucija je sljedeća (tablica 5.2.1): na 66 % lokaliteta u uzorcima drva šipka izolirani su izolati grupirani u grupe 1 ili 2, odnosno oni provizorno identificirani kao pripadnici roda *Cytospora*, a na preostalih 33 % lokaliteta to nije bio slučaj iako su simptomi nalikovali na citosporiozno sušenje. Mogući razlog za izostanak izolacije gljiva iz roda *Cytospora* iz simptomatskih šipaka je njihova moguća neuspjela izolacija te nepoznati drugi patogeni ili abiotički čimbenici kao uzroci simptome nalik citosporioznom sušenju. Stoga bi u budućnosti trebalo ponoviti izolacije iz uzoraka na navedenih 33 % lokaliteta te provjeriti patogenost svih izoliranih gljiva iz takvih uzorka.

Tablica 5.2.2. Pregled ostalih, provizorno identificiranih izolata po lokalitetima

	Lokalitet	Identificirane gljive
1.	Lok1	<i>Alternaria</i> sp.
2.	Lok2	<i>Alternaria</i> sp.
3.	Lok4	<i>Alternaria</i> sp.
4.	Lok5	<i>Pestalotiopsis</i> sp., <i>Phoma</i> sp.
5.	Lok7	<i>Penicillium</i> sp.
6.	Lok8	<i>Alternaria</i> sp.
7.	Lok10	<i>Alternaria</i> sp., <i>Pestalotiopsis</i> sp.
8.	Lok12	<i>Alternaria</i> sp.
9.	Lok13	<i>Alternaria</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.
10.	LokNN	<i>Pestalotiopsis</i> sp., <i>Phoma</i> sp.

5.3. Molekularna identifikacija izolata grupe 1 i grupe 2

Pomoću molekularnog markera ITS korištenjem metode PCR izolati grupe 1 i grupe 2 su podvrgnuti molekularnoj identifikaciji. Reprezentativni izolat grupe 1 bio je izolat ŠK 9-4, a grupe 2 izolati ŠK 7-1b i ŠK 10-3. Primjenom molekularnog markera i metode PCR dobiveni su produkti duljine 560 nukleotida. Obradom sekvenci dobivenih produkata, u programu MEGA 7, one su uspoređene s referentnim sekvencama za *Cytospora punicae* iz baze podataka GenBank pomoću programa BLAST.

Temeljem usporedbe izolata grupe 1 utvrđen je postotak homologije veći od 99 % s odgovarajućom sekvencom referentnih izolata M76-Bn (GenBank KY496629.1), UCCE1223-1 (GenBank KJ621688.1), CP_CY1 (GenBank KR020716.1) i UCCE1223-1 (GenBank KJ621687.1). Zbog vrlo visokog stupnja homologije molekularnog markera ITS izolata grupe 1 s referentnim izolatima iz GenBank baze podataka je zaključeno da izolati grupe 1 pripadaju vrsti *Cytospora punicae*, što potvrđuje pretpostavku prethodno odrađene morfološke analize.

Izolati grupe 2 su s odgovarajućim sekvencama referentnih izolata UCCE1223-1 (GenBank KJ621687.1), M76-Bn (GenBank KY496629.1), UCCE1223-1 (GenBank KJ621688.1) i CP_CY1 (GenBank KR020716.1) imali postotak homologije veći od 99 %. Stoga je zaključeno da i izolati grupe 2 pripadaju vrsti *Cytospora punicae*.

5.4. Filogenetska analiza ITS sekvenci izolata grupe 1 i grupe 2

U svrhu dodatne provjere sličnosti ITS sekvenci izolata grupe 1 i grupe 2 s referentnim izolatima za *C. punicae* i referentnim izolatima brojnih drugih vrsta iz roda *Cytospora*, provedena je filogenetska analiza metodom Maximum Likelihood. Rezultat filogenetske analize sekvenci ITS bilo je jedno filogenetsko stablo (slika 5.4.1.) na kojem se vidi da su reprezentativni izolati grupe 1 i grupe 2 grupirani zajedno s referentnim izolatima za vrstu *Cytospora punicae* u dobro podržanom ogranku s bootstrap vrijednošću od 98% i jasno su odijeljeni od drugih vrsta iz roda *Cytospora*. Izolati iz ovog istraživanja također su grupirani s izolatima iz istraživanja Piškurić (2019.) koji su također identificirani kao vrsta *C. punicae*. Na temelju dobivenih rezultata filogenetske analize dokazana je pripadnost izolata grupe 1 i grupe 2 vrsti *Cytospora punicae*, te su dobiveni rezultati konzistentni s rezultatima drugih istraživanja (Lawrence i sur. 2018.).

6. Zaključak

Prema postavljenoj hipotezi i cilju, a temeljem dobivenih rezultata u provedenom istraživanju, zaključci su sljedeći:

1. Na 66 % uzorkovanih lokaliteta u Dalmaciji u biljkama sa simptomima citosporioznog sušenja utvrđeno je prisustvo vrste *Cytospora punicae* (grupa 1 i 2), dok na 33 % lokaliteta to nije bio slučaj unatoč prisustvu sličnih simptoma.
2. Potrebno je dodatnim istraživanjem potvrditi taksonomsku pripadnost izolata gljiva iz ovog istraživanja koji nisu pripadali rodu *Cytospora* i utvrditi im patogenost na šipku.
3. Svi izolati iz grupe 1 i grupe 2, koji su imali obilježja roda *Cytospora*, identificirani su kao vrsta *Cytospora punicae* te su vjerojatni uzrok citosporioznog sušenja biljaka iz kojih su izolirani, no potrebno im je provjeriti patogenost na šipku.
4. Morfološke razlike između izolata grupe 1 i 2 identificiranih kao *C. punicae* vjerojatno su posljedica intraspecijske varijabilnosti unutar ove vrste gljiva.
5. Osim vrste *C. punicae*, na temelju morfoloških obilježja, u drvu šipka utvrđene su i gljive iz rodova *Alternaria* sp., *Penicillium* sp., *Pestalotiopsis* sp. i *Phoma* sp..
6. Kako je šipak slabo istraživana vrsta u Republici Hrvatskoj trebalo bi u budućnosti posvetiti veću pažnju toj biljnoj vrsti.

7. Popis literature

1. Adams G.C., Roux J. i Wingfield M.J. (2006). *Cytospora* species (Ascomycota, Diaporthales, Valsaceae): introduced and native pathogens of trees in South Africa. *Australasian Plant Pathology* 35: 524-548.
2. Adams G.C., Wingfield M.J., Common R. Roux J. (2005). Phylogenetic relationships and morphology of *Cytospora* species and related teleomorphs (Ascomycota, Diaporthales, Valsaceae) from Eucalyptus. *Studies in Mycology* 52: 1-144.
3. Bichcheri R., D'Anniballe A., Lanzoni C., Babini A.R., Mirotti A., Ratti C., Poggi Pollini C. (2015). Viral infections in one collection field of pomegranate (*Punica granatum*) in Italy. *Journal of Plant Pathology* 97(4): 29-30.
4. Bozkurt I. A., Soylu S., Mirik M., Ulubas Serce C. i Baysal Ö. (2014). Characterization of bacterial knot disease caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* on pomegranate (*Punica granatum* L.) trees: a new host of the pathogen. *Letters in Applied Microbiology* 59: 520-527.
5. CBI Ministry of Foreign Affairs. Exporting fresh pomegranates to Europe. <https://www.cbi.eu/market-information/fresh-fruit-vegetables/pomegranates/europe/> - pristup 03.06.2020.
6. Celik A. i Ercisli S. (2009). Some physical properties of pomegranate cv. Eksinar. *International Agrophysics* 23 (3): 295-298.
7. Fan X.L., Bezerra J.D.P., Tian C.M., Crous P.W. (2019). *Cytospora* (Diaporthales) in China. *Persoonia* 45: 1-45.
8. Fan X.L., Liang Y.M., Ma R. i Tian C.M. (2014a). Morphological and phylogenetic studies of *Cytospora* (Valsaceae, Diaporthales) isolates from Chinese scholar tree, with description of a new species. *Mycoscience* 55: 252-259.
9. Fan X.L., Tian C.M., Yang Q., Liang Y.M., You C.J. i Zhan Y.B. (2014b). *Cytospora* from *Salix* in northern China. *Mycotaxon* 129 (2): 303-315.
10. Gadže J. (2013). Pomological, chemical and molecular characterization of pomegranate cultivars (*Punica granatum* L.). Doktorski rad
11. Grove W.B. (1923). The British species of *Cytospora*. *Bulletin of Miscellaneous Information, Royal Botanic Gardens, Kew* 1923: 1-30.
12. Jain K., Desai N. (2018). Pomegranate the Cash Crop of India: A Comprehensive Review on Agricultural Practices and Diseases. *International Journal of Health Sciences & Research* 8: 315-336.
13. Kaliterna J. (2013). Identifikacija, patogenost i rasprostranjenost vrsta gljiva iz porodica *Botryosphaeriaceae* i *Diaporthaceae* na vinovoj lozi u Hrvatskoj. Doktorski rad
14. Kanetis L., Testempasis S., Goulas V., Samuel S., Myresiotis C., Karaoglanidis G.S. (2015). Identification and mycotoxigenic capacity of fungi associated with pre- and post harvest fruit rots of pomegranates in Greece and Cyprus. *International Journal of Food Microbiology* 208: 84-92.
15. Lawrence D. P., Holland L. A., Nouri M. T., Travadon R., Abramians A., Michailides T. J., Trouillas F. P. (2018). Molecular phylogeny of *Cytospora* species associated with canker diseases of fruit and nut crops in California, with the descriptions of ten new species and one new combination. *IMA Fungus* 9 : 333-370.

16. Mahdikhani M. i Davoodi A. (2017). First report of wood canker of pomegranate caused by *Cytospora punicae* in western Iran. *New Disease Reports* 35: 1.
17. Marin S. (2016). Molekularna identifikacija gljiva iz porodica *Diaporthaceae* i *Botriosphaeriaceae* izoliranih iz drva smokve u Hrvatskoj. Diplomski rad.
18. Mincuzzi A., Sanzani S.M., Garganese F., Ligorio A. i Ippolito A. (2017.) First report of *Cytospora punicae* causing fruit rot on pomegranate in Italy. *Journal of Plant Pathology* 99 (1): 302.
19. Morton J. (1987). Fruits of warm climates. 352-355.
20. Munheweyi 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.
21. Pain S., Vines G. i Hamer M. IPGRI. (2001). Regional report CWANA 1999-2000. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, 20-28.
22. Palavouzis S.C., Tzamos S., Paplomatas E. i 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.
23. Palou L., Taberber V., Guardado A., Del Rio M.A. i Montesions-Herrero C. (2013). Incidence and etiology of post harvest fungal diseases of pomegranate (*Punica granatum* cv. Mollar de Elche) in Spain. *Phytopathologia Mediterranea* 52, 3, 478-489.
24. Peduto Hand F., Choudhury R.A., Gubler W.D. (2014). First Report of *Cytospora punicae* Causing Wood Canker and Branch Dieback of Pomegranate (*Punica granatum*) in the United States. *Plant Disease* 98 (6): 853. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-13-1133-PDN> - pristup: 17.06.2020.
25. 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.
26. Piškurić I. (2019). Identifikacija gljiva povezanih sa sušenjem šipka (*Punica granatum* L.) u Dalmaciji. Diplomski rad
27. Poovarasan, S., Mohandas, S., Paneerselvam, P., Saritha, B. i Ajay, K.M. (2013) Mycorrhizae colonizing actinomycetes promote plant growth and control bacterial blight disease of pomegranate (*Punica granatum* L. cv Bhagwa). *Crop Prot* 53: 175–181.
28. Samouel S. i Kanetis L. (2016). First report of *Cytospora punicae* causing trunk canker of pomegranate (*Punica granatum*) in Cyprus. *Plant Disease* 100: 222. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-15-0356-PDN> - pristup 18.06.2020.
29. 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.
30. Schoeneweiss D.F. (1981a). Infectious diseases of trees associated with water and freezing stress. *Journal of Arboriculture* 7: 13-18.
31. Schoeneweiss D.F. (1981b). The role of environmental stress in diseases of woody plants. *Plant Disease* 65: 308-314.
32. Schoeneweiss D.F. (1983). Drought predisposition to *Cytospora* canker in blue spruce. *Plant Disease* 67: 383-385.
33. Schoeneweiss D.F. (1983). Drought predisposition to *Cytospora* canker in blue spruce. *Plant Disease* 67: 383–385.
34. Stover E., Mercure E. (2007). The pomegranate: a new look at the fruit of paradise. *HortScience* 42: 1088-1092.

35. 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.
36. Šakić Bobić, B. (2016). Ekonomika proizvodnje nara. Gospodarski list. <https://gospodarski.hr/rubrike/agroekonomika/ekonomika-proizvodnje-nara/8491/> - pristup 01.06.2020.
37. Triki M.A., Gharbi Y., Cheffi M., Krid S., Rahma T., Hammami I., Hamdi H., Chaâbani B., Ben Ali H. i 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): 550.
38. Venter E., Lennox C.L. i Meitz-Hopkins J.C. (2016). First report of *Cytospora punicae* causing post-harvest fruit rot on pomegranate in South Africa. Plant Disease 101 (4): 631. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-16-1157-PDN>- pristup: 20.06.2020.
39. 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.
40. Wingfield M.J., De Beer Z.W., Slippers B., Wingfield B.D., Groenewald J.Z., Lombard L. i Crous P.W. (2012). One fungus, one name promotes progressive plant pathology. Molecular Plant Pathology 13(6): 604-613.

8. Prilog

8.1. Tablica referentnih sekvenci preuzetih iz baze podataka GenBank

Tablica 8.1.1. Popis korištenih izolata i njihovih ITS sekvenci iz baze podataka GenBank za gljive iz roda *Cytospora*

Vrsta gljive	Izolat	Biljka domaćin	ITS
<i>Cytospora abyssinica</i>	CMW 10181	<i>Eucalyptus globulus</i>	AY347353
<i>Cytospora ailanthicola</i>	CFCC 89970	<i>Ailanthus altissima</i>	MH933618
<i>Cytospora ampulliformis</i>	MFLUCC 16-0629	<i>Acer platanooides</i>	KY417727
<i>Cytospora amygdali</i>	LH357 / CBS 144233	<i>Prunus dulcis</i>	MG971852
<i>Cytospora amygdali</i>	CMW 6735	<i>Prunus dulcis</i>	MG971853
<i>Cytospora austromontana</i>	CMW 6735	<i>Eucalyptus pauciflora</i>	AY347361
<i>Cytospora atrocirrhatta</i>	CFCC 89615	<i>Jugulans regia</i>	KF225610
<i>Cytospora atrocirrhatta</i>	CFCC 89615	<i>Jugulans regia</i>	KR045618
<i>Cytospora atrocirrhatta</i>	CFCC 89616	<i>Jugulans regia</i>	KR045619
<i>Cytospora beilinensis</i>	CFCC 50493	<i>Pinus armandii</i>	MH933619
<i>Cytospora beilinensis</i>	CFCC 50494	<i>Pinus armandii</i>	MH933620
<i>Cytospora berberidis</i>	CFCC 89927	<i>Berberis dasystachyum</i>	KP340985
<i>Cytospora berberidis</i>	CFCC 89927	<i>Berberis dasystachya</i>	KR045620
<i>Cytospora berberidis</i>	CFCC 89933	<i>Berberis dasystachya</i>	KR045621
<i>Cytospora berkeleyi</i>	StanfordT3	<i>Eucalyptus globulus</i>	AY347350
<i>Cytospora brevispora</i>	CBS 116811	<i>Eucalyptus grandis</i>	AF192315
<i>Cytospora bungeanae</i>	CFCC 50495T	<i>Pinus bungeana</i>	MH933621
<i>Cytospora bungeanae</i>	CFCC 50496	<i>Pinus bungeana</i>	MH933622
<i>Cytospora californica</i>	9C-24 / CBS 144234	<i>Juglans regia</i>	MG971935
<i>Cytospora californica</i>	KARE1104	<i>Prunus dulcis</i>	MG971928
<i>Cytospora carbonacea</i>	CFCC 50055	<i>Ulmus pumila</i>	KP281262
<i>Cytospora carbonacea</i>	CFCC 89947	<i>Ulmus pumila</i>	KR045622

<i>Cytospora carpobroti</i>	CMW 48981	<i>Carpobrotus edulis</i>	MH382812
<i>Cytospora cedri</i>	CMW 196.50	<i>Unknown host</i>	AF192311
<i>Cytospora celtidicola</i>	CFCC 50497	<i>Celtis sinensis</i>	MH933623
<i>Cytospora celtidicola</i>	CFCC 50498	<i>Celtis sinensis</i>	MH933624
<i>Cytospora centrivillosa</i>	MFLUCC 16-1206	<i>Sorbus domestica</i>	MF190122
<i>Cytospora ceratospermopsis</i>	CFCC 89626	<i>Juglans regia</i>	KR045647
<i>Cytospora ceratospermopsis</i>	CFCC 89627	<i>Juglans regia</i>	KR045648
<i>Cytospora chrysosperma</i>	9E-33 / CBS 144242	<i>Camellia</i>	MG971892
<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
<i>Cytospora cinereostroma</i>	CMW 5700	<i>Eucalyptus globulus</i>	AY347377
<i>Cytospora curvata</i>	MFLUCC 15-0865	<i>Salix alba</i>	KY417728
<i>Cytospora davidiana</i>	CXY1350	<i>Populus davidiana</i>	KM034870
<i>Cytospora diatrypelloidea</i>	CMW 8549	<i>Eucalyptus globulus</i>	AY347368
<i>Cytospora disciformis</i>	CMW 6509	<i>Eucalyptus grandis</i>	AY347374
<i>Cytospora donetzica</i>	MFLUCC 16-0574	<i>Rosa sp.</i>	KY417731
<i>Cytospora elaeagni</i>	CFCC 89632	<i>Elaeagnus angustifolia</i>	KF765676
<i>Cytospora elaeagni</i>	CFCC 89632	<i>Elaeagnus angustifolia</i>	KR045626
<i>Cytospora elaeagni</i>	CFCC 89633	<i>Elaeagnus angustifolia</i>	KF765677
<i>Cytospora eriobotryae</i>	IMI 136523	<i>Eriobotrya japonica</i>	AY347327
<i>Cytospora erumpens</i>	MFLUCC 16-0580	<i>Salix xfragilis</i>	KY417733
<i>Cytospora erumpens</i>	CFCC 50022	<i>Prunus padus</i>	MH933627
<i>Cytospora eucalypti</i>	KARE1585/ CBS 144241	<i>Prunus dulcis</i>	MG971907
<i>Cytospora eucalypti</i>	KARE888	<i>Prunus dulcis</i>	MG971909
<i>Cytospora eucalypticola</i>	ATCC 96150	<i>Eucalyptus nitens</i>	AY347358
<i>Cytospora eucalyptina</i>	CMW 5882	<i>Eucalyptus grandis</i>	AY347375

<i>Cytospora euonymicola</i>	CFCC 50499	<i>Euonymuski autschovicus</i>	MH933628
<i>Cytospora euonymicola</i>	CFCC 50500	<i>Euonymuski autschovicus</i>	MH933629
<i>Cytospora euonymina</i>	CFCC 89993	<i>Euonymuski autschovicus</i>	MH933630
<i>Cytospora euonymina</i>	CFCC 89999	<i>Euonymuski autschovicus</i>	MH933631
<i>Cytospora fraxinigena</i>	MFLUCC 14-0868	<i>Fraxinus ornus</i>	MF190133
<i>Cytospora fugax</i>	CBS 203.42	<i>Salix</i> sp.	AY347323
<i>Cytospora gigalocus</i>	HMBF 155	<i>Juglans regia</i>	KF225609
<i>Cytospora gigalocus</i>	CFCC 89620	<i>Juglans regia</i>	KF225609
<i>Cytospora gigalocus</i>	CFCC 89621	<i>Juglans regia</i>	KR045629
<i>Cytospora gigaspora</i>	CFCC 50014	<i>Juniperus procumbens</i>	KR045630
<i>Cytospora gigaspora</i>	CFCC 89634	<i>Salix psammophila</i>	KF765671
<i>Cytospora granati</i>	6F-45 /CBS 144237	<i>Punica granatum</i>	MG971799
<i>Cytospora hippophaes</i>	CFCC 89639	<i>Hippophaë rhamnoides</i>	KF765681
<i>Cytospora hippophaës</i>	CFCC 89639	<i>Hippophaë rhamnoides</i>	KR045632
<i>Cytospora hippophaës</i>	CFCC 89640	<i>Hippophaë rhamnoides</i>	KF765682
<i>Cytospora japonica</i>	CFCC 89956	<i>Prunus cerasifera</i>	KR045624
<i>Cytospora japonica</i>	CFCC 89960	<i>Prunus cerasifera</i>	KR045625
<i>Cytospora joaquinensis</i>	9,00E-95	<i>Juglans regia</i>	MG971896
<i>Cytospora joaquinensis</i>	KARE975/ CBS 144235	<i>Populus deltoides</i>	MG971895
<i>Cytosora junipericola</i>	BBH 42444	<i>Juniperus communis</i>	MF190126
<i>Cytospora junipericola</i>	MFLU 17-0882	<i>Juniperus communis</i>	MF190125
<i>Cytospora juniperina</i>	CFCC 50501	<i>Juniperus przewalskii</i>	MH933632
<i>Cytospora junipera</i>	CFCC 50502	<i>Juniperus przewalskii</i>	MH933633
<i>Cytospora leucosperma</i>	CFCC 89622	<i>Pyrus bretschneider</i>	KR045616
<i>Cytospora leucosperma</i>	CFCC 50021	<i>Prunus salicina</i>	MH933639

<i>Cytospora longiostiolata</i>	MFLUCC 16-0628	<i>Salix xfragilis</i>	KY417734
<i>Cytospora longispora</i>	10F-57/ CBS 144236	<i>Prunus domestica</i>	MG971905
<i>Cytospora mali</i>	CFCC 50028	<i>Malus pumila</i>	MH933641
<i>Cytospora mali</i>	CFCC 50029	<i>Malus pumila</i>	MH933642
<i>Cytospora melnikii</i>	MFLUCC 15-0851	<i>Malus domestica</i>	KY417735
<i>Cytospora melnikii</i>	CFCC 89984	<i>Rhus typhina</i>	MH933644
<i>Cytospora multicollis</i>	CBS 105.89	<i>Quercus ilex</i> subsp. <i>rotun difolia</i>	DQ243803
<i>Cytospora myrtagena</i>	Hilo Tib1	<i>Tibouchina urvilleana</i>	AY347363
<i>Cytospora nitschkii</i>	CMW 10180	<i>Eucalyptus globulus</i>	AY347356
<i>Cytospora nivea</i>	CFCC 89641	<i>Elaeagnus angustifolia</i>	KF765683
<i>Cytosporanivea</i>	CFCC 89642	<i>Salix psammophila</i>	KF765684
<i>Cytospora nivea</i>	CFCC 89643	<i>Salix psammophila</i>	KF765685
<i>Cytospora notastroma</i>	Cottonwood16	<i>Populus tremuloides</i>	JX438631
<i>Cytospora oleicola</i>	KARE1021/ CBS 144248	<i>Olea europaea</i>	MG971944
<i>Cytosora palm</i>	CXY 1276	<i>Cotinus coggygria</i>	JN402990
<i>Cytospora palm</i>	CXY 1280	<i>Cotinus coggygria</i>	JN411939
<i>Cytospora parakantschavelii</i>	MFLUCC 15-0857	<i>Populus xsibirica</i>	KY417738
<i>Cytospora parakantschavelii</i>	KARE974/ CBS 144243	<i>Populus deltoides</i>	MG971898
<i>Cytospora parakantschavelii</i>	KARE966	<i>Populus fremontii</i>	MG971903
<i>Cytospora parapistaciae</i>	KARE270/ CBS 144506	<i>Pistacia vera</i>	MG971804
<i>Cytospora parapistaciae</i>	KARE269	<i>Pistacia vera</i>	MG971805
<i>Cytospora parasitica</i>	XJAU 2542-1	<i>Malus</i> sp.	MH798884
<i>Cytospora paratranslucens</i>	MFLUCC 15-0506	<i>Populus alba</i> var. <i>bolleana</i>	KY417741
<i>Cytospora pistaciae</i>	KARE443/ CBS 144238	<i>Pistacia vera</i>	MG971802
<i>Cytospora pistaciae</i>	KARE444	<i>Pistacia vera</i>	MG971801

<i>Cytospora platycladi</i>	CFCC 50504	<i>Platyclusus orientalis</i>	MH933645
<i>Cytospora platycladi</i>	CFCC 50505	<i>Platyclusus orientalis</i>	MH933646
<i>Cytospora platycladicola</i>	CFCC 50038	<i>Platyclusus orientalis</i>	KT222840
<i>Cytospora platycladicola</i>	CFCC 50039	<i>Platyclusus orientalis</i>	KR045642
<i>Cytosporaplurivora</i>	9F-01	<i>Juglans regia</i>	MG971873
<i>Cytosporaplurivora</i>	KARE1452/ CBS 144239	<i>Olea europaea</i>	MG971861
<i>Cytospora populicola</i>	KARE973/ CBS 144240	<i>Populus deltoides</i>	MG971891
<i>Cytospora populina</i>	CFCC 89644	<i>Salix psammophila</i>	KF765686
<i>Cytospora populinopsis</i>	CFCC 50032	<i>Sorbus aucuparia</i>	MH933648
<i>Cytospora populinopsis</i>	CFCC 50033	<i>Sorbus aucuparia</i>	MH933649
<i>Cytospora pruinosis</i>	CFCC 50034	<i>Ulmus pumila</i>	KP281259
<i>Cytospora pruinopsis</i>	CFCC 50035	<i>Ulmus pumila</i>	KP281260
<i>Cytospora pruinosa</i>	CFCC 50036	<i>Syringa oblata</i>	KP310800
<i>Cytospora pruinosa</i>	CFCC 50037	<i>Syringa oblata</i>	MH933650
<i>Cytospora punicae</i>	7C-09	<i>Punica granatum</i>	MG971939
<i>Cytospora punicae</i>	7C-10	<i>Punica granatum</i>	MG971937
<i>Cytospora punicae</i>	7C-11	<i>Punica granatum</i>	MG971942
<i>Cytospora punicae</i>	5A-80/ CBS 144244	<i>Punica granatum</i>	MG971943
<i>Cytospora punicae</i>	5A-81	<i>Punica granatum</i>	MG971938
<i>Cytospora punicae</i>	5A-82	<i>Punica granatum</i>	MG971941
<i>Cytospora punicae</i>	7C-33	<i>Punica granatum</i>	MG971940
<i>Cytospora punicae</i>	CBS 199.50	<i>Punica granatum</i>	JX438622
<i>Cytospora quercicola</i>	MFLUCC 14-0867	<i>Quercus</i> sp.	MF190129
<i>Cytospora ribis</i>	CFCC 50026	<i>Ulmus pumila</i>	KP281267
<i>Cytospora ribis</i>	CFCC 50027	<i>Ulmus pumila</i>	KP281268
<i>Cytospora rosae</i>	MFLUCC 14-0845	<i>Rosa canina</i>	MF190131

<i>Cytospora rostrata</i>	Ls251	<i>Salix cupularis</i>	KC313890
<i>Cytospora rostrata</i>	CFCC 89909	<i>Salix cupularis</i>	KR045643
<i>Cytospora rostrata</i>	CFCC 89910	<i>Salix cupularis</i>	KR045644
<i>Cytospora rusanovii</i>	MFLUCC 15-0854	<i>Salix babylonica</i>	KY417744
<i>Cytospora sacculus</i>	CFCC 89624	<i>Juglans regia</i>	KF225615
<i>Cytospora sacculus</i>	CFCC 89624	<i>Juglans regia</i>	KR045645
<i>Cytospora sacculus</i>	CFCC 89625	<i>Juglans regia</i>	KR045646
<i>Cytospora salicacearum</i>	MFLUCC 15-0509	<i>Salix alba</i>	KY417745
<i>Cytospora salicina</i>	MFLUCC 15-0862	<i>Salix alba</i>	KY417750
<i>Cytospora schulzeri</i>	CFCC 50040	<i>Malus domestica</i>	KR045649
<i>Cytospora schulzeri</i>	CFCC 50042	<i>Malus asiatica</i>	KR045650
<i>Cytospora sibiraeae</i>	CFCC 50045	<i>Sibiraea angustata</i>	KP340987
<i>Cytospora sibiraeae</i>	CFCC 50045	<i>Sibiraea angustata</i>	KR045650
<i>Cytospora sibiraeae</i>	CFCC 50046	<i>Sibiraea angustata</i>	KR045652
<i>Cytospora sophorae</i>	CFCC 50047	<i>Styphnolobium japonicum</i>	KR045653
<i>Cytospora sophorae</i>	CFCC 89598	<i>Sophora japonica</i>	KR045654
<i>Cytospora sophoricola</i>	CFCC 89596	<i>Styphnolobium japonicum</i> var. <i>pendula</i>	KR045656
<i>Cytospora sophoricola</i>	CFCC 89595	<i>Styphnolobium japonicum</i> var. <i>pendula</i>	KR045655
<i>Cytospora sophoriopsis</i>	CFCC 89600	<i>Styphnolobium japonicum</i>	KR045623
<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
<i>Cytospora sorbicola</i>	KARE78	<i>Prunus dulcis</i>	MG971844
<i>Cytospora spiraeae</i>	CFCC 50049	<i>Spiraea salicifolia</i>	MG707859

<i>Cytospora tamaricicola</i>	CFCC 50507	<i>Rosa multiflora</i>	MH933651
<i>Cytospora tamaricicola</i>	CFCC 50508	<i>Tamarixchinensis</i>	MH933652
<i>Cytospora ulmi</i>	MFLUCC 15-0863	<i>Ulmus minor</i>	KY417759
<i>Cytospora valsoidea</i>	CMW 4309	<i>Eucalyptus grandis</i>	AF192312
<i>Cytospora variostromatica</i>	CMW 6766	<i>Eucalyptus globulus</i>	AY347366
<i>Cytospora vinacea</i>	CBS 141585	<i>Vitis interspecific hybrid 'Vidal'</i>	KX256256
<i>Cytospora viticola</i>	CBS 141586	<i>Vitis vinifera 'Cabernet Franc'</i>	KX256239
<i>Cytospora punicae</i>	CRO-SHIPAK_2019_1.4	<i>Punica granatum</i>	Piškurić 2019.
<i>Cytospora punicae</i>	CRO-SHIPAK_2019_1.6	<i>Punica granatum</i>	Piškurić 2019.
<i>Cytospora punicae</i>	CRO-SHIPAK_2019_2.1	<i>Punica granatum</i>	Piškurić 2019.
<i>Cytospora punicae</i>	CRO-SHIPAK_2019_3.2	<i>Punica granatum</i>	Piškurić 2019.
<i>Cytospora punicae</i>	CRO-SHIPAK_2019_3.3	<i>Punica granatum</i>	Piškurić 2019.
<i>Cytospora punicae</i>	CRO-SHIPAK_2019_4.1	<i>Punica granatum</i>	Piškurić 2019.
<i>Cytospora punicae</i>	CRO-SHIPAK_2019_5.4	<i>Punica granatum</i>	Piškurić 2019.
<i>Cytospora punicae</i>	CRO-SHIPAK_2019_7.1	<i>Punica granatum</i>	Piškurić 2019.
<i>Cytospora punicae</i>	CRO-SHIPAK_2019_9.1	<i>Punica granatum</i>	Piškurić 2019.
<i>Diaporthe ampelina</i>	Wolf912	<i>Vitis vinifera 'Thompson seedless'</i>	KM669964
<i>Diaporthe benedicti</i>	SBen914	<i>Salixsp.</i>	KM669929
<i>Diaporthe vaccinii</i>	CBS 160.32	<i>Oxycoccus microcarpus</i>	KC343228.1

Životopis

Marijela Ivandić, rođena 08.05.1995. godine u Žepču (BiH). Osnovnu školu je pohađala u Žepču. 2010. godine upisuje srednju ekonomsku školu u Katoličkom školskom centru „Don Bosco“ gdje je maturirala 2014. godine. Preddiplomski studij „Agronomija opći smjer“ upisuje 2015. godine na Agronomskom i prehrambeno-tehnološkom fakultetu Sveučilišta u Mostaru. Studij završava 2018. godine obranom završnog rada pod naslovom „Utjecaj niskih temperatura na pupoljke sorti: merlot, muller thurgau, žilavka, blatina“ i stječe titulu Prvostupnik/Bachelor agronomije općeg smjera. Diplomski studij „Fitomedicina“ upisuje na Agronomskom fakultetu na Sveučilištu u Zagrebu 2018. godine. Tijekom akademske godine 2019/2020. izrađuje diplomski rad pod mentorstvom doc.dr.sc. Joška Kaliterne na Zavodu za fitopatologiju. Od stranih jezika aktivno se služi engleskim jezikom (razine B2), nešto manje njemačkim jezikom (razine B1), te u slobodno vrijeme samostalno uči španjolski jezik. Godine 2015. je pohađala informatički tečaj te dobila certifikat Udruge informatičara „KLIK“ Žepče. Preko zagrebačkog studentskog servisa radila je u dm-u, a ostatak slobodnog vremena je provodila s prijateljima i rodbinom.