

Zdravstveno stanje divlje trešnje (*Prunus avium* L.) u klonskoj sjemenskoj plantaži Kutina (UŠP Zagreb)

Bolfan, Marija Dora

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Forestry and Wood Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet šumarstva i drvne tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:108:121044>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-21**



Repository / Repozitorij:

[University of Zagreb Faculty of Forestry and Wood Technology](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU, FAKULTET ŠUMARSTVA I DRVNE
TEHNOLOGIJE**

ŠUMARSKI ODSJEK

SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

URBANO ŠUMARSTVO, ZAŠTITA PRIRODE I OKOLIŠA

MARIJA DORA BOLFAN

**ZDRAVSTVENO STANJE DIVLJE TREŠNJE (*Prunus avium*
L.) U KLONSKOJ SJEMENSKOJ PLANTAŽI KUTINA (UŠP
ZAGREB)**

DIPLOMSKI RAD

ZAGREB, 2021.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU, FAKULTET ŠUMARSTVA I DRVNE
TEHNOLOGIJE
ŠUMARSKI ODSJEK**

**ZDRAVSTVENO STANJE DIVLJE TREŠNJE (*Prunus avium* L.) U
KLONSKOJ SJEMENSKOJ PLANTAŽI KUTINA (UŠP ZAGREB)**

DIPLOMSKI RAD

Diplomski studij: Urbano šumarstvo, zaštita prirode i okoliša

Predmet: Integrirana zaštita šuma u zaštićenim područjima

Ispitno povjerenstvo: 1. prof.dr.sc. Danko Diminić

2. doc.dr.sc. Marko Vucelja

3. dr.sc. Jelena Kranjec Orlović

Studentica: Marija Dora Bolfan

JMBAG: 0053204394

Broj indeksa: 943/18

Datum odobrenja teme: 17. travnja 2020. godine

Datum predaje rada: 2. lipnja 2021. godine

Datum obrane rada: 9. srpnja 2021. godine

Zagreb, srpanj 2021.

**Dokumentacijska
kartica**

Naslov	Zdravstveno stanje divlje trešnje (<i>Prunus avium</i> L.) u klonskoj sjemenskoj plantaži Kutina (UŠP Zagreb)
Title	Health status of wild cherry (<i>Prunus avium</i> L.) in clonal seed orchard Kutina (FA Zagreb)
Autor	Marija Dora Bolfan
Adresa autora	Kustošijanska 317, 10 000 Zagreb
Mjesto izrade	Sveučilište u Zagrebu, Fakultet šumarstva i drvne tehnologije
Vrsta objave	Diplomski rad
Mentor	Prof.dr.sc. Danko Diminić
Komentorica	Dr.sc. Jelena Kranjec Orlović
Godina objave	2021.
Obujam	51 stranica, 6 tablica, 10 grafikona, 26 slika, 186 navoda literature
Ključne riječi	Divlja trešnja (<i>Prunus avium</i> L.), klonska sjemenska plantaža Kutina, uzorci simptomatičnog lisnog tkiva, gljivični endofiti
Keywords	Wild cherry (<i>Prunus avium</i> L.), clonal seed orchard Kutina, symptomatic leaf tissue samples, fungal endophytes
Sažetak	Tijekom procjene zdravstvenog stanja klonova divlje trešnje (<i>Prunus avium</i> L.) u klonskoj sjemenskoj plantaži Kutina (UŠP Zagreb), u svibnju 2020. godine primijećena je sporadična pojava nekrotičnih lezija koje su zahvaćale samo lišće vizualno zdravih stabala. Nekrotične lezije pokazivale su dva karakteristična obrasca širenja, što je dovelo do zaključka da se radi o dva različita simptoma i više potencijalnih uzročnika. Budući da simptomatično lišće nije pokazivalo znakove napada kukaca te kako se datum prikupljanja uzoraka podudara s kalendarskim dijelom godine u kojemu simptomi gljivičnih oboljenja postaju vidljivi, nad prikupljenim lišćem je proveden postupak izolacije gljiva iz prijelazne zone nekrotiziranoga i zdravoga tkiva. Nakon dobivanja čistih kultura izoliranih micelija te utvrđivanja njihove sistematske pripadnosti primjenom molekularnih metoda, ovim se istraživanjem nastojala utvrditi prisutnost patogenih vrsta kao mogućih uzročnika nekrotičnih lezija. U svrhu dobivanja uvida u strukturu zajednice gljiva koje su kolonizirale lišće klonova, uzorci simptomatičnog tkiva bili su

	podijeljeni u šest kategorija, odnosno dvije kategorije s obzirom na tip simptoma i tri kategorije s obzirom na primjenu površinske sterilizacije. Sekvenciranjem izolirane DNK reprezentativnih izolata i identifikacijom taksona prisutnih gljiva, postalo je vidljivo kako se pojava nekrotičnih lezija na lišću klonova <i>Prunus avium</i> u klonskoj sjemenskoj plantaži Kutina ne može povezati s napadom gljivičnih uzročnika najčešćih folijarnih bolesti divlje trešnje, ali se može smatrati posljedicom složene interakcije endofitske zajednice gljiva, biljnog domaćina i abiotičkih čimbenika.
--	--

	IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI	OB FŠDT 05 07
		Revizija: 2
		Datum: 29.04.2021.

„Izjavljujem da je moj diplomski rad izvorni rezultat mogega rada te da se u izradi istoga nisam koristila drugim izvorima osim onih koji su u njemu navedeni“.

U Zagrebu, 9. srpnja 2021. godine

vlastoručni potpis

Marija Dora Bolfan

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1 Divlja trešnja (<i>Prunus avium</i> (L.) L.).....	1
1.2 Uzročnici gospodarski najznačajnijih gljivičnih bolesti lišća divlje trešnje u Republici Hrvatskoj	3
1.2.1 <i>Apiognomonina erythrostoma</i> (Pers.) Höhn.....	3
1.2.2 <i>Blumeriella jaapii</i> (Rehm) Arx	4
1.2.3 <i>Stigmina carpophila</i> (Lév.) M. B. Ellis.....	5
1.3 Klonske sjemenske plantaže i očuvanje genofonda divlje trešnje	7
2. CILJ RADA.....	8
3. MATERIJALI I METODA RADA.....	8
3.1 Područje istraživanja	8
3.2 Procjena zdravstvenog stanja stabala divlje trešnje i prikupljanje uzoraka na terenu	9
3.3 Izolacija micelija iz simptomatičnog lisnog tkiva i dobivanje čistih kultura	13
3.4 Primjena molekularnih metoda u identifikaciji taksona izoliranih micelija.....	15
4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA	18
4.1 Taksoni izoliranih gljiva prema bazi gena NCBI GenBank.....	18
5. RASPRAVA.....	31
5.1 Povezanost prisutnosti gljivičnih endofita i razvoja nekrotičnih lezija na lišću klonova divlje trešnje u KSP Kutina.....	32
5.2 Uloga gljive <i>Botrytis cinerea</i> Pers. u pojavi nekrotičnih lezija na lišću klonova divlje trešnje u KSP Kutina	34
5.3 Uloga vrsta roda <i>Cladosporium</i> Link ex Fries u pojavi nekrotičnih lezija na lišću klonova divlje trešnje u KSP Kutina.....	36
5.4 Uloga vrsta roda <i>Epicoccum</i> Link u pojavi nekrotičnih lezija na lišću klonova divlje trešnje u KSP Kutina.....	39
5.5 Uloga ostalih izoliranih taksona gljiva u pojavi nekrotičnih lezija na lišću klonova divlje trešnje u KSP Kutina	41
5.5.1. <i>Aureobasidium pullulans</i> (de Bary et Löwenthal) G. Arnaud	42
5.5.2. <i>Alternaria infectoria</i> E. G. Simmons / <i>A. caespitosa</i> (de Hoog & C. Rubio) Woudenb. & Crous.....	43
5.5.3 <i>Aposphaeria corallinolutea</i> Gruyter / <i>Dendrophoma pleurospora</i> Sacc.	44
5.5.4 <i>Paraconiothyrium brasiliense</i> Verkley	45
5.5.5 <i>Fusarium sporotrichioides</i> Sherb.....	46

5.5.6. <i>Daldinia pyrenaica</i> M. Stadler & Wollw.....	47
5.5.7 Rod <i>Dothiora</i> Fr.....	48
5.5.8 <i>Cryptosphaeria ligniota</i> (Fr.) Auersw.....	49
6. ZAKLJUČAK	50
7. LITERATURA.....	1

Popis slika

Slika 1. Kartografski prikaz areala divlje trešnje (*Prunus avium* (L.) L.) (Izvor: www.euforgen.org)

Slika 2. Izgled zaraženog lišća u krošnji (lijevo) i uvećani prikaz nekroze lišća *Prunus avium* uzrokovane gljivom *Apiognomonia erythrostoma* (desno) (Izvori: www.oekophys.wzw.tum.de i <https://nt.ars-grin.gov>)

Slika 3. Uvećani prikaz nekrotičnih pjega s gornje strane plojke lista *Prunus avium* koje su uzrokovane gljivom *Blumeriella jaapii* (gore) i uvećani prikaz donje strane plojke lista *Prunus avium* s nekrotičnim područjima i izbočenim, bjelkastim masama konidija *Blumeriella jaapii* (dolje) (Autor: C. Van Steenwinkel. Izvor: <https://bladmineerders.nl>)

Slika 4. Izgled simptoma na lišću *Prunus* sp. uslijed napada *Stigmata carpophila* (Autori: C. Quintin i L. Érsek. Izvori: <https://alchetron.com> i <https://bladmineerders.nl>)

Slika 5. Izgled nekrotičnih pjega na lišću i plodovima *Prunus* sp. uslijed napada *Pseudomonas syringae* (Izvor: <http://www.fazos.unios.hr>)

Slika 6. Klonska sjemenska plantaža divlje trešnje na području Šumarije Kutina (Izvor: www.savjetodavna.hr)

Slika 7. Izgled simptoma A na gornjoj strani plojke lista *Prunus avium* iz KSP Kutina – pojedinačna nekrotična pjega širi se od ruba lista prema unutrašnjosti (lijevo) te izgled simptoma A na donjoj strani plojke istoga lista (desno)

Slika 8. Donja strana plojke lista *Prunus avium* sakupljenog u KSP Kutina koji pokazuje simptom A - više nekrotičnih lezija pojavljuje se uz lisne žile (lijevo) i uvećani prikaz simptoma A – nekrotične pjege uz lisne žile (desno) (Autor: J. Kranjec Orlović)

Slika 9. Izgled simptoma B na gornjoj strani plojke lista klona divlje trešnje iz KSP Kutina – nekrotična lezija širi se uz lisne žile, od ruba lista prema unutrašnjosti zahvaćajući polovicu površine plojke (lijevo) te izgled simptoma B na donjoj strani plojke istoga lista (desno)

Slika 10. Uvećani prikaz simptoma B – širenje nekroze uz lisne žile, od ruba prema unutrašnjosti lista (Autor: J. Kranjec Orlović)

Slika 11. Laminarni mikrobiološki kabinet za rad u atmosferi čistog zraka

Slika 12. Uzorci biljnog tkiva oznake US4A na kojima je došlo do razvoja micelija u Petrijevoj zdjelici promjera 90 mm i presađeni micelij te jedinke u Petrijevoj zdjelici promjera 55 mm

Slika 13. Pojava nekrotičnih lezija na lišću *Cornus florida* uzrokovana napadom gljive *Botrytis cinerea* (lijevo) i širenje micelija *Botrytis cinerea* po čitavoj površini zaraženog lišća *Cornus florida* (desno) (Izvor: Özer i Bayraktar 2014)

Slika 14. Čiste kulture micelija *Botrytis cinerea* na PDA podlozi i starosti 14 dana

Slika 15. Čista kultura micelija *Cladosporium* sp. na PDA podlozi, predstavljenog morfotipom 1 (oznaka Z1) i starosti 14 dana (lijevo) te čista kultura micelija *Cladosporium* sp. na PDA podlozi, predstavljenog morfotipom 3 (oznaka Z3) i starosti 14 dana (desno)

Slika 16. Širenje nekrotičnih lezija na lišću *Prunus nepalensis* uzrokovanih gljivom *Cladosporium oxysporum* (Izvor: Baiswar i sur. 2011)

Slika 17. Čiste kulture micelija *Epicoccum nigrum* na PDA podlozi, predstavljene morfotipom 16 i starosti 14 dana

Slika 18 Čista kultura micelija *Epicoccum* sp. na PDA podlozi, predstavljenog morfotipom 17 i starosti 14 dana (lijevo) te čista kultura micelija *Epicoccum nigrum*/*E. layuense* na PDA podlozi, predstavljenog morfotipom 18 i starosti 14 dana (desno)

Slika 19. Čista kultura micelija *Aureobasidium pullulans* na PDA podlozi, starosti 14 dana i predstavljena morfotipom 5 (oznaka Z7) (lijevo), čista kultura micelija *A. pullulans* na PDA podlozi, starosti 14 dana i predstavljena morfotipom 5 (oznaka Z8) (sredina) te čista kultura micelija *A. pullulans* na PDA podlozi, starosti 21 dan i predstavljena morfotipom 13 (oznaka Z16) (desno)

Slika 20. Čista kultura micelija *Alternaria infectoria*/*A. caespitosa* na PDA podlozi, starosti 14 dana i predstavljenog morfotipom 9 (oznaka Z12)

Slika 21. Čista kultura micelija *Aposphaeria corallinolutea*/*Dendrophoma pleurospora* na PDA podlozi, starosti 14 dana i predstavljenog morfotipom 8 (oznaka Z11)

Slika 22. Čista kultura micelija *Paraconiothyrium* sp. na PDA podlozi, starosti 14 dana i predstavljena morfotipom 7 (oznaka Z10) (lijevo) te čista kultura micelija *Paraconiothyrium brasiliense* na PDA podlozi, jednake starosti i predstavljena morfotipom 11 (oznaka Z14) (sredina i desno)

Slika 23. Čista kultura micelija *Fusarium sporotrichioides* na PDA podlozi, starosti 14 dana i predstavljena morfotipom 14 (oznaka Z17)

Slika 24. Čista kultura micelija *Daldinia pyrenaica* na PDA podlozi, predstavljena morfotipom 19 (oznaka Z25)

Slika 25. Čista kultura micelija *Dothiora* sp. na PDA podlozi, starosti 14 dana i predstavljena morfotipom 12 (oznaka Z15)

Slika 26. Čista kultura micelija *Cryptosphaeria ligniota* na PDA podlozi, starosti 14 dana i predstavljena morfotipom 10 (oznaka Z13)

Popis tablica

Tablica 1. Sastav smjese za izvođenje PCR reakcije

Tablica 2. Uvjeti lančane reakcije polimerazom

Tablica 3. Prikaz taksona izoliranih gljiva sukladno podacima iz baze NCBI GenBank

Tablica 4. Pregled morfotipova i odgovarajućih taksona

Tablica 5. Pregled prisutnih morfotipova i utvrđenih taksonomskih jedinica micelija razvijenih iz tkiva koje je pokazivalo simptom A

Tablica 6. Pregled prisutnih morfotipova i utvrđenih taksonomskih jedinica micelija razvijenih iz tkiva koje je pokazivalo simptom B

Popis grafikona

Grafikon 1. Odnos broja taksonomskih jedinica micelija razvijenih na uzorcima biljnog tkiva sa simptomom A i nakon površinske sterilizacije otopinom natrijeva hipoklorita (NaOCl , 2 %); oznake uzoraka L1A-L10A

Grafikon 2. Odnos broja taksonomskih jedinica micelija razvijenih na uzorcima biljnog tkiva sa simptomom A i nakon površinske sterilizacije otopinom etanola ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, 70%); oznake uzoraka US1A-US5A

Grafikon 3. Odnos broja taksonomskih jedinica micelija razvijenih na uzorcima biljnog tkiva sa simptomom A koji nisu bili podvrgnuti površinskoj sterilizaciji; oznake uzoraka UNS1A-UNS5A

Grafikon 4. Odnos broja taksonomskih jedinica micelija razvijenih na uzorcima biljnog tkiva sa simptomom B i nakon površinske sterilizacije otopinom natrijeva hipoklorita (NaOCl , 2%); oznake uzoraka L1B-L10B

Grafikon 5. Odnos broja taksonomskih jedinica micelija razvijenih na uzorcima biljnog tkiva sa simptomom B i nakon površinske sterilizacije otopinom etanola ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, 70%); oznake uzoraka US1B-US5B

Grafikon 6. Odnos broja taksonomskih jedinica micelija razvijenih na uzorcima biljnog tkiva sa simptomom B koji nisu bili podvrgnuti površinskoj sterilizaciji; oznake uzoraka UNS1B-UNS5B

Grafikon 7. Odnos ukupnog broja taksonomskih jedinica micelija razvijenih na uzorcima biljnog tkiva koje je pokazivalo simptom A, neovisno o površinskoj sterilizaciji

Grafikon 8. Odnos ukupnog broja taksonomskih jedinica micelija razvijenih na uzorcima biljnog tkiva koje je pokazivalo simptom B, neovisno o površinskoj sterilizaciji

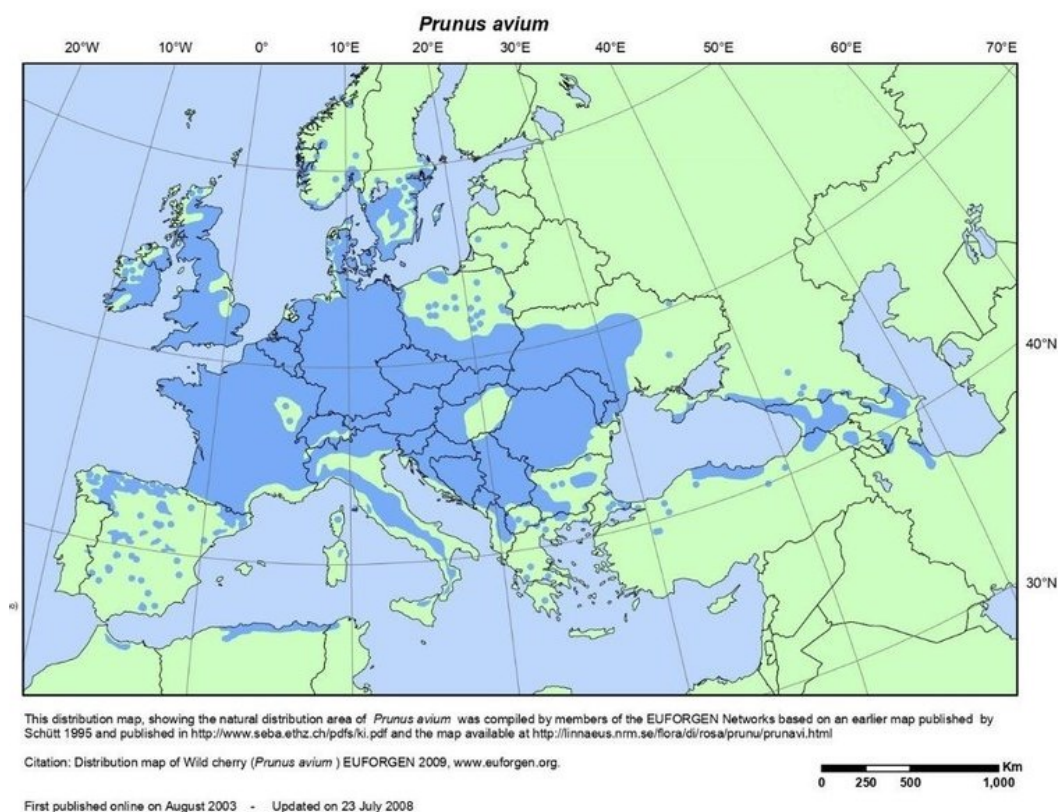
Grafikon 9. Odnos udjela prisutnih morfotipova u svim uzorcima simptomatičnog lisnog tkiva koje je pokazivalo simptom A, neovisno o površinskoj sterilizaciji

Grafikon 10. Odnos udjela prisutnih morfotipova u svim uzorcima simptomatičnog lisnog tkiva koje je pokazivalo simptom B, neovisno o površinskoj sterilizaciji

1. UVOD

1.1 Divlja trešnja (*Prunus avium* (L.) L.)

Divlja trešnja ili trešnja (*Prunus avium* (L.) L.) je autohtona listopadna vrsta iz porodice *Rosaceae* koja se fragmentarno rasprostire na području Europe, Male Azije, Krima, Kavkaza, Irana i sjeverne Afrike (Slika 1) (Franjić i Škvorc 2010). Najveća vrijednost visinske rasprostranjenosti divlje trešnje zabilježena je u Francuskoj i iznosila je 1900 metara nadmorske visine (Russel 2003).



Slika 1. Kartografski prikaz areala divlje trešnje (*Prunus avium* (L.) L.) (Izvor: www.euforgen.org)

Zahvaljujući jestivim plodovima, drvu visoke kvalitete i ornamentalnoj vrijednosti, divlja trešnja je danas prisutna u naturaliziranim populacijama daleko izvan područja svoje prirodne rasprostranjenosti. Prema Franjić i Škvorc (2010), *Prunus avium* predstavlja izrazito polimorfnu vrstu, s velikim brojem kultivara (sorti). Oplemenjene sorte divlje trešnje poznate su pod zajedničkim nazivom slatka trešnja (Tančeva Crmarić i sur. 2011).

Analize fosilnih ostataka s arheoloških nalazišta otkrivaju da konzumacija plodova divlje trešnje datira barem od trećeg tisućljeća prije Krista (Carey 2012). Smatra se kako ova vrsta potječe s Kavkaza (Russel 2003) te je zajedno s višnjom (*Prunus cerasus* L.) bila najprije uzgajana na području jugozapadne Azije, Turske i Grčke, nakon čega se proširila zapadnom Europom (Carey 2012).

Divlja trešnja raste kao stablo visine do 20 m koje se odlikuje monopodijalnim rastom, pravilnim habitusom i valjkastom krošnjom. Tanka, kožasta i tamnosiva kora debela dugo ostaje glatka i sjajna, a starenjem se ljušti u karakterističnim horizontalnim trakama (Idžojić 2013a). Korijenov sustav je srcast (Franjić i Škvorc 2010), s većim brojem dugačkog postranog korijenja koje se plitko razgranjuje rizosferom tla (Welk i sur. 2016). Zahvaljujući gustoj mreži postranog korijenja, divlja trešnja se koristi za učvršćivanje tla degradiranih terena (Norris i sur. 2008). Premda se pojavljuje na različitim tipovima tala, najbolje uspijeva na bogatom, neutralnom tlu umjerene vlažnosti (Franjić i Škvorc 2010), a ne podnosi teška, glinovita tla te poplavna staništa i područja sa stagnirajućom površinskom vodom (Russel 2003).

Naizmjenično raspoređeni na izbojku, listovi divlje trešnje su jednostavni, eliptičnoga oblika, šiljastog vrha te krupno napiljenoga ruba. U gornjem dijelu peteljke ili donjem dijelu plojke nalaze se dvije krupne, crvenkaste žlijezde (Idžojić 2013b). Pri dnu peteljke smješten je jedan par palistića koji rano otpadaju (Franjić i Škvorc 2010). *Prunus avium* počinje cvjetati u starosti od dvadeset do dvadeset i pet godina, s time da oplemenjene sorte počinju cvjetati već u starosti od četiri do petnaest godina. Cvjetovi su dvospolni i entomofilni te je više cvjetova smješteno u štitastim cvatovima na kratkim izbojcima. Cvjetanje se odvija u travnju, za vrijeme listanja (Idžojić, 2013c). Divlja trešnja dobro podnosi niske temperature, no cvjetovi često stradaju od kasnih proljetnih mrazeva (Russel 2003). Plodovi su ornitohorne, kuglaste, crvene ili crne jednosjemene koštunice čiji je mezokarp sočan i jestiv. Dozrijevanje plodova traje od svibnja do kolovoza (Idžojić 2013c).

Prunus avium predstavlja prijelaznu vrstu široke ekološke valencije koja raste kao pojedinačno stablo ili manja skupina stabala na rubovima šuma i šikara (Franjić i Škvorc 2010). Također naseljava šumske čistine, a kao pionirska vrsta u ranim stadijima sukcesije stvara povoljne ekološke uvjete za pridolazak klimatogenih vrsta drveća. Ova se šumska voćkarica i plemenita listača javlja kao sporedna vrsta drveća u mješovitim šumama (Welk i sur. 2016).

Dijagnostički je značajna vrsta u hrastovo-grabovim šumama srednjoeuropskoga karaktera, odnosno zajednicama sveze *Carpinion betuli* Isler 1931. Prisutna je u zajednici *Carpino betuli-Quercetum roboris* (Anić 1959) Rauš 1971, odnosno šumi hrasta lužnjaka i običnoga graba koja se u Hrvatskoj rasprostire na površini od oko 110 000 ha duž cijeloga toka rijeke Save i njenih pritoka. Osim toga, divlja trešnja je u Hrvatskoj dio flornog sastava zajednica sveze *Erythronio-Carpinion betuli* (Horvat 1938) Marinček in Wallnöfer et al. 1993 (ilirske hrastovo-grabove šume) koje se pružaju u brežuljkastom (kolinskom) vegetacijskom pojasu.

U kolinski pojas se spuštaju i acidotermofilne šume hrasta kitnjaka, pitomog kestena i obične breze, pa se divlja trešnja također može naći i u asocijacijama: *Quercus-Castaneetum sativae* Horvat 1938 (šumi hrasta kitnjaka i pitomoga kestena), *Festuco drymeiae-Quercetum petraeae* (Janković 1968) Hruška-Dell'Uomo 1975 (šuma hrasta kitnjaka s brdskom vlasuljom) i *Pteridio-Betuletum pendulae* (Rauš i Vukelić 1989) Trinajstić 2004. (šuma obične breze s bujadi). Pojavljuje se i u asocijaciji *Aposeridi foetidae-Castaneetum sativae* Medak 2011 (šumi pitomoga kestena s prasećim zeljem) koja se rasprostire u kolinsko-submontanskom pojasu sjeverozapadne i središnje Hrvatske (Vukelić 2012).

Divlja trešnja je heliofilna, mezofilna i brzorastuća vrsta (Franjić i Škvorc 2010) te je prikladna za uzgoj u kulturama kratkih ophodnji. Pokazuje veliki potencijal primjene u šumarstvu budući

da se može koristiti prilikom pošumljavanja neobraslog šumskog zemljišta, sanacije degradiranih terena kojima prijeti opasnost od erozije tla, popunjavanja u oplodnim sječama te osnivanja šumskih kultura na napuštenim poljoprivrednim površinama (Tančeva Crmarić i sur. 2011).

Drvo divlje trešnje je karakteristične crvenkaste boje, postiže visoke cijene na tržištu te se najčešće koristi u proizvodnji namještaja i glazbenih instrumenata. Zbog velike potražnje i nedovoljne količine dostupnog drva *Prunus avium*, u Europu se često uvozi sjevernoamerička vrsta *Prunus serotina* (Russel 2003). U nekoliko zemalja već su pokrenuti dugoročni programi oplemenjivanja divlje trešnje s ciljem povećanja kvalitete i proizvodnje njenog drveta (Diaz i Merlo 2008, Kobliha 2002).

1.2 Uzročnici gospodarski najznačajnijih gljivičnih bolesti lišća divlje trešnje u Republici Hrvatskoj

Zahvaljujući razlici u stanišnim uvjetima u odnosu na šumski ekosustav, u klonskim sjemenskim plantažama se može očekivati pojava i razvoj istih gljivičnih bolesti koje se javljaju i na kultivarima divlje trešnje u sustavu ekološkog i integriranog uzgoja. Sa stajališta zaštite bilja, *Prunus avium* nije zahtjevana vrsta. Međutim, uslijed znatnih odstupanja klimatskih prilika od višegodišnjih prosječnih vrijednosti, u plantažnim nasadima trešanja u Republici Hrvatskoj je u posljednjih nekoliko godina zabilježena prekomjerna pojava određenih kategorija štetnih organizama (Šubić 2016). U „Tehnološkim uputama za integriranu proizvodnju voća” (Petrović i sur. 2012) navedeni su sljedeći uzročnici ekonomski značajnih gljivičnih bolesti divlje trešnje u Republici Hrvatskoj: *Blumeriella jaapii* (uzročnik kozičavosti lišća), *Botrytis cinerea* (uzročnik sive plijesni), *Monilinia* spp. (uzročnici nekroze cvjetova, sušenja izbojaka i smeđe truleži plodova) i *Stigmata carpophila* (uzročnik šupljikavosti lišća). Vrste roda *Monilinia* i *Botrytis cinerea* glavni su uzročnici truleži plodova *Prunus avium* u plantažnim nasadima te izazivaju i najveće ekonomske gubitke (Adaskaveg i sur. 2000, Xu i sur. 2007, Holb 2008).

Budući da na simptomatičnom lišću ispitivanom u sklopu ovog rada nisu nađeni znakovi napada štetnih kukaca poput karakterističnih grizotina, uvijanja zelenog lišća ili prisutnosti različitih razvojnih stadija uši, ekskremenata i medne rose, ovim će potpoglavljem biti obuhvaćen pregled najznačajnijih gljivičnih bolesti divlje trešnje koje svojom simptomatologijom najviše odgovaraju zatečenom stanju u klonskoj sjemenskoj plantaži Kutina.

Pojava nekrotičnih lezija koje zahvaćaju prvenstveno lišće oboljelih biljaka, kao što je primijećeno na ispitivanim klonovima *Prunus avium* u klonskoj sjemenskoj plantaži Kutina, uklapa se u sliku napada nekoliko gospodarski značajnih askomicetnih patogena u koje se ubrajaju: *Apiognomonium erythrostoma*, *Blumeriella jaapii* i *Stigmata carpophila*. Znanstveni nazivi ovih gljivičnih patogena preuzeti su s mrežne stranice www.indexfungorum.org.

1.2.1 *Apiognomonium erythrostoma* (Pers.) Höhn.

Gljiva *Apiognomonium erythrostoma* (Pers.) Höhn., uzročnik uvijenosti i sušenja lišća, raširena je u mnogim europskim zemljama (UK CAB International 1993) te nekoliko zemalja istočne Azije. Smith i sur. (1998) smatraju kako je ova patogena vrsta fitosanitarni problem

prvenstveno u istočnoj Europi i Balkanskom poluotoku. Premda nema zabilježenih slučajeva introdukcije *A. erythrostoma* na nova područja, što bi zahtijevalo transport zaraženih biljaka s lišćem i plodovima, neke države ubrajaju ovu vrstu u karantenske štetne organizme (www.cabi.org).

Prema Hecht i Zinkernagel (2006), svi pripadnici roda *Prunus* predstavljaju potencijalne domaćine *A. erythrostoma*. Parazitira na samoniklim jedinkama *Prunus avium* u šumama i okućnicama, kao i na oplemenjenim sortama divlje trešnje u rasadnicima i plantažnim nasadima (<http://pinova.hr>).

Zaraze mladog lišća *Prunus avium* askosporama *Apiognomonina erythrostoma* ostvaruju se tijekom travnja, a intenzitet infekcija ovisi o količini i trajanju oborina. Budući da period inkubacije traje od tri do pet tjedana, prvi simptomi postaju vidljivi u lipnju (Cvjetković 2010) te uključuju naglo venuće, sušenje i smeđenje mladog lišća na vrhovima izbojaka. Na starijem lišću vidljiva je pojava crvenkastosmeđih pjega uočljivog klorotičnog ruba. Diskoloracija inficiranog lišća gotovo uvijek počinje od ruba plojke (<http://pinova.hr>).

Karakteristična slika napada *A. erythrostoma* odnosi se na izgled krošnje s ljevkaasto uvijenim suhim lišćem koje, zbog nemogućnosti stvaranja stanica pluta na bazi peteljke, ostaje pričvršćeno za izbojak tijekom čitavog vegetacijskog razdoblja (Slika 2) (<http://www.fazos.unios.hr>).

Osim nekroze i sušenja lišća, propadanja plodova i sušenja izbojaka, *A. erythrostoma* može u konačnici uzrokovati odumiranje oboljelih biljaka (Vončina i sur. 2013).



Slika 2. Izgled zaraženog lišća u krošnji (lijevo) i uvećani prikaz nekroze lišća *Prunus avium* uzrokovane gljivom *Apiognomonina erythrostoma* (desno) (Izvori: www.oekophys.wzw.tum.de i <https://nt.ars-grin.gov>)

1.2.2 *Blumeriella jaapii* (Rehm) Arx

Kozičavost lišća trešnje uzrokovana vrstom *Blumeriella jaapii* (Rehm) Arx (sinonim *Coccomyces hiemalis* Higgins) jedna je od najznačajnijih i najopasnijih gljivičnih bolesti *Prunus avium* (Heald 1933, Keitt i sur. 1937, Sjulín i sur. 1989) te je u Europi prvi puta zabilježena sredinom dvadesetoga stoljeća (Schuster i Tobutt 2004). *B. jaapii* je parazit vrsta iz roda *Prunus* koji u Hrvatskoj najveće štete čini na vrstama *Prunus avium* i *Prunus cerasus*. Pritom kolonizira

prvenstveno lišće, a mnogo rjeđe i peteljku, jednogodišnje izbojke, plod i stapku ploda. Krajem svibnja se na gornjoj strani plojke inficiranog lišća divlje trešnje primjećuju patološke promjene u vidu sitnih kružnih do ovalnih i zagasito ljubičastih pjega, promjera od jednog do tri milimetra (Slika 3) (<http://www.fazos.unios.hr/>).

S vremenom pjege poprimaju tamnosmeđu boju (Petrović i sur. 2012), a na naličju lista postaju vidljive izbočene bjelkaste nakupine plodišta gljive, odnosno acervula (Slika 3). Napredovanjem bolesti i ostvarivanjem sekundarnih infekcija, broj pjega se povećava u smjeru od ruba lista prema glavnoj žili, pa pjege u konačnici mogu zahvatiti veći dio lisne površine. Simptomi na plodovima uključuju pojavu nekrotičnih lezija s prljavobijelom prevlakom acervula (<http://www.fazos.unios.hr/>). Štete od napada gljive *B. jaapii* očituju se u preranom otpadanju zaraženoga lišća i pojavi defolijacije koja katkada nastupa već sredinom ljeta. Također dolazi do nedovoljnog odrvenjavanja izbojaka, slabijeg formiranja cvjetnih pupova, smanjenja vitaliteta (Schuster i Tobutt 2004) i odumiranja mlađih oboljelih jedinki u uvjetima niskih temperatura zraka zimi (Wharton i sur. 2003).

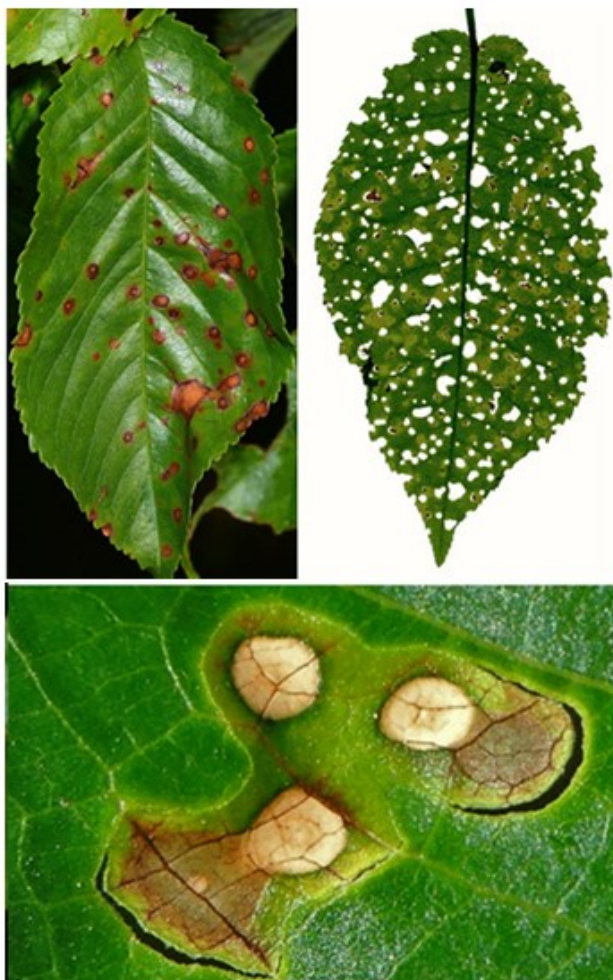


Slika 3. Uvećani prikaz nekrotičnih pjega s gornje strane plojke lista *Prunus avium* koje su uzrokovane gljivom *Blumeriella jaapii* (gore) i uvećani prikaz donje strane plojke lista *Prunus avium* s nekrotičnim područjima i izbočenim, bjelkastim masama konidija *Blumeriella jaapii* (dolje) (Autor: C. Van Steenwinkel. Izvor: <https://bladminers.nl>)

1.2.3 *Stigmina carpophila* (Lév.) M. B. Ellis

Stigmina carpophila (Lév.) M. B. Ellis (sinonim *Wilsonomyces carpophilus* (Lév.) Adask., J.M. Ogawa & E.E. Butler) je patogen koji napada domaćine roda *Prunus* uzrokujući bolest naziva šupljikavost ili rupičavost lista prunike. Domaćini *S. carpophila* su prvenstveno divlja trešnja, marelica (*Prunus armeniaca* L.) i lovorvišnja (*P. laurocerasus* L.) (Tomiczek i sur. 2007). Simptomi uključuju patološke promjene na lišću, izbojcima i plodovima, no najznačajniji aspekt bolesti predstavljaju infekcije lišća koje u početku rezultiraju gubitkom velikog dijela asimilacijske površine, a kasnije i defolijacijom (Ivanová i sur. 2012). Patogen inficira živo

tkivo kroz mehaničke ozljede i pupove, a nagli napad često slijedi nakon vlažnih i kišnih razdoblja u proljeće (Tomiczek i sur. 2007). Na lišću se simptomi očituju kao kružne tamnocrvene pjege oštih, tamnijih rubova. Napredovanjem bolesti, središnji dio pjege posmeđi i nekrotizira, a nekrotično tkivo otpada ostavljajući na listu karakteristične milimetarske perforacije (Slika 4) (Tomiczek 2007, Ivanová i sur. 2012). Na površini kore izbojaka pojavljuju se crvenkaste nekroze veličine nekoliko milimetara te je ponekad vidljivo curenje gumozne tvari. Na plodovima se primijećuju udubljene crvenosmeđe mrlje, a kasnije rupe koje podsjećaju na grizotine kukaca (Tomiczek i sur. 2007). Uz defolijaciju, *S. carpophila* također uzrokuje smanjenje količine uroda i slabljenje vitaliteta napadnutih stabala (Teviotdale i sur. 1999), a višegodišnji uzastopni napadi mogu dovesti do odumiranja mladih biljaka (Tomiczek i sur. 2007). Uz gljivu *S. carpophila*, vrlo slične simptome na lišću *Prunus avium* uzrokuje i niz drugih patogena poput bakterija *Xanthomonas arboricola* var. *pruni* (Ivanová i sur. 2012) i *Pseudomonas syringae* (Slika 5) te virusnih uzročnika poput skupine virusa prstenaste pjegavosti (Pleše i Juretić 1968). Pouzdana identifikacija i eliminacija potencijalnih uzročnika u ovakvim je slučajevima moguća samo uz primjenu molekularnih metoda.



Slika 4. Izgled simptoma na lišću *Prunus* sp. uslijed napada *Stigmina carpophila* (Autori: C. Quintin i L. Érsek. Izvori: <https://alchetron.com> i <https://bladmineerders.nl>)



Slika 5. Izgled nekrotičnih pjega na lišću i plodovima *Prunus* sp. uslijed napada *Pseudomonas syringae* (Izvor: <http://www.fazos.unios.hr>)

1.3 Klonske sjemenske plantaže i očuvanje genofonda divlje trešnje

U Republici Hrvatskoj su, kod većine gospodarski važnih vrsta šumskoga drveća već nekoliko desetljeća prisutni i prepoznati problemi biološke obnove, popunjavanja djelomično prirodno obnovljenih površina i pošumljavanja šumskih čistina. Osnivanje klonskih sjemenskih plantaža jedan je od načina nadoknade potrebne količine sjemena u godinama bez uroda ili sa slabim urodom (Kajba i sur. 2010). Klonske sjemenske plantaže mogu se definirati kao kulture heterovegetativno selekcioniranih superiornih stabala koja se međusobno oprašuju i oplođuju, pri čemu se ostvaruje genetska dobit od 10 % i više (Vidaković 1996, Vidaković i sur. 2000).

Proizvodnja sjemena u klonskim i generativnim sjemenskim plantažama veća je i češća u odnosu na prirodne sastojine i šumske kulture zahvaljujući provođenju pomotehničkih zahvata te mjera zaštite cvjetova i plodova od negativnog utjecaja različitih biotičkih i abiotičkih čimbenika. Osim osiguravanja učestalog uroda oplemenjenoga sjemena, podizanjem klonskih sjemenskih plantaža provodi se i zaštita genofonda šumskoga drveća budući da je odnos između veličine populacije i postotka očuvane heterozigotnosti tako sveden na minimalni gubitak ukupne aditivne genetske varijabilnosti (Kajba i sur. 2010).

Premda se na razini Europe *Prunus avium* ne smatra ugroženom vrstom, fragmentarna rasprostranjenost njenih populacija predstavlja značajan rizični čimbenik koji, uz globalnu promjenu klime, degradaciju i gubitak staništa, hibridizaciju s oplemenjenim sortama divlje trešnje (engl. *sweet cherry*), utjecaj bolesti i štetnika te nisku razinu prirodne obnove i kompeticiju s drugim biljnim vrstama, može dovesti do gubitka genetske raznolikosti. Zbog navedenih rizičnih čimbenika, klonske sjemenske plantaže učinkovit su način *ex situ* očuvanja genofonda divlje trešnje (Russel 2003), a očuvanje genetske strukture i primjena metoda oplemenjivanja osnova su održavanja adaptacijskog potencijala ove šumske voćkarice (Kajba i sur. 2006).

U šumama Republike Hrvatske divlja trešnja je zastupljena u udjelima od samo 0,3 do 1%. Zastupljenost divlje trešnje nastoji se povećati unošenjem sadnica u šumske sastojine u državnom, ali i privatnom vlasništvu. Tako korištene sadnice trebaju biti genetski superiorne,

odnosno proizvedene iz sjemena sakupljenoga u klonskoj sjemenskoj plantaži (www.savjetodavna.hr).

Kajba i sur. (2010) navode kako su u Hrvatskoj, sukladno podjeli na ekogeografske sjemenske regije i zone, osnovane tri proizvodne klonske sjemenske plantaže hrasta kitnjaka (*Quercus robur* L.), dvije poljskog jasena (*Fraxinus angustifolia* Vahl) te po jedna plantaža hrasta kitnjaka (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.), divlje trešnje (*Prunus avium* (L.) L.) i crnog bora (*Pinus nigra* J. F. Arnold).

2. CILJ RADA

Sukladno podacima iz dostupne literature, na području Europe je rašireno nekoliko gljivičnih patogena divlje trešnje čiji napadi izazivaju veće štete i ekonomske gubitke. Potreba za provođenjem istraživanja mikobioma lišća divlje trešnje, s naglaskom na utvrđivanje prisutnosti potencijalno štetnih i patogenih vrsta, proizlazi iz činjenice kako su takva istraživanja na europskoj razini još uvijek malobrojna.

Nakon izvršene procjene zdravstvenog stanja klonova divlje trešnje u klonskoj sjemenskoj plantaži Kutina, glavni cilj ovoga rada odnosio se na identifikaciju mogućih uzročnika nekrotičnih lezija koje su zahvaćale samo lišće vizualno zdravih stabala. U tu svrhu provedena je izolacija micelija iz prikupljenih uzoraka simptomatičnog lisnog tkiva te njihov uzgoj na hranjivim podlogama u Petrijevim zdjelicama. Identifikacija taksonomskih jedinica izoliranih micelija ostvarena je primjenom molekularnih metoda. Tijekom provedbe ovoga istraživanja, uzorci simptomatičnog tkiva podijeljeni su u više kategorija s obzirom na primjenu površinske sterilizacije kako bi se dobio uvid u strukturu prisutne zajednice gljiva te utvrdio njen utjecaj na vitalitet promatranih stabala.

3. MATERIJALI I METODA RADA

3.1 Područje istraživanja

Procjena zdravstvenog stanja i postupak uzimanja uzoraka simptomatičnog lišća provedeni su nad stablima divlje trešnje (*Prunus avium* (L.) L.) u klonskoj sjemenskoj plantaži smještenoj u Šartovcu, gospodarskoj jedinici Kutinske prigorske šume 40 M, Šartovačko brdo (Slika 6). Klonska sjemenska plantaža (u daljnjem tekstu KSP) Kutina osnovana je 2001. godine, zauzima površinu od oko dva hektara te se nalazi u vlasništvu tvrtke Hrvatske šume d.o.o., Uprava šuma podružnica Zagreb, Šumarija Kutina (www.savjetodavna.hr).

Prilikom osnivanja plantaže, vanjski suradnici na projektu bili su Fakultet šumarstva i drvne tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatski šumarski institut i Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Slične klonske sjemenske plantaže osnovane su u Njemačkoj i Belgiji, no 2001. godine KSP Kutina je bila ujedno jedina takva plantaža divlje trešnje u Europi (<https://kutinaneews.wordpress.com>).

U svrhu odabira genetski superiornih stabala (plus stabala) za podizanje KSP Kutina, provedena je selekcija 27 stabala divlje trešnje na temelju osam fenotipskih kriterija (Katičić Bogdan i sur. 2015). Plus stabla su odabrana iz državnih šuma, s područja više Uprava. U početku podizanja plantaže posađeno je 500 stabala, a 2013. godine plantaža je proširena te je posađeno dodatnih 245 stabala (www.savjetodavna.hr). KSP Kutina osnovana je u cilju povećanja proizvodnje kvalitetnog drva divlje trešnje te izvoza na inozemno tržište. Sjeme se također većinom koristi za proizvodnju sadnica namijenjenih pošumljavanju neobraslog šumskog zemljišta, obnovi šumskih sastojina i povećanju postojećeg postotka zastupljenosti *Prunus avium* u šumama Republike Hrvatske te proizvodnji podloga u voćarstvu (www.agroklub.com).

Negativni utjecaji globalne promjene klime otežavaju gospodarenje sjemenskim plantažama (Kajba i sur. 2010). Stoga je u KSP Kutina postavljen moderni sustav navodnjavanja, zaštitna mreža od tuče i stroj za zaštitu od mraza. Osim toga, postavljena su staništa za solitarne pčele kako bi se osiguralo oprašivanje cvjetova pri nižim vrijednostima srednje temperature zraka u proljeće (www.savjetodavna.hr).



Slika 6. Klonska sjemenska plantaža divlje trešnje na području Šumarije Kutina (Izvor: www.savjetodavna.hr)

3.2 Procjena zdravstvenog stanja stabala divlje trešnje i prikupljanje uzoraka na terenu

Procjena zdravstvenog stanja klonova divlje trešnje u KSP Kutina provedena je 26. svibnja 2020. godine vizualnim pregledom stabala, s naglaskom na utvrđivanje stanja krošnje. U ovome istraživanju prvenstveno simptomi gljivičnih bolesti na nadzemnim biljnim dijelovima budući da se u vremenskom razdoblju prikupljanja uzoraka na kori izbojaka i lišću

divlje trešnje već mogu uočiti simptomi gljivičnih infekcija i znakovi napada drugih potencijalno štetnih organizama.

Premda je sredinom travnja 2020. godine zabilježena pojava mraza koji je izazvao štete na poljoprivrednim kulturama u većem dijelu zemlje (<https://meteo.hr>, www.agroklub.com, www.savjetodavna.hr), u klonskoj sjemenskoj plantaži Kutina nije došlo do pojave značajne osutosti krošanja ili drugih pokazatelja koji bi upućivali na narušen vitalitet promatranih stabala. Međutim, sporadično kroz cijelu plantažu, na manjem broju lišća u krošnji vizualno zdravih stabala, primijećena je pojava nekrotičnih lezija.

U nekim slučajevima nekrotične lezije zahvatile su polovicu čitave površine lista (Slika 9), dok su se u drugim slučajevima pojavljivale kao veće, okrugle do elipsoidne pojedinačne smeđe pjegice (Slika 7) ili pak kao veći broj manjih, okruglih nekrotičnih pjega (Slika 8). Temeljem načina širenja nekrotičnih lezija, procijenjeno je da se radi o dva različita simptoma koji uključuju nekrozu lišća, a klasificirani su kao simptom A i simptom B.

Simptom A podrazumijevao je pojavu uglavnom pravilnih, okruglih do elipsoidnih nekrotičnih pjega za koje je specifično svjetlosmeđe obojenje u unutrašnjosti pjegice i tamni rub koji predstavlja jasnu granicu prema zdravom tkivu. Smeđe pjegice vidljive su s obje strane plojke lista, s time da je rub pjegice čak izraženiji na naličju plojke. S vremenom dio nekrotičnog tkiva otpadne, a na listu ostaju perforacije. Veće pravilne nekrotične pjegice pojavljivale su se uglavnom pojedinačno, šireći se od ruba lista prema unutrašnjosti (Slika 7). Simptom A također je obuhvaćao i pojavu većeg broja manjih, okruglih nekrotičnih lezija koje su također pokazivale tamnije obojenje na rubu, ali su uglavnom zahvaćale tkivo uz lisne žile (Slika 8). Simptom B označavao je pojavu nekrotičnih lezija nepravilnoga oblika koje su zauzimale puno veću površinu lista u odnosu na prethodno opisani simptom (Slika 9). Usto, za simptom B karakteristično je da uključuje svjetlosmeđe nekroze koje se uvijek šire međužilnim tkivom od ruba prema unutrašnjosti lista, a granica prema zdravom lisnom tkivu je tamnosmeđa i difuzna (Slika 10).

Alat korišten na terenu (škare) je prije uzimanja svakog novog uzorka očišćen i steriliziran prskanjem otopinom etanola (C_2H_5OH , 70%). Svježe sakupljeno simptomatično lišće pohranjeno je, ovisno o tipu simptoma, u dvije odvojene čiste plastične vrećice te je do obrade skladišteno u hladnjaku na temperaturi od 4°C.

S obzirom da se u ovom radu nije ispitivala unutarklonska otpornost na određene patogene te budući da su nekrotične lezije zahvaćale lišće različitih klonova, dvije kategorije simptoma su promatrane zajednički za sve klonove.



Slika 7. Izgled simptoma A na gornjoj strani plojke lista *Prunus avium* iz KSP Kutina – pojedinačna nekrotična pjega širi se od ruba lista prema unutrašnjosti (lijevo) te izgled simptoma A na donjoj strani plojke istoga lista (desno)



Slika 8. Donja strana plojke lista *Prunus avium* sakupljenog u KSP Kutina koji pokazuje simptom A - više nekrotičnih lezija pojavljuje se uz lisne žile (lijevo) i uvećani prikaz simptoma A – nekrotične pjege uz lisne žile (desno) (Autor: J. Kranjec Orlović)



Slika 9. Izgled simptoma B na gornjoj strani plojke lista klona divlje trešnje iz KSP Kutina – nekrotična lezija širi se uz lisne žile, od ruba lista prema unutrašnjosti zahvaćajući polovicu površine plojke (lijevo) te izgled simptoma B na donjoj strani plojke istoga lista (desno)



Slika 10. Uvećani prikaz simptoma B – širenje nekroze uz lisne žile, od ruba prema unutrašnjosti lista (Autor: J. Kranjec Orlović)

3.3 Izolacija micelija iz simptomatičnog lisnog tkiva i dobivanje čistih kultura

Postupak izolacije micelija gljiva prisutnih u unutrašnjosti ili na površini simptomatičnog lišća klonova divlje trešnje iz KSP Kutina proveden je u Laboratoriju za patologiju drveća Zavoda za zaštitu šuma i lovno gospodarenje Fakulteta šumarstva i drvne tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Prva obrada uzoraka lišća za izolaciju micelija izvršena je unutar 24 sata od prikupljanja uzoraka s terena te je uključivala izolaciju micelija iz deset uzoraka lišća sa simptomom A i deset uzoraka lišća sa simptomom B. Ostatak simptomatičnog lišća koji je sakupljen, a nije bio tom prilikom obrađen, skladišten je u uvjetima temperature od 4°C radi mogućnosti daljnjeg korištenja.

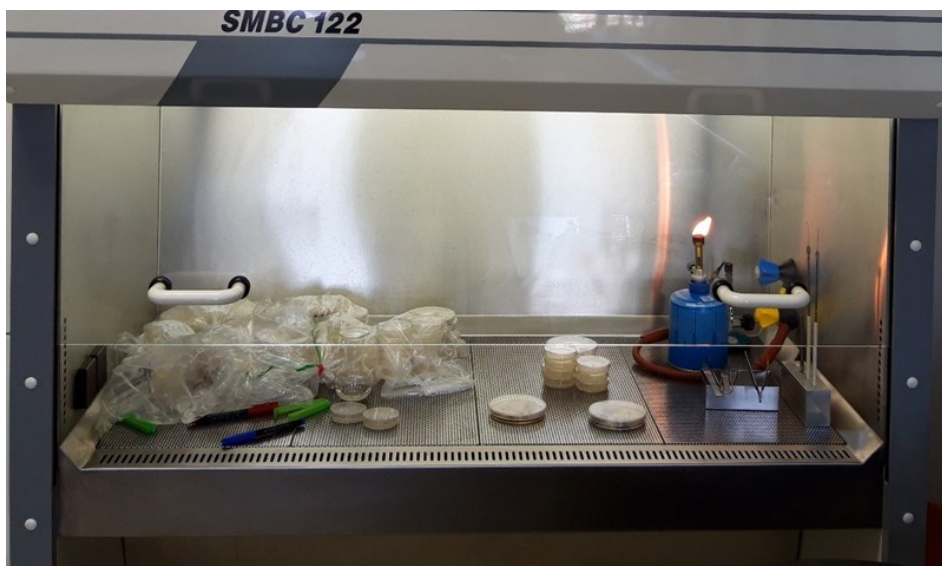
Svi postupci koji su tijekom istraživanja zahtijevali manipulaciju s uzorcima biljnog tkiva i micelija (obrada simptomatičnog lišća i priprema uzoraka biljnog tkiva za izolaciju micelija, provjera rasta micelija, presađnja micelija u svrhu dobivanja čistih kultura) obavljani su u laminarnom kabinetu za rad u atmosferi čistog zraka (u daljnjem tekstu: laminarni kabinet) (Slika 11) čija je unutrašnjost prethodno očišćena papirnatim ručnikom navlaženim otopinom etanola (C_2H_5OH , 96%). Prije same pripreme uzoraka biljnog tkiva, sav potreban pribor za rad steriliziran je prskanjem (daska za rezanje) ili uranjanjem u 96% otopinu etanola (dva skalpela, dvije manje i jedna veća pinceta), nakon čega je pribor izložen UV svjetlu na 30 minuta. U svrhu uklanjanja površinskih nečistoća i mogućih kontaminanata, odabrano simptomatično lišće podvrgnuto je površinskoj sterilizaciji. Tijekom prve obrade uzoraka biljnog tkiva, obavljene 27. svibnja 2020. godine, postupak površinske sterilizacije uključivao je uranjanje simptomatičnog lišća u 2% otopinu natrijevog hipoklorita ($NaOCl$) na 1-2 sekunde, nakon čega je uslijedilo ispiranje u sterilnoj destiliranoj vodi (sterilizacija na 121 °C, 20 minuta) u trajanju od 10 sekundi.

Nakon površinske sterilizacije, simptomatično lišće je položeno na papirnate ručnike i ostavljeno da se suši pod UV svjetlom u laminarnom kabinetu. Uzorci biljnog tkiva za izolaciju micelija uzeti su iz prijelazne zone nekrotičnog i zdravog tkiva, odnosno sa samoga ruba nekroze kako bi se istovremeno obuhvatio dio zdravoga tkiva, nekrotičnoga tkiva i linije prijelaza u kojoj je aktivnost mogućeg uzročnika nekroze najintenzivnija. Komadići biljnog tkiva usitnjeni su na površinu od 1 cm² (5 mm x 5 mm) te položeni na hranjive podloge u Petrijeve zdjelice promjera 90 mm. U ovome istraživanju, kao hranjiva podloga za rast izoliranih micelija i njihovih čistih kultura, korišten je PDA agar (Potato Dextrose Agar, ThermoFischer Scientific, SAD) obogaćen antibiotikom (streptomycin sulfat, 0,2g/l L, Sigma-Aldrich, SAD).

U svaku Petrijevu zdjelicu promjera 90 mm i ispunjenu s prosječno 20 ml PDA položena su u pravilnom razmaku 4 uzorka (komadića) simptomatičnog lisnog tkiva. Razmak između uzoraka osigurao je nesmetan razvoj prisutnih gljiva bez ispreplitanja hifa i početne kompeticije između micelija različitih jedinki. Sve Petrijeve zdjelice korištene u svim dijelovima istraživanja nosile su svoju oznaku koja je uključivala kraticu uzorka, simptoma i datum obrade uzorka (primjerice L1A 3.6.).

Budući da je pribor za rezanje lisnog tkiva tijekom pripreme uzoraka bio u direktnom kontaktu s mogućim uzročnicima nekroza bilo je nužno da se, prije prelaska na obradu sljedećeg uzorka

biljnog tkiva (s drugoga lista), korišteni skalpeli i pincete urone u otopinu etanola (96%) te dodatno polože iznad plamena plamenika unutar laminarnog kabineta sve dok etanol ne ishlapi. Također je između uzoraka obavljena sterilizacija daske za rezanje i unutrašnjih ploha laminarnog kabineta prskanjem otopinom etanola (96%) te brisanjem papirnatim ručnikom.



Slika 11. Laminarni mikrobiološki kabinet za rad u atmosferi čistog zraka

Osamdeset uzoraka lisnog tkiva, pripremljenih 27. svibnja, inkubirano je u komori rasta na 23°C u uvjetima tame. Tijekom sljedećih nekoliko dana praćena je eventualna pojava i rast micelija iz obrađenih uzoraka.

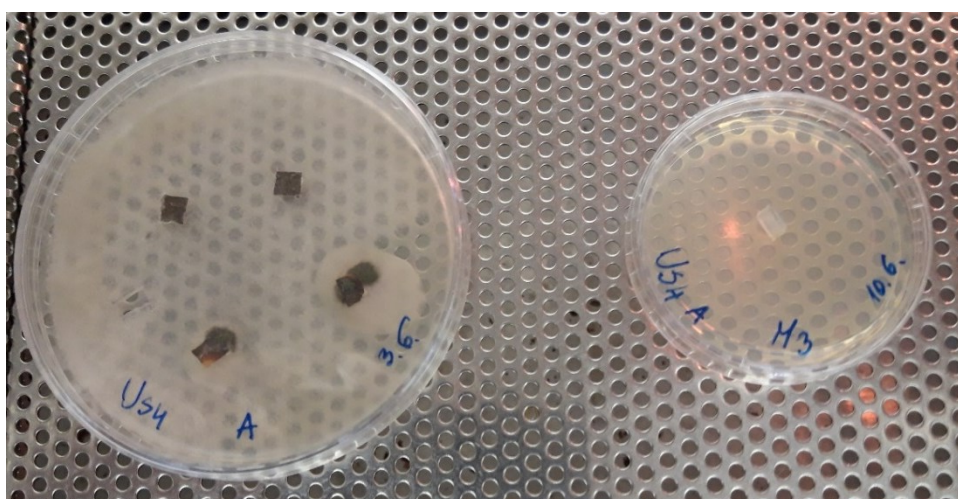
Druga priprema simptomatičnog lišća za postupak izolacije micelija provedena je 3. lipnja 2020. godine, odnosno tjedan dana nakon prve obrade. Potreba za izolacijom micelija iz novih dvadeset uzoraka simptomatičnog lišća proizlazila je iz relativno slabog razvoja micelija iz prethodno pripremljenih uzoraka koji su bili površinski sterilizirani otopinom natrijeva hipoklorita (NaOCl, 2%). Stoga je druga obrada simptomatičnog lišća uključivala 2 kategorije uzoraka. Prvoj kategoriji je pripadalo 5 listova sa simptomom A i 5 listova sa simptomom B koji su površinski sterilizirani uranjanjem u otopinu etanola (C_2H_5OH , 70%) u trajanju od 1-2 sekunde i ispiranjem u sterilnoj destiliranoj vodi u trajanju od 10 sekundi. Drugu kategoriju uzoraka predstavljalo je 5 listova sa simptomom A i 5 listova sa simptomom B koji nisu podvrgnuti površinskoj sterilizaciji te su služili kao kontrolna skupina za uspoređivanje s površinski steriliziranim uzorcima.

Druga priprema uzoraka biljnog tkiva za izolaciju micelija je također uključivala polaganje po 4 komadića simptomatičnog lisnog tkiva površine 1 cm² na hranjive podloge (PDA obogaćen streptomycin sulfatom, 0,2 g/l L) u Petrijeve zdjelice promjera 9 cm te inkubaciju uzoraka u komori rasta na 24 °C u uvjetima tame.

Dvadeset Petrijevih zdjelica s uzorcima biljnog tkiva koji su površinski sterilizirani u 2% otopini natrijeva hipoklorita je, ovisno o manifestiranom simptomu, nosilo oznake od L1A do

L10A te od L1B do L10 B. Deset Petrijevih zdjelica s uzorcima listnog tkiva koji su površinski sterilizirani u 70% otopini etanola nosilo je oznake od US1A do US5A i od US1B do US5B, dok je preostalih deset Petrijevih zdjelica s nesteriliziranim uzorcima označeno kao UNS1A-UNS5A te UNS1B-UNS5B.

U cilju dobivanja čistih kultura micelija koji će u daljnjem postupku biti probrani za izolaciju DNK, 3. lipnja 2020. godine izvršena je presadnja micelija koji su se razvili iz uzoraka biljnog tkiva koje je površinski sterilizirano otopinom natrijeva hipoklorita (2%). Ponovna presadnja spomenutih uzoraka micelija obavljena je 10. lipnja 2020. godine, kao i presadnja micelija razvijenih iz preostalih kategorija uzoraka listnog tkiva (površinska sterilizacija sa 70% otopinom etanola i bez površinske sterilizacije) (Slika 12). Postupak presađivanja micelija je uključivao izrezivanje komadića rubnog dijela micelija dimenzija 5 mm x 5mm x 5mm, odvajanje od ostatka jedinke pomoću steriliziranog skalpela i pincete te polaganje uzorka micelija na PDA podlogu u Petrijevu zdjelicu promjera 55 mm na način da uzorak micelija ostvari puni kontakt s hranjivom podlogom. Nakon presadnje jednoga micelija te prije prelaska na drugi micelij (jedinu), korišteni skalpel i pinceta sterilizirani su uranjanjem u 96% otopinu etanola i držanjem iznad plamena do isparavanja etanola. Četrdeset Petrijevih zdjelica s čistim kulturama micelija inkubirano je u komori rasta na 10°C.



Slika 12. Uzorci biljnog tkiva oznake US4A na kojima je došlo do razvoja micelija u Petrijevoj zdjelici promjera 90 mm i presađeni micelij te jedinke u Petrijevoj zdjelici promjera 55 mm

3.4 Primjena molekularnih metoda u identifikaciji taksona izoliranih micelija

Dobivene čiste kulture micelija su na temelju morfoloških značajki promatranih golim okom grupirane u morfotipove. Promatrane morfološke značajke odnosile su se na boju i teksturu micelija, obojenje hranjive podloge, boju na poleđini Petrijeve zdjelice te brzinu rasta micelija. Za svaki utvrđeni morfotip odabran je jedan reprezentativni izolat za postupak ekstrakcije DNK i u konačnici identifikaciju vrste. Prvotno je izdvojeno 28 morfotipova, označenih Z1-Z27 i *Tricho* spp. Međutim, nakon pomnijeg promatranja micelija, odlučeno je da se morfotip *Tricho*

spp. (smatralo se da predstavlja vrste iz roda *Trichoderma*) ipak uključi u morfotip oznake Z9. Izuzetak su činila dva izolata označena također *Tricho* spp, za koje je utvrđeno da pokazuju dovoljno morfoloških razlika da ih se uvrsti u zasebna dva morfotipa (oznake Z26 NOVI i Z27 NOVI). Također je izvršeno udruživanje i nekih drugih micelija u zajedničke morfotipove koji su tek u kasnijem razvoju (do 24. lipnja, kada je obavljeno razvrstavanje morfotipova) pokazali izraženije morfološke sličnosti te je naposljetku izdvojen 21 morfotip.

Izolacija DNK iz 21 reprezentativnog micelija izvršena je metodom isoljavanja. Postupak je započeo odvajanjem (struganjem) micelija od njegove hranjive podloge pomoću steriliziranog skalpela. Pritom je bilo potrebno micelij pažljivo ukloniti s hranjive podloge kako ostaci PDA ne bi dospjeli u mikroeprevetu i kontaminirali sadržaj. Sastrugani micelij je steriliziranom pincetom unešen u mikroeprevetu sa sterilnom kuglicom. Nakon što je odvagano približno 0,05 g micelija, pomoću mikropipete je dodano 300 µL pufera za lizu (2x STE/10% SDS pufer). Postupak je ponovljen za svaki izolat. Homogenizacija tkiva postignuta je u uređaju TissueLyser vibriranjem stalka s mikroeprevetama frekvencijom 30 Hz u trajanju od 3 minute. U svaku mikroeprevetu je otpipetirano 150 µL 3M natrijevog acetata pH 5,2 te su potom mikroeprevete inkubirane 10 minuta na temperaturi -20°C. Sljedeći korak uključivao je centrifugiranje mikroepreveta u Eppendorf AG 5804 R laboratorijskoj centrifugi na 13 000 rpm u trajanju od 5 minuta. Supernatant je otpipetiran u nove mikroeprevete uz dodatak jednakog omjera izopropanola (otprilike 250-300 µL). Mikroeprevete su inkubirane 5 minuta na RT, a zatim ponovno podvrgnute centrifugiranju na 13 000 rpm u trajanju od 5 minuta. Supernatant je dekantiran, a talog ispran s 500 µL 70% etanola. Mikroeprevete su zatim treći put podvrgnute centrifugiranju 5 minuta na 13 000 rpm, a supernatanti su pažljivo mikropipetom uklonjeni iz mikroepreveta. Dobiveni talog DNK je osušen, potom otopljen u 50 µL TE pufera te ostavljen preko noću u hladnjaku na 4°C kako bi se nukleinske kiseline hidratizirale i u potpunosti otopile. Uzorci izolirane DNK su do daljne obrade bili pohranjeni na 4°C.

U lančanoj reakciji polimerazom (PCR) umnažana je ITS regija izolirane genomske DNA (Schoch i sur. 2012) korištenjem početnica ITS1-F (5'CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA3') i ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') (Gardes i Bruns 1993, White i sur. 1990). Konačne koncentracije pojedinih sastojaka smjese za PCR (Tablica 1) te uvjeti reakcije (Tablica 2) određeni su prema Bakys (2013).

Tablica 1. Sastav smjese za izvođenje PCR reakcije

Sastojak*	Konačna koncentracija za reakciju
<i>Taq</i> DNA polimeraza	1 U/50 µl
početnica ITS1	0,2 µM
početnica ITS4	0,2 µM
dNTP smjesa	0,2 mM

MgCl₂	2,75 mM
pufer za PCR	1 x
sterilna H₂O	Do volumena 50 ul
DNA kalup	3-90 ng/μl

*Za PCR su korišteni reagensi proizvođača Sigma-Aldrich (SAD)

Tablica 2. Uvjeti lančane reakcije polimerazom

Početna denaturacija	35 ciklusa			Završno produljivanje lanca DNA
	Denaturacija	Sparivanje početnica	Produljivanje lanca DNA	
5 min na 95 °C	30 s na 95 °C	45 s na 50 °C	90 s na 72 °C	5 min na 72 °C

Za izolate oznaka Z25 i Z26 je u lančanoj reakciji polimerazom umnažana i EF1 (elongation factor) regija DNK pomoću početnica EF1-728F i EF1-986R (Carbone i Kohn 1999). Konačne koncentracije pojedinih sastojaka smjese za PCR, kao i uvjeti reakcije određeni su prema Al-Sadi i sur. (2015). Specifičnost, duljina (pb) te približna koncentracija dobivenih PCR produkata provjerene su elektroforezom u 1,5 % agaroznom gelu (0,375 g agaroze u 25 ml 1x TBE (89 mM Tris-borat, 2 mM EDTA) pufera, Lonza Rockland, SAD) pri naponu od 55 V te u trajanju od 90 minuta. U gel se prethodno dodavala boja za vizualizaciju nukleinskih kiselina GelStar Nucleic Acid Gel Stain (Lonza Rockland, SAD) konačne koncentracije 1x. U jažice gela je nanošeno po 1 μl svakog PCR produkta pomiješanoga s 4 μl sterilne destilirane vode (razrjeđenje zbog visoke koncentracije dobivenih produkata) te 1 μl pufera za nanošenje uzoraka (6x DNA Loading Buffer, TransGen Biotech, Kina).

Tijekom svake izvođene elektroforeze u jednu od jažica nanošen je molekularni marker poznate veličine (100 bp DNA Ladder, TransGen Biotech, Kina) radi procjene duljine i koncentracije PCR produkata. Nakon završene elektroforeze, PCR produkti su vizualizirani na gelu i zatim fotografirani pomoću UV transiluminatora s kamerom (Bio-Imaging Systems DNR, MiniBIS Pro) te računalnog programa GelCapture. Izolacija genomske DNA iz odabranih čistih kultura micelija te umnažanje ciljanih sekvenci (ITS regije) u lančanoj reakciji polimerazom (PCR) izvršeni su u Molekularno-biološkom laboratoriju Zavoda za šumarsku genetiku, dendrologiju i botaniku na Fakultetu šumarstva i drvne tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Dobiveni nepročišćeni PCR produkti su slani u Macrogen Inc. (Amsterdam, Nizozemska) na sekvenciranje.

Kromatogrami dobiveni sekvenciranjem su provjereni i obrađeni u računalnom programu BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.2.5 (Hall 1999). Identifikacija izolata izvršena je primjenom algoritma BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) koji omogućuje usporedbu obrađenih sekvenci s postojećima u bazi gena NCBI GenBank (Altschul i sur. 1990). Za

identifikaciju na razini vrste u obzir su uzimane sekvence s podudarnošću od najmanje 98 % na najmanje 80 % duljine ispitivane sekvence, dok su one s podudarnošću od 94 – 97 % na najmanje 80 % duljine ispitivane sekvence korištene za identifikaciju na razini roda ili druge više taksonomske jedinice (Bakys i sur. 2009a, Bakys i sur. 2009b, Bakys i sur. 2011). Znanstveni nazivi taksona preuzeti su s mrežne stranice www.indexfungorum.org.

4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

4.1 Taksoni izoliranih gljiva prema bazi gena NCBI GenBank

Nakon identifikacije taksonomskih jedinica gljiva razvijenih na uzorcima lišća klonova divlje trešnje iz KSP Kutina, utvrđena je prisutnost barem četrnaest različitih taksona (pojedini miceliji su zbog velike srodnosti identificirani kao dvije moguće vrste) koji su navedeni u tablici 3.

Tablica 3. Prikaz taksona izoliranih gljiva sukladno podacima iz baze NCBI GenBank

Oznaka morfotipa	Korištena početnica	Duljina analizirane sekvence (pb)	Takson najveće podudarnosti	Podudarnost (%)	Pokrivenost sekvence (%)
Z1	ITS1F	527	<i>Cladosporium</i> sp.	100	99
Z4	ITS1F	588	<i>Cladosporium</i> sp.	96,52	48
Z7	ITS1F	568	<i>Aureobasidium pullulans</i>	100	99
Z8	ITS1F	566	<i>A. pullulans</i>	99,82	99
Z9	ITS1F	525	<i>Botrytis cinerea</i>	100	99
Z10	ITS1F	589	<i>Paraconiothyrium</i> sp.	100	99,66
Z11	ITS1F	519	<i>Aposphaeria corallinolutea</i> / <i>Dendrophoma pleurospora</i>	99	99,81/99,61
Z12	ITS1F	590	<i>Alternaria infectoria</i> / <i>A. caespitosa</i>	99,49	100
Z13	ITS1F	584	<i>Cryptosphaeria ligniota</i>	100	97
Z14	ITS1F	578	<i>Paraconiothyrium brasiliense</i>	100	100
Z15	ITS1F	1007	<i>Dothiora</i> sp.	91,74	99
Z16	ITS1F	580	<i>A. pullulans</i>	100	99
Z17	ITS1F	545	<i>Fusarium sporotrichioides</i>	99,63	100
Z19	ITS1F	542	<i>Epicoccum nigrum</i>	99,82	100
Z20	ITS1F	530	<i>E. nigrum</i>	100	100
Z21	ITS1F	529	<i>Epicoccum</i> sp.	99,81	99
Z22	ITS1F	524	<i>Epicoccum nigrum</i> / <i>E. layuense</i>	100	100

Z23	ITS1F	520	<i>E. nigrum</i>	99,81	100
Z24	ITS1F	521	<i>E. nigrum</i>	100	100
Z25	ITS1F	571	<i>Daldinia pyrenaica</i>	99,65	99
Z26	ITS1F	537	<i>B. cinerea</i>	99,81	100
Z26 NOVI	728F+986R	Nema podudarajućih rezultata			
Z27 NOVI	728F+986R	315	<i>B. cinerea</i> (<i>Botryotinia fuckeliana</i>) ¹	98,41	100

¹*Botryotinia fuckeliana* je savršeni (telemorfni) stadij vrste *Botrytis cinerea*.

Za većinu morfotipova miceliji su identificirani do razine vrste. Međutim, podudarnost sekvence izolirane DNK četiriju izolata bila je manja od 99 % na najmanje 80 % duljine ispitivane sekvence te je stoga njihova identifikacija mogla biti utvrđena samo do razine roda. Neovisno o tipu simptoma i načinu površinske sterilizacije, iz simptomatičnog lisnog tkiva je izolirano sveukupno šesnaest jedinki kojima nije bilo moguće utvrditi taksonomski status, odnosno ostale su neidentificirane. Utvrđene taksonomske jedinice i odgovarajući morfotipovi reprezentativnih izolata prikazani su u tablici 4.

Tablica 4. Pregled morfotipova i odgovarajućih taksona

NAZIV I OZNAKA MORFOTIPA	TAKSON
Morfotip 1 (Z1)	<i>Cladosporium</i> sp.
Morfotip 2 (Z2, Z7 i Z27)	Neidentificirano
Morfotip 3 (Z3 i Z4)	<i>Cladosporium</i> sp.
Morfotip 4 (Z5 i Z6)	Neidentificirano
Morfotip 5 (Z7 i Z8)	<i>Aureobasidium pullulans</i>
Morfotip 6 (Z9, Z26 i <i>Tricho.</i> spp-osim na uzorcima L1A i L10A)²	<i>Botrytis cinerea</i>
Morfotip 7 (Z10)	<i>Paraconiothyrium</i> sp.
Morfotip 8 (Z11)	<i>Aposphaeria corallinoluta</i> / <i>Dendrophoma pleurospora</i>
Morfotip 9 (Z12)	<i>Alternaria infectoria</i> / <i>A. caespitosa</i>
Morfotip 10 (Z13)	<i>Cryptosphaeria ligniota</i>
Morfotip 11 (Z14)	<i>Paraconiothyrium brasiliense</i>
Morfotip 12 (Z15)	<i>Dothiora</i> sp.
Morfotip 13 (Z16)	<i>Aureobasidium pullulans</i>
Morfotip 14 (Z17)	<i>Fusarium sporotrichioides</i>
Morfotip 15 (Z18)	Neidentificirano
Morfotip 16 (Z19, Z20, Z23 i Z24)	<i>Epicoccum nigrum</i>
Morfotip 17 (Z21)	<i>Epicoccum</i> sp.
Morfotip 18 (Z22)	<i>Epicoccum nigrum</i> / <i>E. layuense</i>
Morfotip 19 (Z25)	<i>Daldinia pyrenaica</i>
Morfotip 20 (26 NOVI)	Neidentificirano
Morfotip 21 (27 NOVI)	<i>Botrytis cinerea</i> (<i>Botryotinia fuckeliana</i>)

²*Oznaka Tricho. spp.* korištena je kao kratica za morfotip za koji se pretpostavljalo da predstavlja vrste iz roda *Trichoderma*, no morfološki je odgovarao i morfotipu 9. Nakon postupka izolacije DNK iz reprezentativnih micelija i sekvenciranja izolirane DNK, utvrđeno je da morfotipovi označeni kao *Tricho. spp.* i Z9 odgovaraju istoj vrsti - *Botrytis cinerea*.

Tablica 5. Pregled prisutnih morfotipova i utvrđenih taksonomskih jedinica micelija razvijenih iz tkiva koje je pokazivalo simptom A

Oznaka uzorka (Petrijeve zdjelice)	Morfotip	Takson	Ukupan broj komadića biljnog tkiva po uzorku	Broj komadića tkiva u uzorku iz kojih su razvijeni miceliji	Broj jedinki/micelija po uzorku
L1A	21 (26 NOVI)	Neutvrđeno	4	1	1
L6A	13 (Z16)	<i>Aureobasidium pullulans</i>	4	4	3
	4 (Z6)	Neutvrđeno			1
L8A	6 (Z9)	<i>Botrytis cinerea</i>	4	4	2
	16 (Z19)	<i>Epicoccum nigrum</i>			2
L10A	6 (Z9)	<i>B. cinerea</i>	4	4	2
	2 (Z27)	Neutvrđeno			2
US1A	1 (Z1)	<i>Cladosporium</i> sp.	4	4	2
	16 (Z19)	<i>Epicoccum nigrum</i>			2
US2A	5 (Z7)	<i>A. pullulans</i>	4	1	1
US3A	3 (Z4)	<i>Cladosporium</i> sp.	4	4	1
	16 (Z19)	<i>E. nigrum</i>			3
US4A	6 (Z9)	<i>B. cinerea</i>	4	4	4
US5A ³	6(Z9)	<i>B. cinerea</i>	4	4	3
	6 (Z26)	<i>B. cinerea</i>			1
	5 (Z7)	<i>A. pullulans</i>			1
	16 (Z19)	<i>E. nigrum</i>			1

UNS1A ⁴	16 (Z20)	<i>E. nigrum</i>	4	4	1
	9 (Z12)	<i>Alternaria infectoria/A. caespitosa</i>			3
	5 (Z5)	<i>A. pullulans</i>			1
UNS2A ⁵	12 (Z15)	<i>Dothiora</i> sp.	4	3	3
	5 (Z7)	<i>A. pullulans</i>			1
UNS3A ⁶	18 (Z22)	<i>Epicoccum nigrum/E. layuense</i>	4	4	4
	15 (Z18)	Neutvrđeno			4
UNS4A ⁷	2 (Z2)	Neutvrđeno	4	4	3
	16 (Z19)	<i>E. nigrum</i>			2
UNS5A ⁸	5 (Z5)	<i>A. pullulans</i>	4	4	4
	3 (Z4)	<i>E. nigrum</i>			2

³ U uzorku US5A, na istom komadiću biljnog tkiva došlo je do istodobnog razvoja jednog micelija *Botrytis cinerea* i jednog micelija *Aureobasidium pullulans*. Na drugom komadiću tkiva iz istog uzorka također je primijećen razvoj micelija različitih taksona - jedna jedinka *B. cinerea* i jedna jedinka *Epicoccum nigrum*.

⁴ U uzorku UNS1A, iz istog komadića biljnog tkiva razvijena je jedna jedinka *Alternaria infectoria/A. caespitosa* i jedna jedinka *Aureobasidium pullulans*.

⁵ U uzorku UNS2A, iz istog komadića tkiva razvijena je jedinka *Dothiora* sp. i jedinka *A. pullulans*.

⁶ U uzorku UNS3A, na sva četiri komadića simptomatičnoga tkiva primijećen je istovremeni razvoj po jedne jedinice identificirane kao *Epicoccum nigrum/E. layuense* i po jedne jedinice neutvrđenog taksonomskog statusa.

⁷ U uzorku UNS4A, iz istog komadića biljnog tkiva razvijene su dvije jedinice *Epicoccum nigrum*, predstavljene morfolipom 16 (oznake morfolipa Z19 i Z24).

⁸ U uzorku UNS5A, na dva komadića biljnog tkiva primijećen je istovremeni razvoj po jedne jedinice *A. pullulans* i po jedne jedinice *E. nigrum*.

Tablicom 5. dan je pregled morfolipova i pripadajućih taksona micelija razvijenih iz lisnog tkiva koje je pokazivalo simptom A, zajedno s brojnošću jedinki razvijenih na pojedinom komadiću lisnog tkiva. S obzirom da na nekim komadićima biljnog tkiva nije došlo do razvoja micelija, dok je na drugima primijećen istovremeni razvoj više od jedne jedinice, broj ispitivanih komadića tkiva nije u svim uzorcima jednak broju razvijenih micelija.

Brojnost, sistematska pripadnost i odgovarajući morfolipovi micelija razvijenih iz uzoraka tkiva koje je pokazivalo simptom B navedeni su u tablici 6.

Tablica 6. Pregled prisutnih morfotipova i utvrđenih taksonomskih jedinica micelija razvijenih iz tkiva koje je pokazivalo simptom B

Oznaka uzorka (Petrijeve zdjelice)	Morfotip	Takson	Ukupan broj komadića biljnog tkiva po uzorku	Broj komadića tkiva u uzorku iz kojih su razvijeni miceliji	Broj jedinki/micelija po uzorku
L1B	19 (Z25)	<i>Daldinia pyrenaica</i>	4	3	2
	6 (Z9)	<i>Botrytis cinerea</i>			1
L2B	11 (Z14)	<i>Paraconiothyrium brasiliense</i>	4	2	2
L3B	5 (Z7)	<i>Aureobasidium pullulans</i>	4	4	2
	8 (Z11)	<i>Aposphaeria corallinolutea</i> / <i>Dendrophoma pleurospora</i>			2
L5B	3 (Z3)	<i>Cladosporium</i> sp.	4	4	4
L5B	2 (Z2)	Neutvrđeno	4	4	4
L8B	11 (Z14)	<i>P. brasiliense</i>	4	1	1
US1B⁹	3 (Z4)	<i>Cladosporium</i> sp.	4	4	4
	16 (Z19)	<i>Epicoccum nigrum</i>			1
US2B	5 (Z7)	<i>A. pullulans</i>	4	2	1
	10 (Z13)	<i>Cryptosphaeria ligniota</i>			1
US3B¹⁰	16 (Z23)	<i>E. nigrum</i>	4	4	2
	1(Z1)	<i>Cladosporium</i> sp.			3
	7 (Z10)	<i>Paraconiothyrium</i> sp.			2

US4B¹¹	3 (Z4)	<i>Cladosporium</i> sp.	4	4	4
	5 (Z7)	<i>A. pullulans</i>			1
US5B	3 (Z4)	<i>Cladosporium</i> sp.	4	1	1
UNS1B¹²	3 (Z4)	<i>Cladosporium</i> sp.	4	4	3
	5 (Z7)	<i>A. pullulans</i>			2
UNS2B¹³	3 (Z4)	<i>Cladosporium</i> sp.	4	4	4
	5 (Z8)	<i>A. pullulans</i>			1
UNS3B¹⁴	1 (Z1)	<i>Cladosporium</i> sp.	4	4	4
	5 (Z7)	<i>A. pullulans</i>			2
	14 (Z17)	<i>Fusarium sporotrichioides</i>			2
UNS4B¹⁵	5 (Z7)	<i>A. pullulans</i>	4	4	3
	6 (Z9)	<i>B. cinerea</i>			2
	1 (Z1)	<i>Cladosporium</i> sp.			2
	17 (Z21)	<i>Epicoccum</i> sp.	4	4	1
UNS5B¹⁶	5 (Z7)	<i>A. pullulans</i>	4	4	4
	3 (Z4)	<i>Cladosporium</i> sp.			2

⁹**U uzorku US1B**, na jednom od četiri komadića biljnog tkiva pojavio se istovremeni razvoj jednog micelija *Cladosporium* sp. i jednog micelija *Epicoccum nigrum*.

¹⁰**U uzorku US3B**, na tri od četiri komadića biljnog tkiva istovremeno su se razvile jedinke različite sistematske pripadnosti. Pritom su se na dva komadića tkiva razvili po jedan micelij *Cladosporium* sp. i micelij *Paraconiothyrium* sp., dok je na trećem komadiću tkiva primijećen istovremeni razvoj jednog micelija *Cladosporium* sp. i jednog micelija *Epicoccum nigrum*.

¹¹**U uzorku US4B**, na dva od četiri komadića biljnog tkiva javio se istovremeni razvoj po jednog micelija *Cladosporium* sp. i jednog micelija *Aureobasidium pullulans*.

¹²**U uzorku UNS1B**, na dva komadića biljnog tkiva primijećen je istovremeni razvoj po jednog micelija *Cladosporium* sp. i jednog micelija *A. pullulans*.

¹³**U uzorku UNS2B**, na jednom od četiri komadića biljnog tkiva istovremeno su se razvile jedna jedinka *Cladosporium* sp. i jedna jedinka *A. pullulans*.

¹⁴**U uzorku UNS3B**, na dva od četiri uzorka simptomatičnog tkiva primijećen je istovremeni razvoj po jednog micelija *Cladosporium* sp. i jednog micelija *A. pullulans*, dok se na preostala dva komadića tkiva istovremeno razvio po jedan micelij *Cladosporium* sp. i jedan micelij *Fusarium sporotrichioides*.

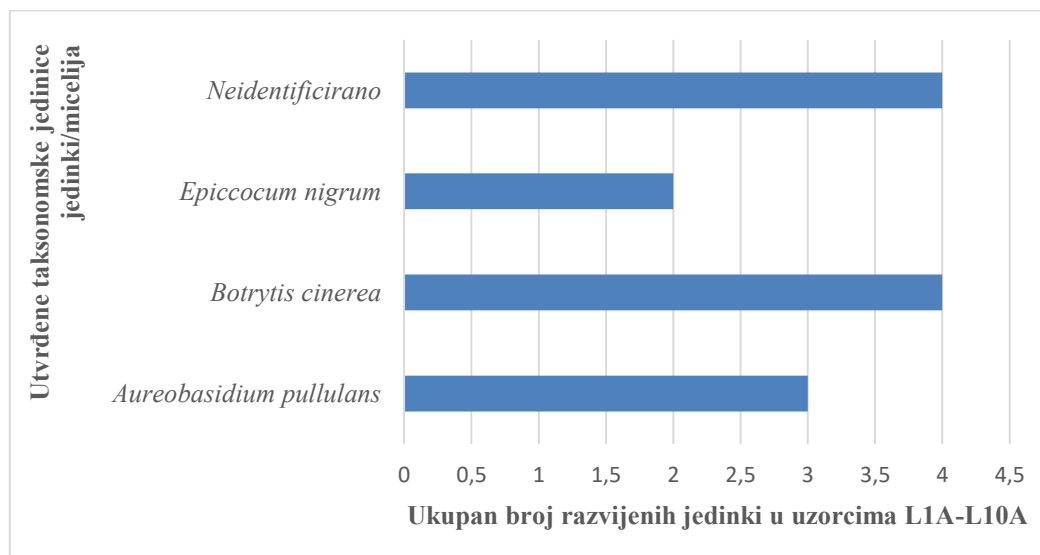
¹⁵**U uzorku UNS4B**, na tri od četiri komadića biljnog tkiva primijećen je istovremeni razvoj jedinki različite taksonomske pripadnosti. Pritom je na jednom od tri komadića primijećen razvoj po jedne jedinke *Aureobasidium pullulans* i jedne jedinke *Botrytis cinerea*. Na drugom komadiću biljnog tkiva došlo je do razvoja po jedne jedinke *Cladosporium* sp. i *B. cinerea*, dok su se na trećem komadiću tkiva istovremeno razvile po jedna jedinka *A. pullulans*, *Cladosporium* sp. i *Epicoccum* sp.

¹⁶**U uzorku UNS5B**, na dva od četiri komadića biljnog tkiva istovremeno su se razvile po jedna jedinka *A. pullulans* i jedan *Cladosporium* sp.

Istraživanje mogućih patogena lišća klonova *Prunus avium* uključivalo je obradu četrdeset listova zahvaćenih nekrotičnim lezijama i sakupljenih u KSP Kutina. Budući da su sa svakoga lista uzeta po četiri reprezentativna komadića tkiva, praćen je razvoj micelija na sveukupno 160 komadića simptomatičnog lisnog tkiva (80 komadića lisnog tkiva po simptomu). Pritom su ispitivani uzorci podijeljeni u šest kategorija, odnosno dvije kategorije s obzirom na tip simptoma i tri kategorije s obzirom na postupak površinske sterilizacije.

Prema podacima navedenima u tablici 5., od ukupno četrdeset komadića lisnog tkiva sa simptomom A koji su bili površinski sterilizirani otopinom NaOCl (2 %), na svega trinaest komadića tkiva (32,5 %) je zabilježen razvoj po jednog micelija.

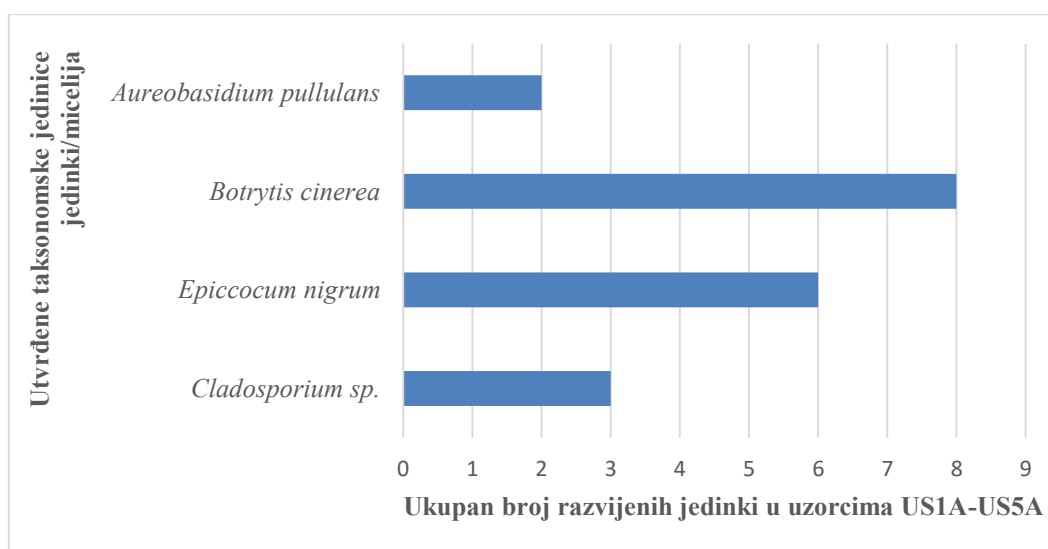
Iz tablice 6. je vidljivo kako je sličan rezultat dobiven s uzorcima tkiva sa simptomom B koji su bili podvrgnuti istom postupku površinske sterilizacije (otopina NaOCl, 2 %). Pritom je na 45 % ispitivanih komadića tkiva sa simptomom B primijećen razvoj po jednoga micelija. Grafikonima 1. - 6. prikazana je brojnost taksonomskih jedinica razvijenih micelija po različitim kategorijama uzoraka simptomatičnog tkiva.



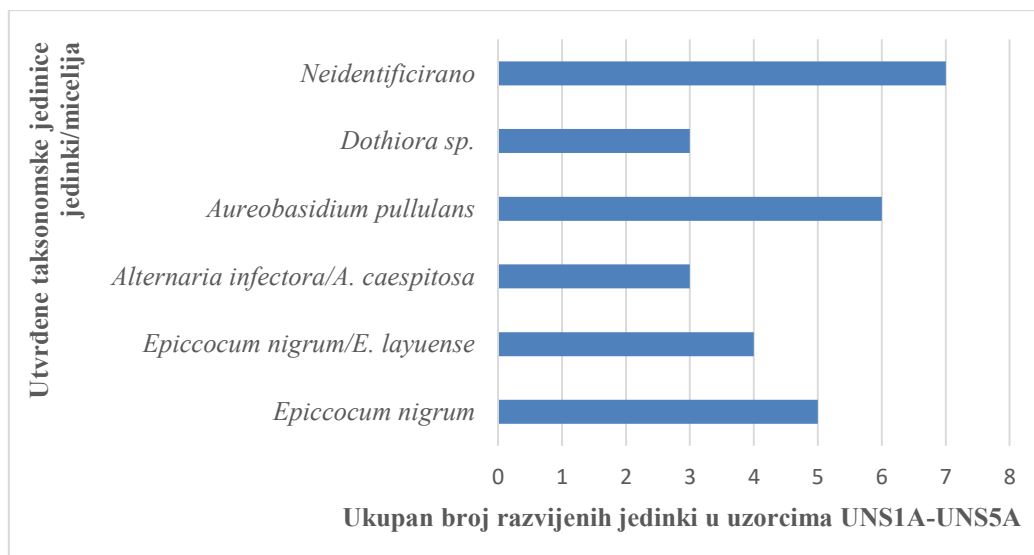
Grafikon 1. Odnos broja taksonomskih jedinica micelija razvijenih na uzorcima biljnog tkiva sa simptomom A i nakon površinske sterilizacije otopinom natrijeva hipoklorita (NaOCl, 2 %); oznake uzoraka L1A-L10A

Na grafičkom prikazu 1. vidljivo je kako je vrsta *Botrytis cinerea* predstavljala najzastupljeniji takson gljiva izoliranih iz lišća sa simptomom A, a koji su bili površinski sterilizirani otopinom natrijeva hipoklorita (NaOCl, 2 %). Jednaki udio od ukupnog broja razvijenih micelija (30, 77%) u ovoj skupini uzoraka imala je i kategorija jedinki neutvrđenoga taksonomskoga statusa. Usporedbom podataka iz tablice 5. i grafičkog prikaza 1. može se primijetiti kako su iz lišća koje je pokazivalo simptom A i koje je površinski sterilizirano otopinom NaOCl (2 %) izolirana samo tri taksona gljiva, a izdvojeno je šest različitih morfotipova s obzirom da nisu sve neidentificirane jedinice bile predstavljene istim morfotipom.

Sukladno podacima iz tablice 5., od dvadeset komadića lisnog tkiva sa simptomom A koji su bili površinski sterilizirani otopinom etanola (C₂H₅OH, 70%), na 17 je komadića došlo do razvoja micelija. Budući da je na dva uzorka (komadića) biljnog tkiva zabilježen istovremeni razvoj više od jednog micelija, u ovoj je skupini uzoraka razvijeno 19 jedinki. Kao i u slučaju uzoraka tkiva sa simptomom A koji su bili podvrgnuti površinskoj sterilizaciji otopinom natrijeva hipoklorita (2%), iz lisnog tkiva površinski steriliziranog otopinom etanola (70%) u najvećem je postotku (42,11 %) bila izolirana vrsta *Botrytis cinerea*. Na temelju morfoloških karakteristika micelija razvijenih na uzorcima oznaka US1A-US5A, izdvojeno je pet morfotipova. Pritom su dva različita morfotipa (1 i 3) predstavljala rod *Cladosporium*.

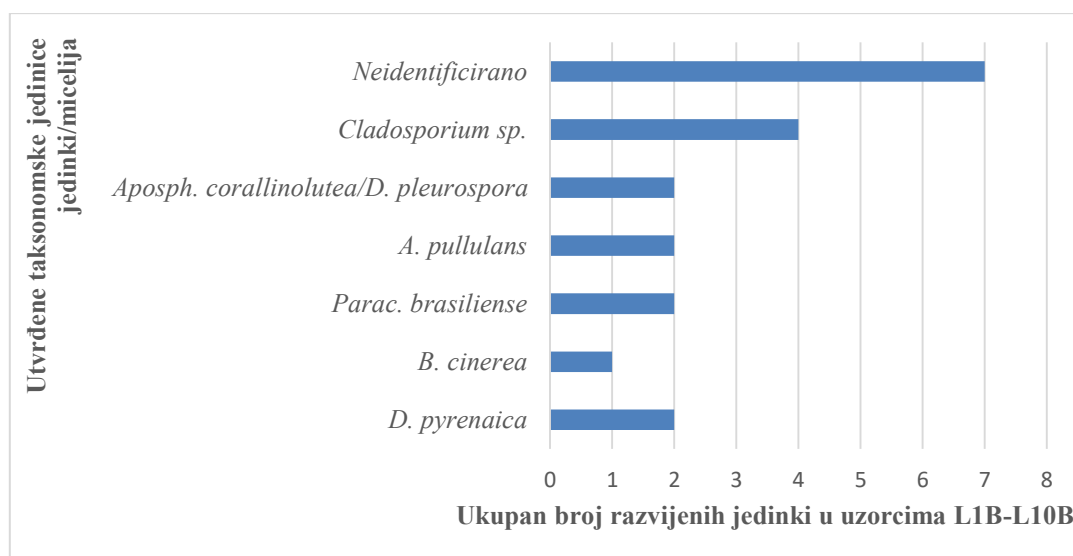


Grafikon 2. Odnos broja taksonomskih jedinica micelija razvijenih na uzorcima biljnog tkiva sa simptomom A i nakon površinske sterilizacije otopinom etanola (C₂H₅OH, 70%); oznake uzoraka US1A-US5A



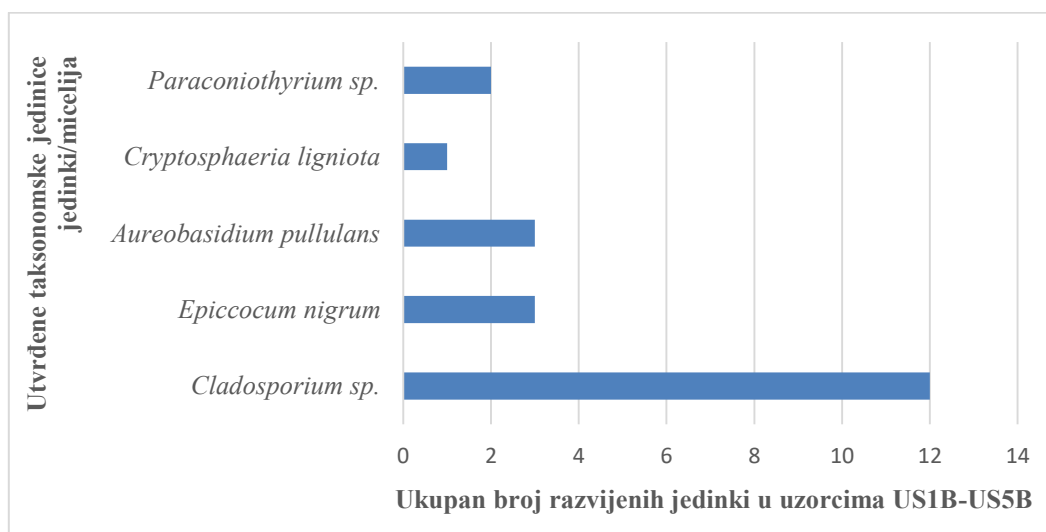
Grafikon 3. Odnos broja taksonomskih jedinica micelija razvijenih na uzorcima biljnog tkiva sa simptomom A koji nisu bili podvrgnuti površinskoj sterilizaciji; oznake uzoraka UNS1A-UNS5A

Od dvadeset ispitivanih komadića lisnog tkiva koji nisu bili podvrgnuti površinskoj sterilizaciji, na njih devetnaest je primijećen razvoj micelija. Istovremeni razvoj više od jednog micelija zabilježen je na devet komadića tkiva, pa je sveukupno razvijeno 28 micelija. Iz grafičkog prikaza 3. vidljivo je kako je u ovoj skupini uzoraka najzastupljeniju vrstu predstavljala gljiva *Aureobasidium pullulans*, s udjelom od 21,43 %. U ovoj je kategoriji uzoraka izdvojeno osam morfolipova te je utvrđena prisutnost četiri do pet taksona gljiva (Tablica 5). Pritom je 14, 29 % izolata identificirano kao moguće vrste *Epiccocum nigrum* ili *E. layuense*, dok je 10, 71 % izolata pripadalo vrsti *Alternaria infectoria* ili *A. caespitosa*. Neidentificirane jedinice predstavljene morfolipom 2 i morfolipom 15 zauzimale su najveći udio od ukupnog broja izoliranih micelija u ovoj kategoriji uzoraka (25 %).

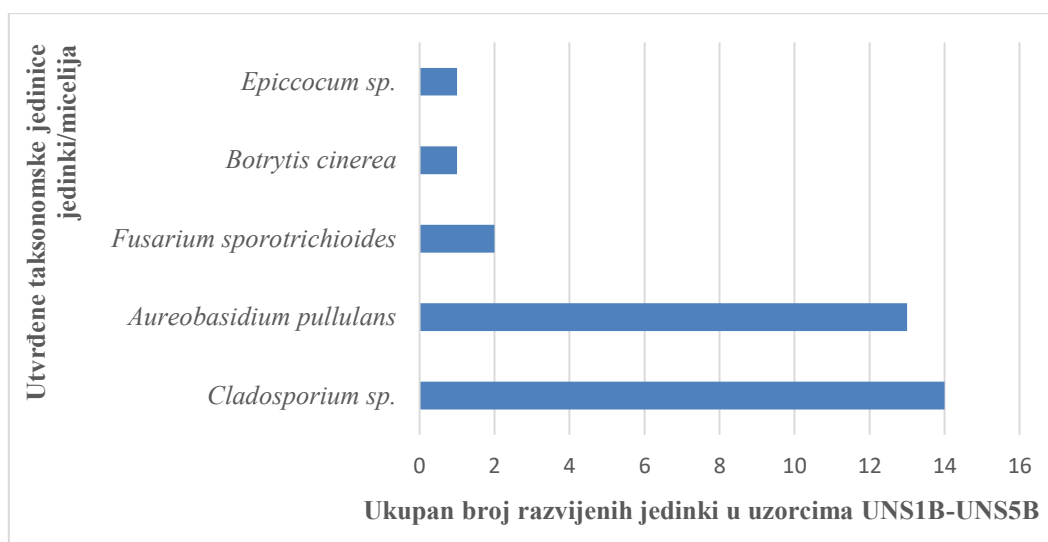


Grafikon 4. Odnos broja taksonomskih jedinica micelija razvijenih na uzorcima biljnog tkiva sa simptomom B i nakon površinske sterilizacije otopinom natrijeva hipoklorita (NaOCl, 2%); oznake uzoraka L1B-L10B

Usporedbom grafičkih prikaza 1. i 4., može se primijetiti kako je iz uzoraka lisnog tkiva sa simptomom B koji su bili podvrgnuti površinskoj sterilizaciji otopinom natrijeva hipoklorita (2 %), izoliran veći broj različitih taksona u odnosu na uzorke tkiva sa simptomom A koji su bili podvrgnuti jednakom postupku površinske sterilizacije. U uzorcima oznaka L1B-L10B zabilježen je razvoj micelija sedam izdvojenih morfotipova, a utvrđena je prisutnost šest različitih taksonomskih jedinica (Tablica 6). Neidentificirane jedinice predstavljene morfotipom 2 i morfotipom 11 bile su zastupljene s udjelom od 27,77 %. Međutim, rod *Cladosporium* se može smatrati najčešće izoliranim taksonom (22,22 %) iz ove kategorije uzoraka tkiva sa simptomom B.



Grafikon 5. Odnos broja taksonomskih jedinica micelija razvijenih na uzorcima biljnog tkiva sa simptomom B i nakon površinske sterilizacije otopinom etanola (C₂H₅OH, 70%); oznake uzoraka US1B-US5B

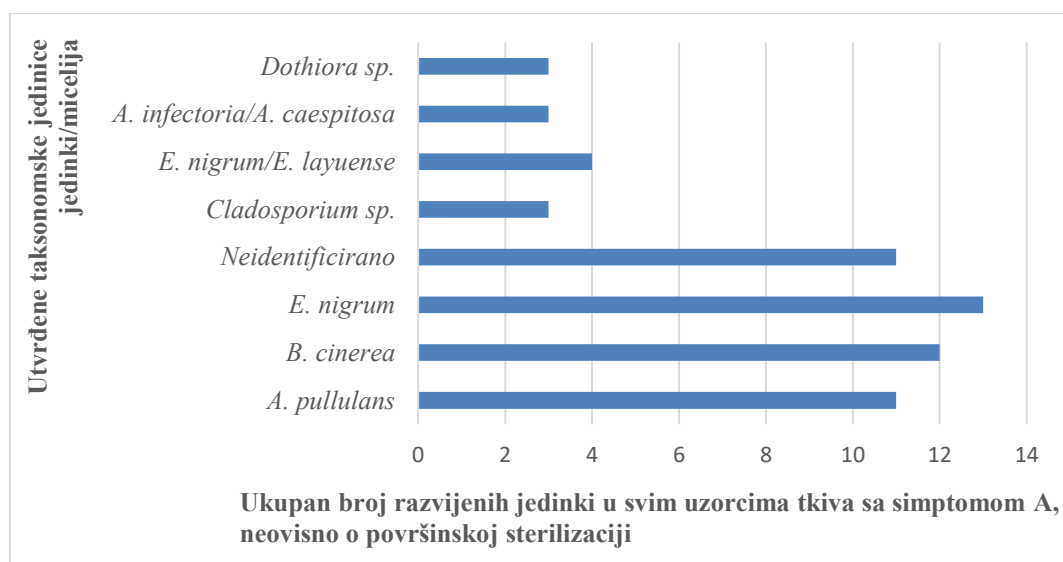


Grafikon 6. Odnos broja taksonomskih jedinica micelija razvijenih na uzorcima biljnog tkiva sa simptomom B koji nisu bili podvrgnuti površinskoj sterilizaciji; oznake uzoraka UNS1B-UNS5B

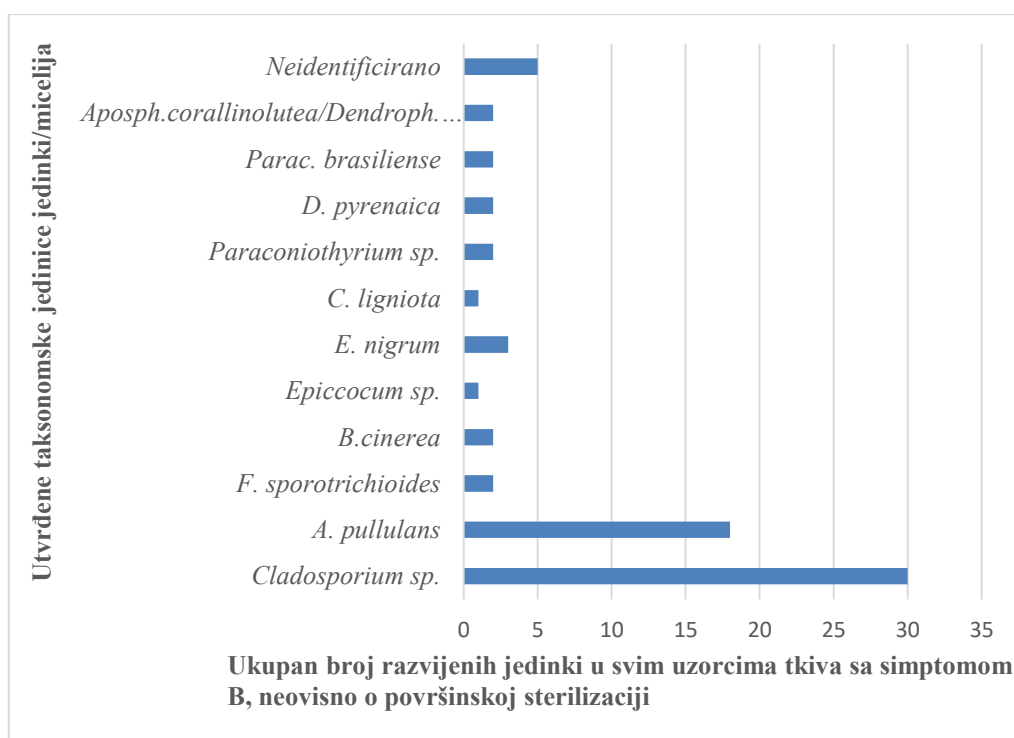
Iz grafičkih prikaza 4., 5. i 6. vidljivo je kako je rod *Cladosporium* bio najzastupljeniji takson u sve tri skupine uzoraka tkiva koje je pokazivalo simptom B, neovisno o površinskoj sterilizaciji. Razvoj micelija je zabilježen na 75 % uzoraka lisnog tkiva sa simptomom B koji su bili podvrgnuti površinskoj sterilizaciji otopinom etanola (70 %) te je sveukupno u toj kategoriji uzoraka razvijen dvadeset i jedan micelij. Pritom je rod *Cladosporium* bio zastupljen s udjelom od 57,14 %. Izdvojeno je šest morfotipova budući da je rod *Cladosporium* bio predstavljen morfotipom 1 i morfotipom 3 (Tablica 6).

Sukladno podacima iz tablice 6. i grafikona 6., na svih dvadeset komadića lisnog tkiva sa simptomom B koji nisu bili podvrgnuti površinskoj sterilizaciji, uočen je razvoj micelija. U ovoj skupini uzoraka, oznaka UNS1B-UNS5B, zabilježen je razvoj sveukupno trideset i jedne jedinice te je na deset komadića lisnog tkiva došlo do istovremenog razvoja više od jednog micelija (Tablica 6). Rod *Cladosporium*, predstavljen morfotipom 1 i morfotipom 3, bio je zastupljen s udjelom od 46,66%. Najzastupljenija vrsta u ovoj kategoriji uzoraka bila je gljiva *A. pullulans*, s udjelom od 43,33 %.

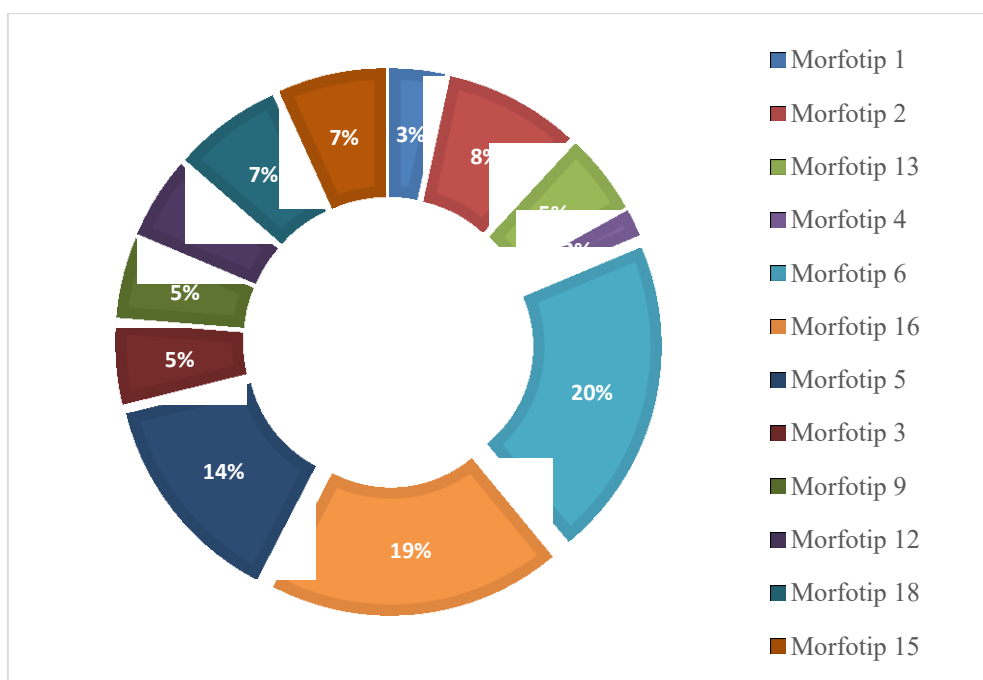
Grafičkim prikazima 7. i 8. omogućen je pregled zastupljenosti svih identificiranih taksonomskih jedinica micelija izoliranih iz uzoraka sa simptomom A i uzoraka sa simptomom B, neovisno o površinskoj sterilizaciji. Grafikoni 9. i 10. prikazuju udjele morfotipova pripadajućih taksona te je vidljivo kako je broj izdvojenih morfotipova veći od broja utvrđenih taksonomskih jedinica.



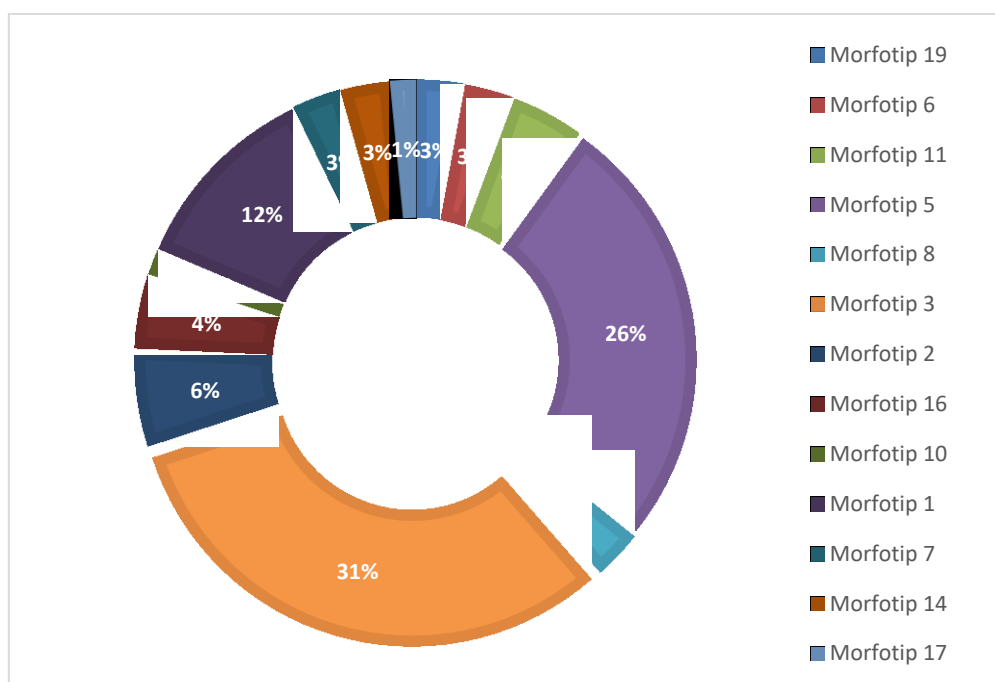
Grafikon 7. Odnos ukupnog broja taksonomskih jedinica micelija razvijenih na uzorcima biljnog tkiva koje je pokazivalo simptom A, neovisno o površinskoj sterilizaciji



Grafikon 8. Odnos ukupnog broja taksonomskih jedinica micelija razvijenih na uzorcima biljnog tkiva koje je pokazivalo simptom B, neovisno o površinskoj sterilizaciji



Grafikon 9. Odnos udjela prisutnih morfotipova u svim uzorcima simptomatičnog lisnog tkiva koje je pokazivalo simptom A, neovisno o površinskoj sterilizaciji



Grafikon 10. Odnos udjela prisutnih morfotipova u svim uzorcima simptomatičnog lisnog tkiva koje je pokazivalo simptom B, neovisno o površinskoj sterilizaciji

Prema tablici 5. i grafičkom prikazu 7., zabilježen je razvoj micelija na 61,25 % uzoraka tkiva sa simptomom A, neovisno o površinskoj sterilizaciji te je razvijeno ukupno 60 jediniki. Promatrajući podatke o brojnosti dobivenih taksona gljiva zajednički za sve uzorke tkiva sa simptomom A i neovisno o površinskoj sterilizaciji, najveći udio pripada vrstama roda

Epicoccum (28,33 %) budući da je za 13 micelija utvrđeno da pripadaju vrsti *Epicoccum nigrum*, dok su 4 jedinke identificirane kao moguće vrste *E. nigrum* ili *E. layuense* (Tablica 5). Nakon vrste *E. nigrum*, u uzorcima lisnog tkiva koje je pokazivalo simptom A, najprisutnija je bila patogena vrsta *Botrytis cinerea* s udjelom od 20% (Grafikon 7). Rod *Cladosporium* bio je dominantno prisutan takson (42,86 %) u lisnom tkivu sa simptomom B, neovisno o površinskoj sterilizaciji, dok je *Aureobasidium pullulans* predstavljala najzastupljeniju vrstu (25,71 %) (Grafikon 8).

Na grafičkom prikazu 7. vidljivo je kako su iz svih uzoraka lisnog tkiva sa simptomom A bili izolirani miceliji šest do sedam različitih taksona gljiva (pojedini miceliji su identificirani kao moguće vrste *Epicoccum nigrum* ili *E. layuense* te *Alternaria infectoria* ili *A. caespitosa*), a jedanaest je jedinki (18, 33 %) ostalo neidentificirano. Sukladno podacima prikazanim grafikonom 9., na temelju morfoloških karakteristika micelija razvijenih iz komadića lisnog tkiva sa simptomom A i neovisno o površinskoj sterilizaciji, ukupno je izdvojeno 12 morfortipova. Pritom je najzastupljeniji bio morfortip 6 (20 %), za koji je utvrđeno da predstavlja vrstu *Botrytis cinerea*. Razlike u rezultatima iz grafikona 7. i 9. proizlaze iz velike morfološke varijabilnosti vrste *Epicoccum nigrum*.

Morfološke karakteristike kulture micelija *Epicoccum nigrum* odgovarale su izolatima predstavljenima morfortipom 16 i neidentificiranim jedinkama s morfortipom 15 (oznaka Z 18). Morfortip 16 bio je zastupljen s udjelom od 19 %, a morfortip 15 s udjelom od 7 %. Utvrđeno je kako morfortip 18, zastupljen s udjelom od 7 % također predstavlja vrstu *Epicoccum nigrum* ili srodnu vrstu *E. layuense* (Grafikon 9).

Prema tablici 6., od osamdeset ispitivanih komadića lisnog tkiva koji su pokazivali simptom B, razvoj micelija je zabilježen na pedeset i tri komadića tkiva (66,25 %). S obzirom da je u kategoriji uzoraka podvrgnutih površinskoj sterilizaciji otopinom etanola (70 %) i kategoriji bez površinske sterilizacije na pojedinim komadićima tkiva došlo do istovremenog razvoja više od jednog micelija, sveukupno je iz uzoraka sa simptomom B razvijeno sedamdeset jedinki. Na grafičkom prikazu 8. može se primijetiti kako su iz uzoraka sa simptomom B, neovisno o površinskoj sterilizaciji, izolirani miceliji jedanaest do dvanaest taksona (dvije jedinke su identificirane kao moguće vrste *Aposphaeria corallinolutea* ili *Dendrophoma pleurospora*). Najzastupljeniji takson pripada rodu *Cladosporium* (42,86 %), dok je najzastupljeniju vrstu predstavljala *Aureobasidium pullulans*, s udjelom od 25,71 %. Iz grafičkog prikaza 10. vidljivo je kako najveći udio (31 %) od ukupno trinaest morfortipova koji su izdvojeni na temelju morfoloških karakteristika micelija razvijenih iz uzoraka sa simptomom B pripadao morfortipu 3.

5. RASPRAVA

Premda je primarni cilj ovoga istraživanja bio ustanoviti prisutnost i brojnost gljiva za koje je već utvrđeno da uzrokuju patološke promjene na lišću divlje trešnje, pojava nekrotičnih lezija ograničenih na lišće vizualno zdravih stabala ukazivala je na mogućnost odbacivanja prvotne hipoteze o povezanosti navedenih simptoma i dobro poznatih uzročnika gljivičnih bolesti divlje trešnje.

Uzimajući u obzir simptome na lišću primijećene prilikom procjene zdravstvenog stanja klonova *Prunus avium* u KSP Kutina, može se zaključiti kako su vrijeme pojave, izgled i obrazac širenja nekroza kategoriziranih kao simptom A u većoj mjeri odgovarali opisima patoloških promjena koje na lišću divlje trešnje uzrokuje gljiva *Stigmina carpophila*. Nekrotičnim lezijama kategoriziranim kao simptom B najviše je odgovarao izgled lišća uslijed napada gljive *Apiognomonium erythrostoma*. Obradom uzoraka simptomatičnog tkiva te usporedbom prisutnosti i brojnosti identificiranih taksonomskih jedinica izolata, utvrđeno je kako niti jedan izolirani micelij ne pripada poznatim uzročnicima bolesti lišća divlje trešnje, uključujući *A. erythrostoma* i *S. carpophila*.

Dobivene rezultate potvrđuje i činjenica kako se, prema dostupnoj literaturi, prvi simptomi napada *A. erythrostoma* na području Republike Hrvatske mogu primijetiti tek u lipnju. *Stigmina carpophila* izaziva pojavu lezija gotovo identičnih simptomu A, no napad ove patogene gljive izazvao bi teže posljedice u odnosu na zatečeno stanje. Stoga je istraživanje potencijalnih uzročnika navedenih simptoma bilo usmjereno na utvrđivanje prisutnosti slabih patogena koji su prije izazivanja nekroze kolonizirali ispitivano lišće kao endofiti, epifiti ili saprotrofi. Kako bi se dobio uvid u raznolikost endofitske zajednice i otpornost pojedinih vrsta na različite koncentracije i sredstva za površinsku sterilizaciju, uzorci lisnog tkiva su prije daljnje obrade bili površinski sterilizirani otopinom natrijeva hipoklorita (2 %) i otopinom etanola (70 %).

Dio uzoraka simptomatičnog lišća nije podvrgnut površinskoj sterilizaciji te je pretpostavljeno kako će ove skupine uzoraka pokazivati najveću brojnost i raznolikost taksona zbog moguće prisutnosti epifita i kontaminanata iz okoliša. Očekivano, najveća brojnost micelija različitih taksona zabilježena je u kategorijama uzoraka tkiva sa simptomom A i simptomom B koji nisu bili podvrgnuti površinskoj sterilizaciji. S druge strane, najmanja brojnost micelija zabilježena je u kategorijama uzoraka tkiva sa simptomom A i simptomom B koji su bili površinski sterilizirani otopinom NaOCl (2%).

Osim agresivnih patogenih vrsta *Botrytis cinerea* i *Cryptosphaeria ligniota*, svi ostali miceliji izolirani iz simptomatičnog lišća klonova *Prunus avium* u KSP Kutina pripadaju taksonima gljiva koje uz endofitski, mogu ispoljavati parazitski i/ili saprotrofni način života.

5.1 Povezanost prisutnosti gljivičnih endofita i razvoja nekrotičnih lezija na lišću klonova divlje trešnje u KSP Kutina

U širem smislu, endofitima se smatraju mikroorganizmi koji nastanjuju živa tkiva biljnih domaćina, ne uzrokujući pritom patološke promjene i pojavu vidljivih simptoma (Hirsch i Braun 1992). Pojedini autori navode kako su se endofitske gljive razvile iz prethodno patogenih vrsta koje su s vremenom prestale štetno djelovati na domaćina (Carroll 1988, Freeman i Rodriguez 1993, Saikkonen i sur. 1998, Kogel i sur. 2006) te je uslijed zajedničke evolucije postignuta ravnoteža između obrambene reakcije biljke na širenje endofita i djelovanja endofitske gljive na zdravstveno stanje domaćina (Giménez i sur. 2007). Nakon mehaničke ozljede ili negativnog utjecaja abiotičkih čimbenika poput vremenskih ekstrema, biljke postaju podložne napadu parazita slabosti koji su prethodno živjeli endofitski, odnosno nisu narušavali zdravstveno stanje svojih domaćina (Bien i Damm 2020a).

Osim toga, mnogi gljivični patogeni tijekom svog životnog ciklusa prolaze kroz latentnu fazu koja se, u širem smislu, može smatrati endofitskim načinom života (Carroll 1988).

Premda endofiti mogu izazvati patološke promjene u tkivima domaćina izloženima stresu (Clay i Schardl 2002, Schulz i Boyle 2005), brojne studije ukazuju na pozitivno djelovanje endofitskih gljiva na zdravstveno stanje svojih domaćina. Endofiti djeluju antagonistički na mnoge patogene vrste gljiva i druge kategorije štetnih organizama koji nastoje kolonizirati biljno tkivo (Wilkinson i sur. 2000, Arnold i sur. 2003, Tanaka i sur. 2005, Ganley i sur. 2008, Mejía i sur. 2008, Vega i sur. 2008, Gao i sur. 2010). Usto, gljivični endofiti potiču rast biljke produkcijom fitohormona rasta (Dai i sur. 2008) te povećavaju otpornost biljaka na djelovanje čimbenika stresa (Lewis 2004, Malinowski i sur. 2004).

Prisutnost gljivičnih endofita utvrđena je kod svake dosada istraživane vrste biljnog domaćina, a procjenjuje se kako postoji više od milijun različitih endofitskih vrsta gljiva (Strobel i Daisy 2003, Sun i Guo 2012). Prema Arnold (2007), endofiti većinom pripadaju redu *Ascomycetes* i njegovim anamorfnim oblicima te predstavljaju ekološki vrlo raznoliku skupinu gljiva.

Alternaria, *Aureobasidium* i *Cladosporium* neki su od najraširenijih endofitskih rodova. Neke su vrste endofitskih gljiva gotovo u potpunosti ograničene na pojedinu vrstu domaćina ili čak određeni tip biljnog tkiva, dok primjerice *Epicoccum nigrum* i *Aureobasidium pullulans* koloniziraju veći broj različitih biljnih domaćina (Boddy i Griffith 1989). Endofiti mogu kolonizirati međustanični prostor i unutrašnjost stanica različitih tkiva (Saikkonen i sur. 1998, Pan i May 2009, Bernardi-Wenzel i sur. 2010). Jedan od primjera specijaliziranosti endofita za određeno tkivo je naseljavanje međužilnog područja lista, osobito uz središnju žilu (Luginbühl i Müller 1981).

Zahvaljujući svojoj gospodarskoj vrijednosti, širokoj rasprostranjenosti i bogatom mikrobiomu, voćkarice iz roda *Prunus* predstavljaju povoljan model za istraživanje prisutnosti i sistematske pripadnosti endofitskih gljiva u njihovim tkivima (Anonymous 2005).

Unatoč velikom gospodarskom značaju, dosada je provedeno svega nekoliko studija koje se bave proučavanjem bioraznovrsnosti mikrobioma nadzemnih biljnih organa vrsta iz roda *Prunus* (Bernadovičová i Ivanová 2011, Haddadadafshi i sur. 2011, Hortová i Novotný 2011, Gramaje i sur. 2012, Abdollahi Aghdam i Fotouhifar 2016, Abdollahi Aghdam i Fotouhifar 2017). Pimenta i sur. (2012) ukazuju na manjkavost dobivenih podataka budući da je većina spomenutih studija bila ograničena malim brojem uzoraka, geografski uskim područjem istraživanja ili identifikacijom vrsta oslanjajući se samo na njene morfološke karakteristike. Najopsežnije istraživanje bioraznolikosti zajednica gljiva na vrstama iz roda *Prunus* provedeno je u južnoj Africi (Damm i sur. 2007a, Damm i sur. 2007b, Damm i sur. 2008a, Damm i sur. 2008b, Damm i sur. 2008c, Damm i sur. 2010, Moyo i sur. 2018, Bien i Damm 2020b).

5.2 Uloga gljive *Botrytis cinerea* Pers. u pojavi nekrotičnih lezija na lišću klonova divlje trešnje u KSP Kutina

Od najčešćih uzročnika gljivičnih bolesti divlje trešnje opisanih u domaćoj i stranoj literaturi, iz simptomatičnog lišća klonova *Prunus avium* iz KSP Kutina izolirana je jedino vrsta *Botrytis cinerea* Pers. Moguća povezanost *B. cinerea* i razvoja nekrotičnih lezija na lišću divlje trešnje detaljnije je obrađena u ovome potpoglavlju budući da se radi o gljivi koja ne napada prvenstveno lišće divlje trešnje, već uzrokuje široki raspon simptoma zahvaćajući različite biljne organe velikog broja domaćina.

Nakon vrste *Epicoccum nigrum*, *B. cinerea* je predstavljala drugi najzastupljeniji takson micelija izoliranih iz svih uzoraka lisnog tkiva koji su pokazivali simptom A, neovisno o površinskoj sterilizaciji (Tablica 5). Premda je brojnost micelija *E. nigrum* u uzorcima sa simptomom A u konačnici bila veća, jedinke *B. cinerea* su pokazale mnogo višu stopu preživljenja nakon provedenog postupka površinske sterilizacije. Štoviše, gljiva *B. cinerea* je u najvećem postotku (30,77 %) bila izolirana iz lišća sa simptomom A koje je bilo podvrgnuto površinskoj sterilizaciji otopinom NaOCl (2%) te uzoraka koji su bili površinski sterilizirani 70 % otopinom etanola (42,11 %). U odnosu na *E. nigrum*, *Botrytis cinerea* predstavlja agresivniju patogenu vrstu, zbog čega se njena prisutnost u lišću ne smije zanemariti. No, kako se izgled nekrotičnih lezija opisanih pod simptomom A nije podudarao s izgledom i načinom širenja nekroze uslijed napada *B. cinerea*, može se zaključiti kako je ovaj patogen bio prisutan u lišću u latentnoj fazi.

Botrytis cinerea je polifagna, široko rasprostranjena gljiva koja kolonizira biljne organe gotovo svih vrsta šumskog drveća te u prirodi rijetko razvija savršeni (telemorfni) stadij naziva *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetz. (Tomiczek i sur. 2007). U šumarstvu velike štete čini u rasadnicima, osobito u kljajalištima. *B. cinerea* živi saprotrofnim načinom života, razgrađujući biljne ostatke različitih domaćina sve dok odgovarajući vanjski faktori ne potaknu prelazak u parazitski način života. U uvjetima veće količine dostupnih hranjiva, povećava se vitalnost i agresivnost gljive te tada postaje sposobna prodrijeti u zdravo biljno tkivo. Kao nekrotrofni patogen, *B. cinerea* uzrokuje ekonomski značajnu bolest naziva siva plijesan.

Na sjemenu i površini vegetativnih biljnih organa, pojava sive plijesni očituje se u razvoju karakteristične sive paučinaste mase hifa, konidiofora i konidija (Glavaš 1999). Prema Ellis (1971), *Botrytis cinerea* uzrokuje nekrozu cvjetova, pupova, lišća i izbojaka te polijeganje ponika i trulež plodova. Parazitira na velikom broju različitih biljnih domaćina, uključujući poljoprivredne kulture i ukrasne vrste (Jarvis 1977, Elad i sur. 2007). Konidije *Botrytis cinerea* vrše zaraze cvjetova dovodeći do njihove paleži (nekroze) ili pojave latentnih infekcija (Tarbath i sur., 2014). U proljeće, u uvjetima visoke zračne vlage, gljiva napada izbojke (Tomiczek i sur. 2007). Konidije *B. cinerea* također mogu zaraziti plod u različitim fazama razvoja (Adaskaveg i sur., 2000). Budući da patogen prezimljuje u zaraženim mumificiranim plodovima, njihovo uklanjanje može značajno smanjiti rizik od sekundarnih infekcija (Tarbath i sur., 2014). Prevenciju razvoja sive plijesni uvelike otežava velika prilagodljivost vrste *B. cinerea* koja može preživjeti nepovoljne okolišne uvjete u obliku micelija, konidija ili sklerocija na biljnim ostacima te se može koristiti većim brojem različitih domaćina kao potencijalnim izvorima inokuluma (Williamson i sur. 2007).

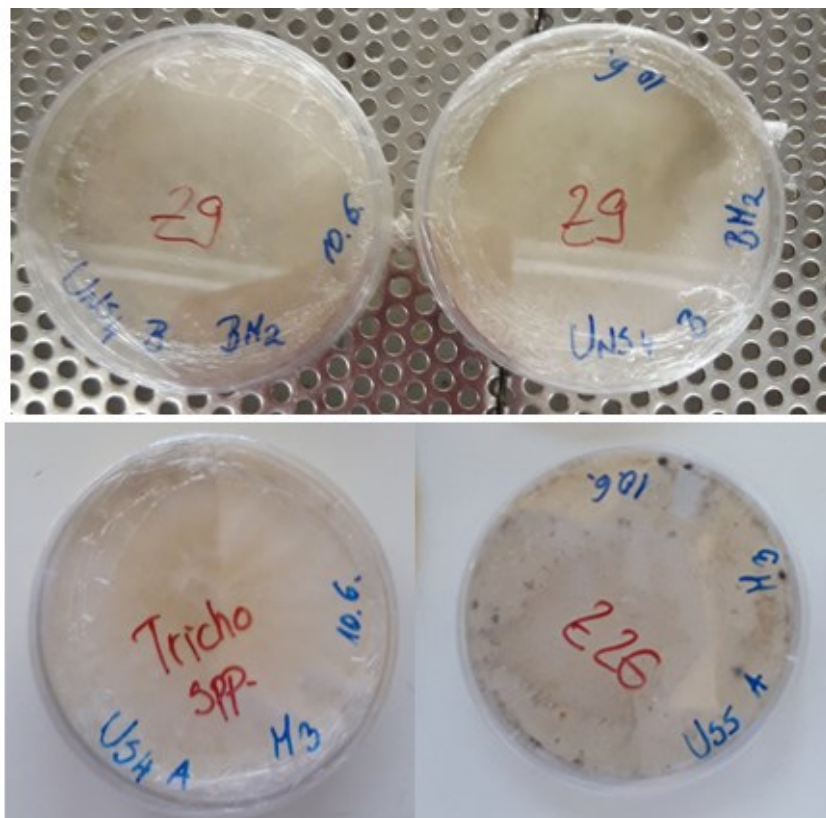
Genetska plastičnost *B. cinerea* ubrzava pojavu njene rezistentnosti na preventivne fungicide, pa se sve veći broj istraživanja provodi u svrhu utvrđivanja učinkovitih bioloških mjera zaštite. Dosadašnja istraživanja patoloških promjena koje *Botrytis cinerea* izaziva na vrsti *Prunus avium* usmjerena su najvećim dijelom na prevenciju štete od truleži plodova te se u dostupnoj literaturi ne navodi pojava i izgled nekroze lišća na tom konkretnom biljnom domaćinu. Međutim, dostupni su detaljniji opisi nekrotičnih lezija na lišću poljoprivrednih kultura (Williamson i sur. 2007) te ukrasnih vrsta biljaka (Özer i Bayraktar, 2014). U svojoj studiji iz 2014. godine autori Özer i Bayraktar navode kako je *B. cinerea* potvrđena kao uzročnik nekrotičnih lezija na cvjetnim dijelovima i lišću *Cornus florida* L. u Turskoj te kako se patogen proširio sa zaraženih cvjetnih brakteja na lišće. Prema spomenutim autorima, prvi simptomi sive plijesni uključivali su pojavu manjih smeđih pjega na cvjetnim braktejama. Pjege su se postupno širile, sve dok sivosmeđa prevlaka sastavljena od micelija, konidiofora i konidija nije u potpunosti zahvatila površinu brakteja. Zaraza se potom proširila na lišće na kojemu je isprva uočena pojava smeđih nekrotičnih lezija, a zatim i razvoj sivosmeđega micelija (Slika 13). Također je primijećen simptom ljevkastog uvijanja lišća te sušenja i odumiranja izbojaka.

Premda se vrsta *B. cinerea* u literaturi ne spominje u kontekstu nekroze lišća *Prunus avium*, utvrđeno je kako je *B. cinerea* bila učestalo izolirana iz lišća *Malus sylvestris* var. *domestica* 'Golden Delicious' (Falconi i Mendgen, 1994). Usto, Haddadadrafshi i sur. (2011) navode kako je rod *Botryotinia* bio jedan od brojnih rodova gljiva izoliranih iz više tipova tkiva *Prunus avium*.

Morfološke karakteristike micelija *B. cinerea* izoliranih iz lišća klonova *Prunus avium* u sklopu ovoga rada (Slika 14) podudaraju se s opisima objavljenima od strane Özer i Bayraktar (2014) koji navode kako je površina kolonije *B. cinerea* razvijene u in vitro uvjetima na PDA podlozi isprva bila bezbojna. Nakon inkubacije u trajanju od petnaest dana, površina kolonije je poprimila sivosmeđu boju te je uočen razvoj konidija (Özer i Bayraktar 2014).



Slika 13. Pojava nekrotičnih lezija na lišću *Cornus florida* uzrokovana napadom gljive *Botrytis cinerea* (lijevo) i širenje micelija *Botrytis cinerea* po čitavoj površini zaraženog lišća *Cornus florida* (desno) (Izvor: Özer i Bayraktar 2014)

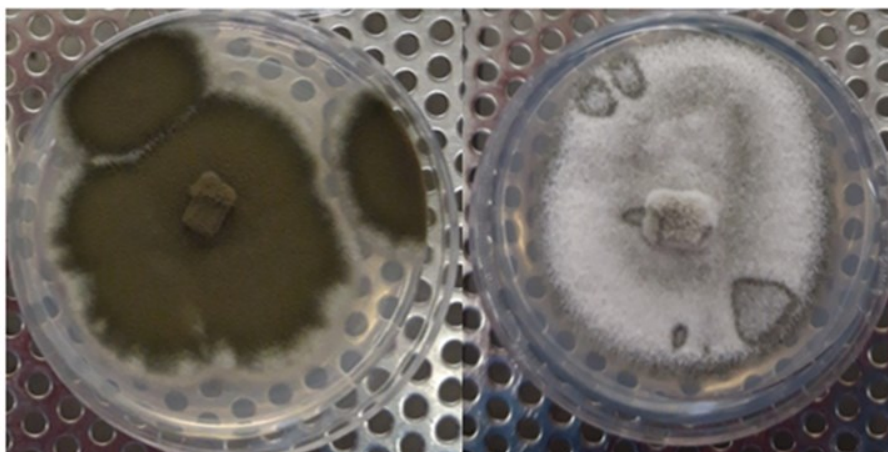


Slika 14. Čiste kulture micelija *Botrytis cinerea* na PDA podlozi i starosti 14 dana

5.3 Uloga vrsta roda *Cladosporium* Link ex Fries u pojavi nekrotičnih lezija na lišću klonova divlje trešnje u KSP Kutina

U ovome radu je utvrđeno kako je rod *Cladosporium* Link ex Fries bio najčešće izolirani takson (42,86 %) iz svih uzoraka simptomatičnog lisnog tkiva koje je pokazivalo simptom B, neovisno o površinskoj sterilizaciji (Grafikon 8). Prema Hyde i Soyong (2008), pretjerana brojnost vrsta iz roda *Cladosporium* česta je posljedica neispravne, odnosno nedovoljne površinske sterilizacije uzoraka. Međutim, u uzorcima lisnog tkiva iz KSP Kutina, rod *Cladosporium* nije bio prisutan samo u kontrolnoj skupini bez površinske sterilizacije, već i u obje kategorije površinski steriliziranih uzoraka (Grafikon 4, Grafikon 5 i Grafikon 6).

Sukladno opisima Kidd i sur. (2016), miceliji roda *Cladosporium* uzgojeni na PDA hranjivoj podlozi pokazivali su sivozeleno do maslinasto zeleno obojenje s gornje strane kolonije, dok su odozdo kolonije bile crnozeleno boje. Slika 15 prikazuje morfološke karakteristike čistih kultura micelija *Cladosporium* sp. izoliranih iz simptomatičnog lisnog tkiva klonova *Prunus avium* iz KSP Kutina.



Slika 15. Čista kultura micelija *Cladosporium* sp. na PDA podlozi, predstavljenog morfolipom 1 (oznaka Z1) i starosti 14 dana (lijevo) te čista kultura micelija *Cladosporium* sp. na PDA podlozi, predstavljenog morfolipom 3 (oznaka Z3) i starosti 14 dana (desno)

Cladosporium Link ex Fries je rod široko rasprostranjenih saprotrofnih gljiva i oportunističkih patogenih (Ogórek i sur. 2012) koji su zabilježeni na širokom rasponu domaćina i svim tipovima supstrata, a njihove su spore redovito prisutne u tlu i vodi (Bensch i sur. 2012). Konidije *Cladosporium* spp. također predstavljaju najčešće izoliranu česticu gljivičnog porijekla utvrđenu u sastavu atmosferskog zraka (Farr i sur. 1989, Flannigan 2001, Mullins 2001). Za razliku od konidijskog stadija obuhvaćenog rodom *Cladosporium*, savršeni (telemorfni) stadij *Davidiella* Crous & U. Braun se u prirodi rijetko pojavljuje (Ogórek i sur. 2012).

Filogenetske studije vrsta *Cladosporium* s. lat. potvrđuju kako je riječ o vrlo heterogenom rodu (Braun i sur. 2003). Rod *Cladosporium* obuhvaća 772 taksonomske jedinice, a velika brojnost taksona djelomično je posljedica značajne morfološke varijabilnosti koju pripadnici ovoga roda pokazuju na različitim tipovima supstrata (Dugan i sur. 2004). *Cladosporium* spp. pokazuju najveću aktivnost u uvjetima niskih temperatura i visokog udjela zračne vlage (Kwon i sur. 2001) te su upravo takvi vremenski uvjeti nužni za sporulaciju, ostvarivanje infekcije i razvoj bolesti (Ogórek i sur. 2012).

Bensch i sur. (2012) su nakon revizije roda utvrdili da se, suprotno prethodnim pretpostavkama, manji broj *Cladosporium* spp. može smatrati polifagnima. Takve su vrste primjerice *Cladosporium herbarum*, *C. cladosporoides*, *C. oxysporum* i *C. sphaerospermum* koje se ujedno ubrajaju u kozmopolitske saprotrofne vrste bez specifičnih zahtjeva prema staništu. Međutim, dio saprotrofnih predstavnika roda *Cladosporium* naseljava vrlo specifične ekološke niše poput ekstremno slanih staništa (Schubert i sur. 2007). Vrste roda *Cladosporium* se također javljaju kao hiperparaziti na drugim askomicetnim i bazidiomicetnim vrstama (Heuchert i sur. 2005), sekundarni kolonizatori nekrotičnih lezija uzrokovanih drugim gljivama (Ellis 1971, Ellis 1976), endofiti (Reisen i Sieber 1985, Brown i sur. 1998, El-Morsy 2000) i epifiti na lišću zdravih biljaka (Islam i Hasin 2000, de Jager i sur. 2001, Inacio i sur. 2002, Stohr i Dighton 2004, Levetin i Dorseys 2006). Pa ipak, brojnije su biotrofne, slabo patogene vrste koje su specijalizirane za određeni biljni rod ili vrstu te koje uzrokuju pojavu tipičnih simptoma poput pjegavosti, diskoloracije i nekroze lišća domaćina (Bensch i sur. 2012).

S obzirom da je riječ o oportunističkim patogenima, vrste roda *Cladosporium* su sklone prelasku sa saprotrfnog i endofitskog načina života na parazitski način života u povoljnim uvjetima. Jedna od takvih vrsta je i *Cladosporium herbarum* za koju je utvrđeno da uzrokuje patološke promjene uslijed pada vitaliteta domaćina izloženog stresu (De Vries 1952, Ellis 1971, O'Donnell i Dickinson 1980, Despoulain i sur. 1990). Premda je pojava nekrotičnih pjega na lišću uslijed napada različitih vrsta roda *Cladosporium* zabilježena na mnogim biljnim domaćinima (Bitancourt 1935, Anilkumar i Seshandri 1975, Berner i sur. 2007, Oliveira i sur. 2014, Zheng i sur. 2014, Walker i sur. 2016, Ayoubi i sur. 2017), dostupna literatura ne pruža informacije o izgledu i pojavi nekrotičnih lezija na lišću *Prunus avium*, a koje su nastale kao posljedica napada gljiva iz roda *Cladosporium*.

Međutim, Baiswar i sur. (2011) su testovima patogenosti dokazali kako je gljiva *Cladosporium oxysporum* uzrokovala pojavu nekrotičnih pjega na lišću *Prunus nepalensis* u Indiji. Opisane nekrotične lezije na lišću sadnica širile su se od ruba lista prema glavnoj žili (Slika 16) te je u uznapređovalom stadiju nekroza zahvatila čitavu površinu plojke lista. Nekrotične lezije imale su klorotični rub, a na naličju lista bili su vidljivi znakovi obilne sporulacije. Prema Baiswar i sur. (2011), jedan od karakterističnih simptoma bila je i pojava značajne osutosti krošnje oboljelih jedinki *Prunus nepalensis*. *C. oxysporum* je primarno saprotrfna vrsta, no također je utvrđena kao patogen na nekoliko vrsta biljnih domaćina (Farr i Rossman 2010).

Unatoč tomu što je simptom B na lišću *Prunus avium* iz KSP Kutina podrazumijevao širenje nekrotičnih lezija većih dimenzija od ruba prema glavnoj žili (Slika 10), što se može primijetiti i u slučaju simptoma na lišću *Prunus nepalensis* (Slika 16), širenje nekroze lisnim tkivo *P. avium* nije bilo ograničeno klorotičnim rubom te nije bilo vidljivih fruktifikacija s donje strane plojke lista (Slika 9). Klorotični rub nekrotičnih lezija česti je simptom koji se primjećuje prilikom napada nekrotrofnih patogena, a nastaje širenjem metabolita, najčešće mikotoksina u biljno tkivo (Tewari 1983, Agarwal i sur. 1997). Stoga se, unatoč visokom udjelu zastupljenosti roda *Cladosporium* u uzorcima tkiva koje je pokazivalo simptom B (Grafikon 8), ne može donijeti jednoznačni zaključak kako su upravo vrste roda *Cladosporium* mogući uzročnici nekroze lišća klonova divlje trešnje.



Slika 16. Širenje nekrotičnih lezija na lišću *Prunus nepalensis* uzrokovanih gljivom *Cladosporium oxysporum* (Izvor: Baiswar i sur. 2011)

5.4 Uloga vrsta roda *Epicoccum* Link u pojavi nekrotičnih lezija na lišću klonova divlje trešnje u KSP Kutina

Premda je u literaturi opisano preko 70 vrsta roda *Epicoccum*, rezultati molekularnih analiza potvrdili su postojanje velike unutarvrstne varijabilnosti *Epicoccum nigrum* (Arenal i sur. 1999, Arenal i sur. 2002) Stoga su u kasnijim radovima sve prethodno opisane vrste klasificirane u niži takson, odnosno smatrane su različitim morfološkim i fiziološkim tipovima vrlo varijabilne vrste *Epicoccum nigrum* (Kilpatrick i Chilvers 1981, Coghlan i sur. 2005.). Prema Hawksworth i sur. (1995), rod *Epicoccum* obuhvaća samo vrste *Epicoccum nigrum* i *E. andropogonis*. Međutim, studija provedena od strane De Lima Fávaro i sur. (2011) ukazuje na činjenicu kako bi novija genetska istraživanja mogla rezultirati ponovnom raščlambom *E. nigrum* na veći broj različitih vrsta.

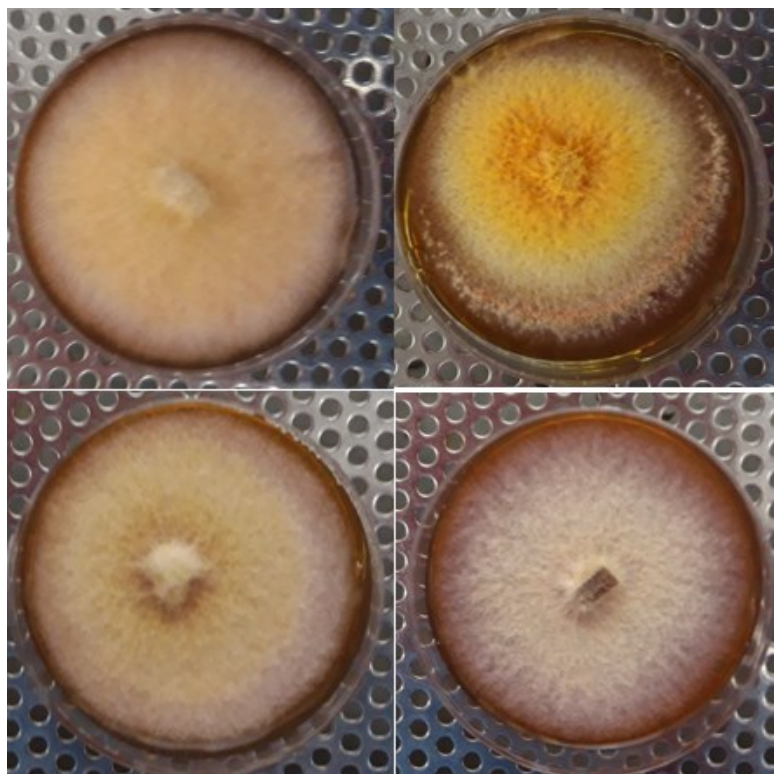
Prilikom identifikacije taksona gljiva izoliranih iz simptomatičnog lišća klonova *Prunus avium* iz KSP Kutina, izoliran je veći broj micelija čija je genetska struktura odgovarala sekvencama pohranjenima u GenBank bazi pod vrstama *Epicoccum nigrum* i *E. layuense* ili je identifikacija bila moguća do razine roda *Epicoccum* (Tablica 3). S udjelom od 21,67 %, vrsta *E. nigrum* predstavljala je najzastupljeniji takson gljiva izoliranih iz svih uzoraka lisnog tkiva sa simptomom A, neovisno o površinskoj sterilizaciji (Grafikon 7). Premda su vrste roda *Epicoccum* bile najviše zastupljene u kategoriji uzoraka sa simptomom A koji nisu bili podvrgnuti površinskoj sterilizaciji (32,14 %) (Tablica 5 i Grafikon 3), gljiva *E. nigrum* je također bila učestalo izolirana iz uzoraka lišća sa simptom A koji su prije daljnje obrade bili podvrgnuti površinskoj sterilizaciji 2 % otopinom natrijeva hipoklorita (Grafikon 1) te uzoraka lišća koje je bilo površinski sterilizirano 70 % otopinom etanola (Grafikon 2).

Stoga se može pretpostaviti kako je ova vrsta potencijalni uzročnik nekrotičnih lezija opisanih pod simptomom A. Također se može zaključiti kako je prije prelaska u parazitski način života, gljiva *E. nigrum* kolonizirala lišće kao endofit i epifit, zauzimajući različite ekološke niše.

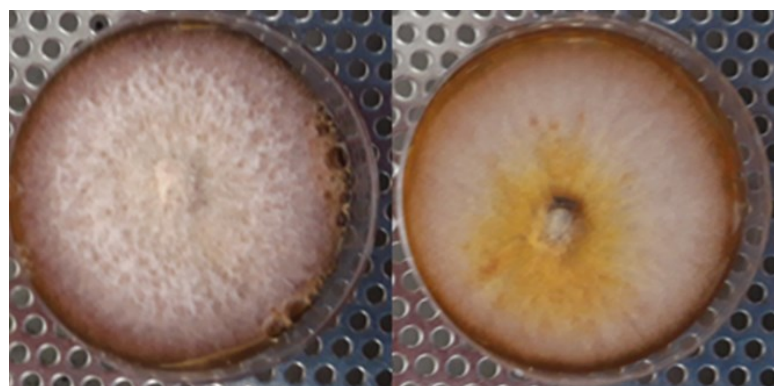
Epicoccum nigrum Link (sinonim *E. purpurascens* Ehrenb. ex Schlecht.) je široko rasprostranjeni pripadnik odjeljka *Ascomycota* koji je izoliran iz različitih tipova tala te velikog broja biljnih domaćina (Mallea i sur. 1991). Premda se *E. nigrum* smatra primarno saprotrofnom vrstom (Mims i Richardson 2005), navedena je i kao slabi biljni patogen (Bruton i sur. 1993). Poput ostalih rasprostranjenih vrsta plijesni, pripadnici roda *Epicoccum* žive i endofitskim načinom života, a izolirani su iz tkiva različitih biljnih vrsta (Arnold 2007, Schulz i Boyle 2005). *E. nigrum* proizvodi široki raspon obojenih i neobojenih spojeva antibiotskih svojstava i prirodnih fungicida u svrhu preživljavanja i kompeticije s drugim gljivama te bakterijama tla (Gribanovski-Sassu i Foppen 1967, Brown i sur. 1987). Smatra se kako je velika genotipska i fenotipska varijabilnost zaslužna za mogućnost preživljavanja *E. nigrum* u različitim uvjetima staništa i zauzimanja različitih ekoloških niša. Utvrđeno je kako *Epicoccum nigrum* pokazuje antagonističko djelovanje na važne patogene vrste gljiva, među ostalima i na patogene divlje trešnje poput *Botrytis cinerea* (Peng i Sutton 1991) i *Monilinia laxa* (Larena i sur. 2004), a korištena je kao mjera biološke zaštite od vrsta roda *Monilinia* na breskvama (*Prunus persica* (L.) Batsch) i nektarinama (*Prunus persica* var. *nucipersica* (L.) C. K. Schneid.) (Larena i sur. 2005, Mari i sur. 2007, De Cal i sur. 2009).

Vrsta *Epicoccum layuense* Q. Chen, Crous & L. Cai, sp. nov. izolirana je iz lišća *Perilla* sp. (*Lamiaceae*) u mjestu Layue na Tibetu. Vrsta je opisana u radu Chen i sur. (2017), gdje se navodi kako je uzrokovala pojavu pjegavosti lišća. Pjege su bile tamnosmeđe boje i promjera do 12 milimetara. *Epicoccum layuense* je utvrđena i kao uzročnik tamnosmeđih pjega na lišću *Camellia sinensis* u Kini. Pjege su isprva bile manjih dimenzija, a zatim su se širile tvoreći veće nekrotične lezije. Veće štete zabilježene su na mlađem lišću *Camellia sinensis* (Chen i sur. 2020).

Morfološke karakteristike izolata *E. nigrum* razvijenih na PDA podlozi i izoliranih iz lisnog tkiva klonova *Prunus avium* iz KSP Kutina (Slika 17) odgovaraju opisima objavljenima u Ellis (1971), Domsch i sur. (1980), McGinnis (1980) te Samson i sur. (1995) prema kojima *E. nigrum* stvara kolonije brzog rasta i jarkog žutog, narančastog ili crvenog obojenja. Na površini kolonije dolazi do razvoja brojnih sporodohija u obliku crnih točkica koje su raširene po čitavoj površini kolonije. Zabilježeno je da se rast micelija *E. nigrum* odvija u rasponu temperature od -3°C do +45°C i pri vrijednostima pH od 3,0 do 4,5 (Fatima i sur. 2016).



Slika 17. Čiste kulture micelija *Epicoccum nigrum* na PDA podlozi, predstavljene morfolipom 16 i starosti 14 dana



Slika 18 Čista kultura micelija *Epicoccum* sp. na PDA podlozi, predstavljenog morfolipom 17 i starosti 14 dana (lijevo) te čista kultura micelija *Epicoccum nigrum*/*E. layuense* na PDA podlozi, predstavljenog morfolipom 18 i starosti 14 dana (desno)

5.5 Uloga ostalih izoliranih taksona gljiva u pojavi nekrotičnih lezija na lišću klonova divlje trešnje u KSP Kutina

Prema Pimenta i sur. (2012), zajednicu gljivičnih endofita određenog domaćina u većini slučajeva čini nekoliko dominantno prisutnih vrsta te raznolika populacija manje zastupljenih taksona gljiva. Potvrđujući navode spomenutih autora, tijekom provođenja ovoga istraživanja izolirana su četiri dominantno prisutna taksona (vrste *Aureobasidium pullulans*, *Botrytis cinerea*, *Epicoccum nigrum*, i rod *Cladosporium*) te veći broj taksonomskih jedinica zastupljenih s malim brojem jedinki. Premda čine dio biološki raznolike zajednice gljiva koja

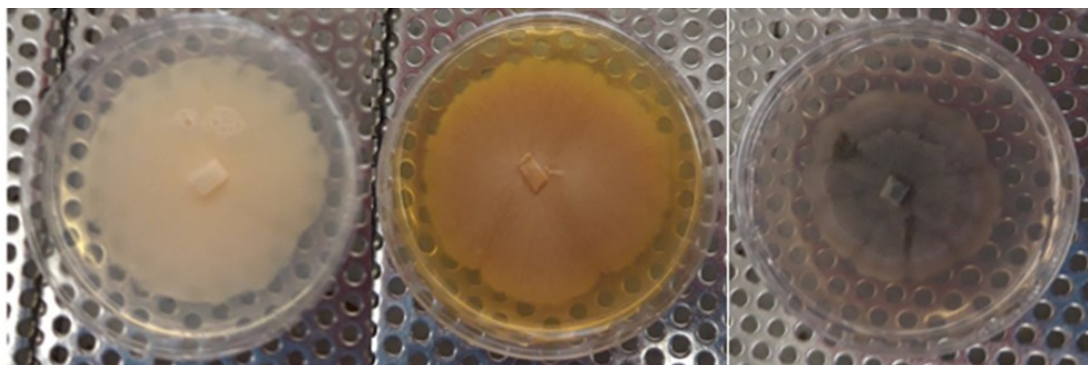
u cjelini znatno utječe na vitalitet biljnog domaćina, može se zaključiti kako taksoni zastupljeni s tek nekoliko micelija nisu imali ključnu ulogu u pojavi nekrotičnih lezija na lišću ispitivanih klonova divlje trešnje u KSP Kutina.

5.5.1. *Aureobasidium pullulans* (de Bary et Löwenthal) G. Arnaud

Aureobasidium pullulans (De Bary et Löwenthal) G. Arnaud je kozmopolitska vrsta iz odjeljka *Ascomycota* koja ispoljava saprotrofni, epifitski, endofitski i parazitski način života. Jedna je od najpoznatijih gljiva plavila drva (Humar i sur. 2008) te najraširenijih i najčešće izoliranih vrsta gljivičnih endofita (Boddy i Griffith 1989). Prisutnost gljive *A. pullulans* bila je utvrđena u svim kategorijama uzoraka lisnog tkiva klonova divlje trešnje iz KSP Kutina, neovisno o tipu simptoma ili primjeni površinske sterilizacije (Tablica 5 i Tablica 6). Za razliku od uzoraka tkiva sa simptomom A, ova je vrsta bila češće izolirana iz simptomatičnog lišća sa simptomom B (Grafikon 7 i Grafikon 8).

Aureobasidium pullulans predstavljala je najzastupljeniju vrstu u svim uzorcima lisnog tkiva sa simptomom B, neovisno o površinskoj sterilizaciji (25,71%) (Grafikon 8). Nakon roda *Cladosporium*, vrsta *A. pullulans* bila je također drugi najprisutniji takson u kategoriji uzoraka tkiva sa simptomom B koje je bilo površinski sterilizirano otopinom 70 % etanola (19,05 %) (Grafikon 5) te kategoriji uzoraka tkiva sa simptomom B koje nije bilo podvrgnuto površinskoj sterilizaciji (43,33%) (Grafikon 6). Rezultati dobiveni tijekom provedbe ovoga rada potvrđuju rezultate prethodnih istraživanja prema kojima je *A. pullulans* jedna od najzastupljenijih vrsta na domaćinima roda *Prunus*. Prema Thambugala i sur. (2014), vrste roda *Aureobasidium* Viala & Boyer koloniziraju izbojke, lišće i drvo različitih biljnih domaćina. Prilikom izolacije endofitskih vrsta iz izbojaka vrsta roda *Prunus* provedene u Njemačkoj u sklopu studije autora Bien i Damm (2020a), utvrđena je prisutnost gljive *Aureobasidium pullulans* u izbojcima, odnosno drvenoj tvari *Prunus avium*, *P. cerasus* i *P. domestica*. U istraživanju Hortová i Novotný (2011), *Aureobasidium pullulans* je, uz gljivu *Alternaria alternata*, predstavljala endofitsku vrstu s najvećim postotkom zastupljenosti u granama *Prunus cerasus*. Usto, gljiva *Aureobasidium pullulans* prepoznata je kao jedan od uzročnika diskoloracija pokožice, odnosno mrljavosti plodova jabuke i kruške (Grabowski 2007, Sun i sur. 2008). Karakteristični simptomi uključuju maslinastozelene mrlje na površini plodova, a uzročnici su neparazitski epifiti plodova (Nelson 2008).

Kolonije *Aureobasidium pullulans* na PDA podlozi pokazuju brzi rast i razvijaju blijedoružičasti ili bijeli micelij nepravilnih rubova koji starenjem poprima smeđu do crnu boju. Glatka površina kolonije je, uslijed obilne sporulacije, prekrivena nakupinom konidija (Kidd i sur. 2016). Na slici 19 vidljiva je varijabilnost morfoloških karakteristika micelija vrste *A. pullulans* koja je bila učestalo izolirana iz lišća klonova divlje trešnje u KSP Kutina.



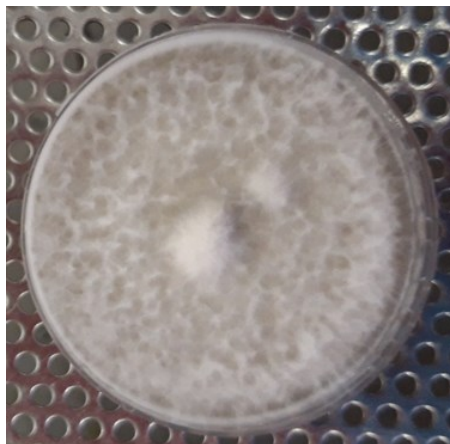
Slika 19. Čista kultura micelija *Aureobasidium pullulans* na PDA podlozi, starosti 14 dana i predstavljena morfotipom 5 (oznaka Z7) (lijevo), čista kultura micelija *A. pullulans* na PDA podlozi, starosti 14 dana i predstavljena morfotipom 5 (oznaka Z8) (sredina) te čista kultura micelija *A. pullulans* na PDA podlozi, starosti 21 dan i predstavljena morfotipom 13 (oznaka Z16) (desno)

5.5.2. *Alternaria infectoria* E. G. Simmons / *A. caespitosa* (de Hoog & C. Rubio) Woudenb. & Crous

Iz uzoraka lišća divlje trešnje sakupljenog u KSP Kutina koje je pokazivalo simptom A i koje nije bilo podvrgnuto površinskoj izolaciji izolirane su samo tri jedinice identificirane kao vrste *Alternaria infectoria* E. G. Simmons ili *A. caespitosa* (de Hoog & C. Rubio) Woudenb. & Crous (Tablica 5 i Grafikon 3). Rod *Alternaria* Nees ex Fries obuhvaća široko rasprostranjene saprotrofne, endofitske i slabo patogene vrste askomicetnih gljiva koje naseljavaju široki raspon supstrata poput vegetativnih biljnih organa, sjemena, poljoprivrednih proizvoda, životinjskih tkiva, tla i atmosfere (Woudenberg i sur. 2013). Ove nespecifične plijesni (Glavaš 1999) su primarno saprotrofi, no u odgovarajućim uvjetima djeluju kao oportunistički biljni patogeni koji uzrokuju veći broj ekonomski značajnih bolesti poljoprivrednih kultura poput raka kore stabljike, pjegavosti i paleži lišća te truleži sjemena. Unutar roda *Alternaria*, vrste se međusobno razlikuju po virulentnosti, a mnoge od njih se pojavljuju i djeluju zajednički čineći kompleks uzročnika patoloških promjena u domaćinu (Thomma 2003). Osim kultiviranog i ukrasnog bilja, vrste roda *Alternaria* napadaju i šumsko drveće.

U tom smislu ističe se vrsta *Alternaria alternata* (Fr.) Kisler koja čini značajne štete na plodovima i sjemenu šumskoga drveća (Glavaš 1999). U kontekstu štete na lišću, vrste roda *Alternaria* dovode do sporog odumiranja lisnog tkiva domaćina smanjujući asimilacijsku površinu. Infekcija rezultira stvaranjem nekrotičnih lezija koje ponekad imaju oblik mete. U središtu lezije nalazi se gljiva, a rub lezije je žute boje (Thomma 2003). Vrsta *Alternaria infectoria* utvrđena je kao slabi patogen *Tanacetum cinerariifolium* u sjevernoj Tasmaniji (Australija), a dovela je do stvaranja sitnih crnih, nekrotičnih lezija s obje strane zaraženoga lišća (Moslemi i sur. 2017). Rod *Alternaria* također je izoliran iz simptomatičnog lišća *Prunus laurocerasus* (lovorvišnja) u slovačkom gradu Nitri te je utvrđen kao dio kompleksa uzročnika koji je izazvao pojavu diskoloracije, pjegavosti i nekroze lišća i izbojaka te u konačnici odumiranja zaraženih jedinki *Prunus laurocerasus* (Bernadovičová i Ivanová 2011). Poput rodova *Cladosporium* i *Epicoccum*, vrste roda *Alternaria* prelaze s endofitskog ili saprotrofnog načina života u parazitski način života ukoliko uspiju kolonizirati tkivo nakon mehaničke ozljede ili općeg fiziološkog slabljenja biljke domaćina (Thomma 2003). Uzgojene na

hranjivim podlogama, kolonije vrsta roda *Alternaria* pokazuju brzi rast crnog do maslinastozelenog ili sivog micelija (Kidd i sur. 2016). Jedinke *Alternaria infectoria/A. caespitosa* koje su bile izolirane iz simptomatičnog lišća *Prunus avium* u KSP Kutina i uzgojene na PDA hranjivoj podlozi pokazivale su brzi rast zračnoga micelija sivobijele boje (Slika 20).



Slika 20. Čista kultura micelija *Alternaria infectoria/A. caespitosa* na PDA podlozi, starosti 14 dana i predstavljenog morfotipom 9 (oznaka Z12)

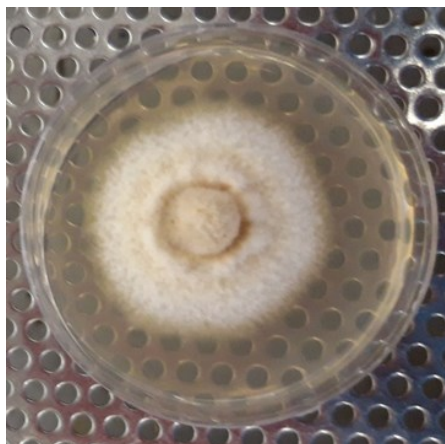
5.5.3 *Aposphaeria corallinolutea* Gruyter / *Dendrophoma pleurospora* Sacc.

Iz lisnog tkiva klonova *Prunus avium* iz KSP Kutina koje je pokazivalo simptom B i koje je bilo površinski sterilizirano otopinom natrijeva hipoklorita (NaOCl, 2 %) izolirane su samo dvije jedinke (Tablica 6 i Grafikon 4) koje su zbog velike srodnosti identificirane kao vrste *Aposphaeria corallinolutea* Gruyter ili *Dendrophoma pleurospora* Sacc (Tablica 3).

Aposphaeria Berk. je slabo poznati rod kojega novije studije temeljene na rezultatima molekularnih analiza smještaju u porodicu *Melanommataceae* (de Gruyter i sur. 2013, Tian i sur. 2015). *Aposphaeria corallinolutea* Gruyter smatra se saprotrofnom vrstom. Prvi puta je opisana u radu Gruyter i sur. (2013), pri čemu su domaćini bili *Kerria japonica* (L.) DC. i *Fraxinus excelsior* L. Prema studiji autora Bien i Damm (2020), *A. corallinolutea* je predstavljala najzastupljeniju vrstu u drvu ispitivanih stabala *Prunus avium*, *P. cerasus* i *P. domestica* L. u Njemačkoj, a izolirana je iz prijelazne zone nekrotičnog i zdravog te samo zdravog drvnog tkiva. Također je izolirana iz drvene tvari zahvaćene truleži na Tajlandu (Li i sur. 2016), odumrlih grana *Prunus padus* L. u Rusiji (Tibpromma i sur. 2017) te iglica *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco u Sjedinjenim Američkim Državama (Daniels 2017). Bien i Damm (2020) smatraju kako se ne radi o rijetkoj vrsti, već da se mali broj prijavljenih slučajeva prisutnosti *A. corallinolutea* može pripisati činjenici da je njena ITS sekvenca dodana GenBank bazi tek 2017. godine (Li i sur. 2016).

De Gruyter i sur. (2013) također su opisali vrstu *Dendrophoma pleurospora* Sacc., ali pod nazivom *Pleurophoma pleurospora* (Sacc.) Höhn te je utvrđeno kako je ova gljiva bila izolirana iz lišća *Laurus nobilis* L. u Francuskoj, drva *Lonicera* sp. (*Caprifoliaceae*) u Nizozemskoj i lezija na izbojcima *Cytisus scoparius* (L.) Link. Osim navedenih domaćina, *Dendrophoma pleurospora* je utvrđena na *Quercus glauca* Thunb. u Gruziji (Bitsadze i sur. 2018). Prema Li i

sur. (2016), vrste roda *Aposphaeria* na PDA hranjivoj podlozi razvijaju zračni micelij. Površina kolonije je isprva bijele boje (Slika 21), a starenjem poprima maslinasto zelenu do smeđu boju. Središte kolonije poprima zelenkastosivu boju, dok je rubni dio bijele boje.



Slika 21. Čista kultura micelija *Aposphaeria corallinolutea*/*Dendrophoma pleurospora* na PDA podlozi, starosti 14 dana i predstavljenog morfotipom 8 (oznaka Z11)

5.5.4 *Paraconiothyrium brasiliense* Verkley

U sklopu ovoga rada, dvije jedinice identificirane do razine roda *Paraconiothyrium* izolirane su iz lisnog tkiva sa simptomom B koje je bilo podvrgnuto površinskoj sterilizaciji otopinom etanola (70 %) (Grafikon 5), dok su također dvije jedinice vrste *Paraconiothyrium brasiliense* izolirane iz tkiva sa simptomom B koje je bilo površinski sterilizirano otopinom natrijeva hipoklorita (2%) (Grafikon 4). Ovakvi rezultati potvrđuju kako je *P. brasiliense* kolonizirala ispitivano lisno tkivo kao endofitska vrsta. Rod *Paraconiothyrium* Verkley u sistematiku gljiva uveli su Verkley i sur. (2004) te je dosada prihvaćeno 15 vrsta, od kojih jedino *Paraconiothyrium fuckelii* (Fuckel) Verkley & Gruyter ima poznati savršeni stadij (Damm i sur. 2008c, De Gruyter i sur. 2013, Verkley i sur. 2014).

Vrsta *Paraconiothyrium brasiliense* Verkley opisana je na temelju izolata iz ploda *Coffea arabica* L. Brazila (Verkley i sur. 2004), a kao endofitska vrsta izolirana je iz vizualno zdravog lišća javora (*Acer* sp.) u Republici Koreji (Paul i Lee 2014), lišća *Alliaria petiolata* (M. Bieb.) Cavara et Grande u Sjedinjenim Američkim Državama, iglica *Picea glauca* (Moench) Voss u Kanadi te drva zdrave jedinice *Platanus x hispanica* Münch. u Italiji. Verkley i sur. (2014) navode kako su gotovo identične ITS sekvence pohranjene u GenBank bazi kao endofiti izolirani i iz drugih domaćina poput *Ginkgo biloba* L., *Ulmus davidiana* var. *japonica* (Rehder) Nakai i *Juniperus virginiana* L. (Hoffman i Arnold 2008). Tijekom istraživanja mikobioma drva vrsta iz roda *Prunus* u južnoj Africi, Damm i sur. (2008c) su utvrdili redovitu prisutnost endofitskih gljiva roda *Paraconiothyrium*. Pritom je vrsta *Paraconiothyrium brasiliense* izolirana iz piknida na kori *Prunus persica* (breskva) te nekrotičnog drvnog tkiva *P. persica* var. *nucipersica* (nektarina) i *P. salicina* Lindl.

Gljiva *Paraconiothyrium variabile* Riccioni, Verkley & Crous je bila često izolirana iz nekrotičnog drvnog tkiva *Prunus salicina* i *P. persica* te piknida na kori grana *P. persica*.

Prisutnost *Paraconiothyrium variable* također je utvrđena u nekrotičnom drvnom tkivu *Actinidia chinensis* u Italiji (Riccioni i sur. 2007) i lišću *Laurus nobilis* u Turskoj (Göre i Bucak 2007). Osim *Paraconiothyrium brasiliense* i *Paraconiothyrium variable*, iz piknida na kori stabala *Prunus persica* u južnoj Africi izolirana je i vrsta *Paraconiothyrium africanum* Damm, Verkley & Crous. Premda su vrste roda *Paraconiothyrium* bile učestalo izolirane iz drva *Prunus* spp. u južnoj Africi, nije dokazano da su bile ujedno i uzročnici nekroze drvnog tkiva (Damm i sur. 2008c).

Nakon prvog opisa i uvođenja *Paraconiothyrium brasiliense* u sistematiku gljiva (Verkley i sur. 2004), potvrđena je prisutnost ove vrste u drvnom i lisnom tkivu različitih biljnih domaćina i na različitim kontinentima. Stoga se može pretpostaviti kako se radi o kozmopolitskoj endofitskoj vrsti koja se može prilagoditi širokom rasponu potencijalnih domaćina (Damm i sur. 2008c). Morfološke karakteristike kultura micelija *Paraconiothyrium brasiliense* izoliranih iz lišća *Prunus avium* iz KSP Kutina (Slika 22) odgovaraju opisima objavljenima u Verkley i sur. (2004), prema kojima gljiva *Paraconiothyrium brasiliense* razvija isprva supstratni micelij, a nakon četrnaest dana formira se sivkasti zračni micelij. Površina kolonije je nakon sedmodnevne inkubacije na PDA pri 25°C prozirno bijele boje. Starenjem postaje medeno žute ili jantarne do tamnocrvene boje, s vidljivim koncentričnim uzorkom.



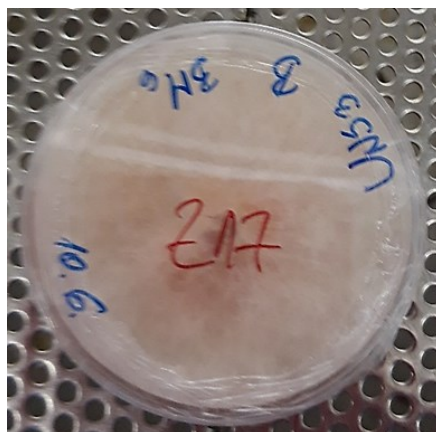
Slika 22. Čista kultura micelija *Paraconiothyrium* sp. na PDA podlozi, starosti 14 dana i predstavljena morfolipom 7 (oznaka Z10) (lijevo) te čista kultura micelija *Paraconiothyrium brasiliense* na PDA podlozi, jednake starosti i predstavljena morfolipom 11 (oznaka Z14) (sredina i desno)

5.5.5 *Fusarium sporotrichioides* Sherb.

Vrste roda *Fusarium* Link ubrajaju se u najvažnije patogene gljive tla, a uzrokuju ekonomski značajne štete na poljoprivrednom, kultiviranom i šumskom bilju (Glavaš 1999). Dvije jedinke *Fusarium sporotrichioides* bile su izolirane iz uzoraka lisnog tkiva stabala divlje trešnje u KSP Kutina koje je pokazivalo simptom B i koje nije bilo površinski sterilizirano (Grafikon 4). Rod *Fusarium* obuhvaća oko 70 vrsta (Leslie i Summerell 2006) od kojih su mnoge saprofiti tla. Uz rod *Pythium*, gljive iz roda *Fusarium* najčešći su uzročnici polijeganja ponika i patogeni šumskoga sjemena. Jedna od najpoznatijih i najštetnijih vrsta je *Fusarium oxysporum* Schleht. koja se smatra fakultativnim parazitom (Glavaš 1999). Osim parazitskog i saprotrofnog, pripadnici roda *Fusarium* ispoljavaju i endofitski način života. Rod *Fusarium* jedan od najraširenijih endofitskih rodova utvrđen u tkivu različitih biljnih domaćina (Rashmi i sur 2019). Prema Haddadferafshi (2011), vrste roda *Fusarium* izolirane su iz lišća, izbojaka i

korijena stabala *Prunus avium* 'Péter'. Rod *Fusarium* predstavljao je također jedan od najčešće izoliranih taksona endofitskih gljiva prisutnih u lišću *Malus sylvestris* 'Golden Delicious' (Falconi i Mendgen 1994). *Fusarium sporotrichioides* Sherb. je kozmopolitska vrsta biljnog patogena koja je raširena u tropskom i umjerenom pojasu (Domsch i sur. 1993), a smatra se uzročnikom raka i truleži korijena sadnica (Anderson 1986) te uzročnikom osipanja iglica (Karadžić i Milijašević 2008). Ivanová i sur. (2016) navode kako je ova vrsta jedan od najznačajnijih patogena *Pinus ponderosa* var. *jeffreyi* koji je uzrokovao diskoloraciju i osipanje iglica sadnica u Slovačkoj. Uz rod *Alternaria*, gljive roda *Fusarium* predstavljale su glavne uzročnike nekroze lišća i izbojaka te odumiranja oboljelih jedinki ukrasne vrste *Prunus laurocerasus* u gradu Nitri (Bernadovičová i Ivanová 2011).

Prema Ivanová i sur. (2016), gljiva *Fusarium sporotrichioides* na PDA podlozi razvija zračni micelij bijele do blijedoružičaste boje koji postupno poprima crvenosmeđe obojenje. Na Slici 23 prikazan je micelij *Fusarium sporotrichioides* koji je izoliran iz simptomatičnog lisnog tkiva divlje trešnje u KSP Kutina.



Slika 23. Čista kultura micelija *Fusarium sporotrichioides* na PDA podlozi, starosti 14 dana i predstavljena morfotipom 14 (oznaka Z17)

5.5.6. *Daldinia pyrenaica* M. Stadler & Wollw.

Daldinia pyrenaica M. Stadler & Wollw. je prvi put pronađena na području francuskih i španjolskih Pireneja (Stadler i Baumgartner 2001), a njena je prisutnost utvrđena u Njemačkoj, sjevernoj Španjolskoj, Francuskoj i Ukrajini. Najčešći domaćini su vrste roda *Quercus* i *Salix*, no u Ukrajini je bila izolirana iz drva drugih domaćina poput *Aesculus hippocastanum* L., *Carpinus betulus* L., *Fagus sylvatica* L., *Pyrus communis* L. i *Tilia cordata* Mill. Prema Akulov i Stadler (2008), *D. pyrenaica* predstavlja najčešću vrstu iz roda *Daldinia* koja se pojavljuje na području Kharkova u Ukrajini. Ovakvi nalazi upućuju na moguću prisutnosti *D. pyrenaica* i u drugim zemljama središnje i jugoistočne Europe (Stadler i sur. 2014). U sklopu ovoga rada, dvije su jedinice *Daldinia pyrenaica* bile izolirane iz uzoraka lisnog tkiva klonova divlje trešnje u KSP Kutina koje je pokazivalo simptom B i koje je bilo površinski sterilizirano otopinom natrijeva hipoklorita (2 %) (Grafikon 4). Iako je prisutnost *D. pyrenaica* već utvrđena na brojnim domaćinima, dosadašnja istraživanja još nisu potvrdila kako je riječ o endofitskoj vrsti koja može kolonizirati i lisno tkivo *Prunus avium*. Smatra se kako vrste roda *Daldinia*

predstavljaju endofite koji naseljavaju drveno tkivo živih biljaka sve do mehaničkog oštećenja ili fiziološkog slabljenja domaćina, kada prelaze s endofitskog u saprotrofni način života. Vrste roda *Daldinia* se mogu zadržati u drvu kroz duži vremenski period te ovisno o klimatskim prilikama, na zaraženim se stablima primjećuje obilna ili slaba sporulacija uz istodobnu razgradnju drvene tvari (Stadler i sur. 2014). Premda se ranije smatralo kako su vrste roda *Daldinia* rani kolonizatori stabala oštećenih požarom (Whalley 1996) i rijetke vrste, novija istraživanja ukazuju na redovitu prisutnost gljiva roda *Daldinia* u drvu različitih domaćina (Stadler i sur. 2014).

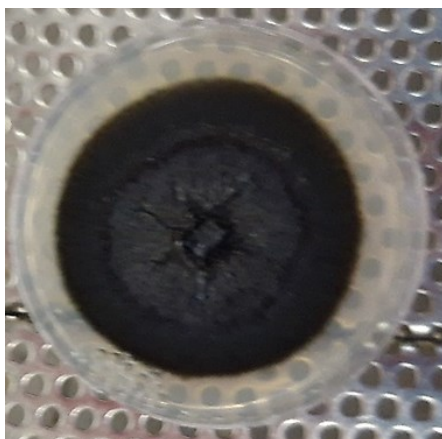
Daldinia pyrenaica razvija bjelkasti micelij difuznih granica koji sporulacijom poprima zelenkastosmeđe obojenje (Stadler i Baumgartner 2001). Na Slici 25 prikazane su morfološke karakteristike kulture micelija *Daldinia pyrenaica* izoliranoga iz simptomatičnog tkiva klonova divlje trešnje u KSP Kutina.



Slika 24. Čista kultura micelija *Daldinia pyrenaica* na PDA podlozi, predstavljena morfotipom 19 (oznaka Z25)

5.5.7 Rod *Dothiora* Fr.

Iz lisnog tkiva stabala divlje trešnje iz KSP Kutina koje je pokazivalo simptom A i koje nije bilo podvrgnuto površinskoj sterilizaciji izolirane su tri jedinice identificirane do razine roda *Dothiora* Fr (Grafikon 3). Spomenuti rod obuhvaća telemorfni stadij porodice *Dothideaceae*, dok anamorfni stadiji pripadaju rodu *Dothichiza*. Rod *Dothiora* opisan je na temelju vrste *Dothiora pyrenophora* (Fr.) Fr., saprotrofne gljive koja je bila često izolirana iz odumrlih grana domaćina roda *Sorbus* (*Rosaceae*). Gljive roda *Dothiora* navode se kao saprotrofne ili parazitske vrste koje koloniziraju lišće, izbojke i grane kopnenih biljaka (Thambugala i sur. 2014). Crous i Groenewald (2016) su izolirali vrste roda *Dothiora* iz mrtvog lišća i plodova različitih domaćina, a smatra se kako ove saprotrofne gljive postaju slabi patogeni uslijed pada vitaliteta biljke domaćina (Crous i Groenewald 2017). Nakon sedmodnevne inkubacije micelija *Dothiora* sp. izoliranog iz simptomatičnog lišća klonova *Prunus avium* iz KSP Kutina pri 24°C na PDA hranjivoj podlozi, površina razvijene kolonije je s obje strane pokazivala crno obojenje (Slika 25).



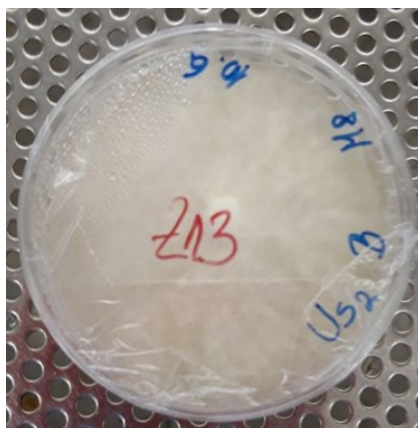
Slika 25. Čista kultura micelija *Dothiora* sp. na PDA podlozi, starosti 14 dana i predstavljena morfolipom 12 (oznaka Z15)

5.5.8 *Cryptosphaeria ligniota* (Fr.) Auersw.

Cryptosphaeria ligniota (Fr.) Auersw. je ksilofagna askomicetna gljiva i agresivna patogena vrsta na *Populus tremuloides* koja izaziva odumiranje svog domaćina (Hinds i Laurent 1978, Hinds 1981). *C. ligniota* je široko rasprostranjena na sjevernoameričkom kontinentu, a javlja se i u Europi na ukrasnim stablima američkih vrsta roda *Populus* (www.fs.usda.gov). Domaćini ovoga patogena mogu biti svi pripadnici porodice *Salicaceae*, no *C. ligniota* je prvenstveno poznata kao uzročnik raka kore i odumiranja stabala *Populus tremuloides* u velikim razmjerima u Sjevernoj Americi (Trouillas i sur. 2015).

C. ligniota inficira tkivo domaćina kroz ozljede na kori i uzrokuje rak kore, no odumiranje oboljelih stabala nastaje uslijed truleži bijeli koju patogen kolonizira. Potom napada kambij i napreduje kroz drvo do srži uzrokujući diskoloracije i žutosmeđu, prošaranu meku trulež. Nakon uspješne kolonizacije i truleži drva, patogen se širi natrag prema kambiju i putem kore dopijeva na površinu izazivajući pritom pojavu rak-rana. Rak-rane mogu biti široke svega pet do deset centimetara, a dugačke i do tri metra. U konačnici mogu zahvatiti deblo u gotovo čitavoj njegovoj duljini. Netom odumrla kora pokazuje svijetlosmeđe do narančasto obojenje u blizini rubnog područja raka. U tijeku jedne do dvije godine, odumrli unutrašnji dio kore postaje crne boje, vlaknast i teksture nalik čađi. Odumrla kora čvrsto priliže uz rak te na njoj postaju vidljiva bijelo obojena područja veličine nekoliko milimetara (www.fs.usda.gov).

Nakon sedmodnevne inkubacije na PDA podlozi pri 24°C, gljiva *Cryptosphaeria ligniota*, izolirana iz lisnog tkiva klonova divlje trešnje iz KSP Kutina, razvila je zračni micelij bijele boje (Slika 26). Sukladno dostupnoj literaturi, *C. ligniota* dosada nije utvrđena na *Prunus avium*, a jedini izolat iz lišća prikupljenoga u KSP Kutina (Grafikon 5) predstavlja moguću kontaminaciju iz okolne vegetacije. Međutim, čak i pojedinačni nalaz može upućivati na mogućnost prilagodbe ovog patogena različitim, dotad neutvrđenim domaćinima.



Slika 26. Čista kultura micelija *Cryptosphaeria ligniota* na PDA podlozi, starosti 14 dana i predstavljena morfotipom 10 (oznaka Z13)

6. ZAKLJUČAK

Premda je divlja trešnja gospodarski značajna autohtona vrsta šumske voćkarice, istraživanja bogatoga mikobioma njenih nadzemnih organa su i na svjetskoj razini zasada još uvijek malobrojna. Pa ipak, postoji pojačani interes za provedbom studija koje bi, primjenom spoznaja o endofitskim i epifitskim zajednicama gljiva, rezultirale razvojem učinkovitih sredstava biološke zaštite od gljivičnih patogena. Izuzev nekoliko najčešćih i ekonomski najznačajnijih uzročnika gljivičnih bolesti divlje trešnje, u dostupnoj stranoj i domaćoj literaturi nema mnogo podataka o slabim patogenima divlje trešnje koji također mogu biti odgovorni za pojavu patoloških promjena na lišću divlje trešnje i potencijalno štetnijih posljedica.

Ovim je radom obuhvaćena analiza uzoraka simptomatičnog lišća *Prunus avium* koje je prikupljeno u svibnju 2020. godine, tijekom postupka vizualne procjene zdravstvenog stanja klonova divlje trešnje u klonskoj sjemenskoj plantaži Kutina. Primjenom molekularnih metoda identificirani su taksoni micelija izoliranih iz simptomatičnog lisnog tkiva ispitivanih klonova te je utvrđeno kako niti na jednom uzorku tkiva nije došlo do razvoja poznatih uzročnika folijarnih bolesti divlje trešnje poput vrsta *S. carpophila* i *A. erythrostoma*. Međutim, ne smije se zanemariti podatak kako je patogena gljiva *Botrytis cinerea* bila jedna od najzastupljenijih vrsta izoliranih iz uzoraka tkiva koje je pokazivalo simptom A. Riječ je o poznatom uzročniku truleži plodova divlje trešnje koji izaziva velike štete u plantažnom uzgoju. No, kako se izgled i obrazac širenja nekrotičnih lezija opisanih pod simptomom A ne podudaraju s opisima nekroze lišća uslijed napada *B. cinerea*, može se zaključiti kako je ovaj patogen bio prisutan u lišću u latentnoj fazi. Stoga je odbačena prvotna pretpostavka kako su opisane nekrotične lezije povezane s prisutnošću najčešćih patogena divlje trešnje.

Sekundarni cilj ovoga rada koji je kasnije postao i njegovom okosnicom, uključivao je utvrđivanje prisutnosti i brojnosti manje poznatih, slabih patogena divlje trešnje koji su prelaskom s endofitskog ili saprotrofnog načina života u parazitski mogli izazvati nekrozu lišća. U svrhu otkrivanja strukture epifitske i endofitske zajednice gljiva koje su kolonizirale lišće ispitivanih klonova, a koje bi se mogle identificirati kao potencijalni uzročnici nekrotičnih lezija, provedena je usporedba brojnosti taksonomskih jedinica micelija zabilježenih u

različitim kategorijama uzoraka s obzirom na primjenu površinske sterilizacije. Tim je postupkom potvrđen očekivani rezultat prema kojemu je najveća brojnost i raznovrsnost jedinki zabilježena u slučaju uzoraka bez površinske sterilizacije. Također je utvrđeno kako je, neovisno o tipu simptoma, najmanja brojnost micelija i različitih taksonomskih jedinica gljiva primijećena na uzorcima podvrgnutima površinskoj sterilizaciji otopinom natrijeva hipoklorita (NaOCl, 2 %).

Interpretacijom podataka o zastupljenosti pojedinih taksona u svim uzorcima lisnog tkiva sa simptomom A i neovisno o površinskoj sterilizaciji, nameće se zaključak kako je vrsta *Epicoccum nigrum* bila mogući uzročnik nekrotičnih lezija opisanih pod simptomom A. S druge strane, rod *Cladosporium* predstavljao je najzastupljeniji takson u svim kategorijama uzoraka tkiva koji su pokazivali simptom B, neovisno o površinskoj sterilizaciji.

Poput vrsta roda *Epicoccum*, pripadnici roda *Cladosporium* su široko rasprostranjene plijesni koje su sposobne prijeći sa endofitskoga u parazitski način života te izazvati veće ili manje štete na domaćinu. Složenost odnosa gljivičnih endofita, patogenih vrsta, domaćina i abiotičkih čimbenika otežava donošenje jednoznačnog zaključka o utjecaju endofitskih gljiva na pojavu folijarnih simptoma. Usto, dostupna literatura ne pruža detaljnije opise izgleda nekrotičnih lezija konkretno na lišću *Prunus avium* koje su nastale kao posljedica napada *Epicoccum nigrum* ili *Cladosporium* spp. Opseg ovoga rada ne omogućuje dokazivanje izoliranih vrsta kao uzročnika primijećenih simptoma na terenu, no dobiveni rezultati potvrđuju spoznaje iz prethodnih studija koje ukazuju na veliku raznolikost mikrobioma lišća divlje trešnje.

Vrste roda *Epicoccum* i *Cladosporium*, uz druge izolirane gljive poput *Aureobasidium pullulans*, djeluju antagonistički na *Botrytis cinerea*. S obzirom da pojava i razvoj gljivične bolesti ne ovisi samo o prisutnosti patogena, već i o brojnosti antagonističkih vrsta, struktura zajednice gljivičnih endofita može služiti kao indikator zdravstvenog stanja biljke domaćina.

Unatoč tomu što su klonovi *Prunus avium* u KSP Kutina procijenjeni vizualno zdravima, prelazak endofitskih gljiva u parazitski način života upućuje na fiziološko slabljenje promatranih stabala. Stoga je, uz redovitu primjenu mjera zaštite od poznatih agresivnih patogena poput *B. cinerea*, potrebno pratiti stanje krošnje te primjenom agrotehničkih mjera ublažiti štetno djelovanje abiotičkih čimbenika. Ponovnim uspostavljanjem ravnoteže između djelovanja gljivičnih endofita i domaćina, povećat će se vitalitet i otpornost stabala na napad različitih štetnih organizama.

7. LITERATURA

1. Abdollahi Aghdam S., K. B. Fotouhifar (2016) New reports of endophytic fungi associated with cherry (*Prunus avium*) and sour chery (*Prunus cerasus*) trees in Iran, *Mycol Iranica* 3: 75-85. doi:10.22043/MI.2017.112557
2. Abdollahi Aghdam S., K. B. Fotouhifar (2017) Introduction of some endophytic fungi of sour cherry trees (*Prunus cerasus*) in Iran, *Rostaniha* 18: 77-94. doi:10.22059/ijpps.2017.205127.1006711
3. Adaskaveg, J. E., H. Förster, D. Thompson (2000) Identification and etiology of visible quiescent infections of *Monilinia fructicola* and *Botrytis cinerea* in sweet cherry fruit, *Plant Dis* 84 (3): 328-333. doi:10.1094/PDIS.2000.84.3.328
4. Agarwal, A., G. K. Garg, S. Devi, D. P. Mishra, U. S. Singh (1997) Ultrastructural changes in *Brassica* leaves caused by *Alternaria brassicae* and destruxin B, *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 6 (1): 25-28. doi:10.1007/BF03263004
5. Akulov, A., M. Stadler (2008) Critical revision of data about *Daldinia* species in Ukraine. In: Proceedings of 2nd congress of Russian mycologists “Modern mycology in Russia”, Moscow, *National Academy of Sciences* Vol. 2: 47.
6. Al-Sadi, A. M., F. A. Al-Oweisi, S. G. Edwards, H. Al-Nadabi, A. M. Al-Fahdi (2015) Genetic analysis reveals diversity and genetic relationship among *Trichoderma* isolates from potting media, cultivated soil and uncultivated soil, *BMC microbiology* 15: 147. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0483-8>.
7. Altschul, S. F., W. Gish., W. Miller, E. W. Myers, D. J. Lipman (1990) Basic local alignment search tool, *Journal of Molecular Biology* 215 (3): 403-410. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2
8. Anderson, R. L. (1986) New method for assessing contamination of slash and loblolly pine seeds by *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*, *Plant Disease* 70: 452–453. doi:10.1094/PD-70-452
9. Anilkumar, T. B., V. S. Seshadri (1975) *Cladosporium* leaf spot of sunflower, *Curr. Sci.* 44: 722.
10. Anonymous (2005) Major food and agricultural commodities and producers by country. Available at: <https://www.fao.org/es/ess/top/commodity.html?lang=en&item=536&year=2005>. Accessed 16 September 2011.

11. Arenal, F., G. Platas, J. Martín, O. Salazar, F. Peláez (1999) Evaluation of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for assessing the genetic variability of isolated of the fungus *Epicoccum nigrum*, *Journal of Applied Microbiology* 87 (6): 898-906. doi:10.1046/j.1365-2672.1999.00946.x
12. Arenal, F., G. Platas, J. Martín, F. J. Asensio, O. Salazar, J. Collado, F. Vincente, A. Basilio, C. Ruibal, I. Royo, N. De Pedro, F. Peláez (2002) Comparison of genotypic and phenotypic techniques for assessing the variability of the fungus *Epicoccum nigrum*, *Journal of Applied Microbiology* 93: 36-45. Dostupno na: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1046/j.1365-2672.2002.01654.x>. Pristupljeno: 4.7.2021.
13. Arnold, A. E., L. C. Mejía, D. Kyllö, E. I. Rojas, Z. Maynard, N. Robbins, E. A. Herre (2003) Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree, *PNAS* 100 (26): 15649-15654. <https://doi.org/10.1073/pnas.2533483100>
14. Arnold, A. E. (2007) Understanding the diversity of foliar endophytic fungi, progress, challenges and frontiers, *Fungal biology reviews* 21: 51–66. doi:10.1016/j.fbr.2007.05.003
15. Ayoubi, N., M. J. Soleimani, R. Zare (2017) *Cladosporium* species, a new challenge in strawberry production in Iran, *Phytopathologia Mediterranea* 56(3): 486-493. doi: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-20151.
16. Baiswar, P., S. Chandra, T. K. Bag, R. K. Patel, S. V. Ngachan, B. C. Deka (2011) *Cladosporium oxysporum* on *Prunus nepalensis* in India, *Australasian Plant. Dis. Notes* 6: 3-6. doi:10.1007/s13314-011-0002-1
17. Bakys, R., R. Vasaitis, P. Barklund, K. Ihrmark, J. Stenlid (2009a) Investigations concerning the role of *Chalara fraxinea* in declining *Fraxinus excelsior*, *Plant Pathology* 58 (2): 284-292. doi:10.1111/j.1365-3059.2008.01977.x
18. Bakys, R., R. Vasaitis, P. Barklund, I. M. Thomsen, J. Stenlid (2009b) Occurrence and pathogenicity of fungi in necrotic and non-symptomatic shoots of declining common ash (*Fraxinus excelsior*) in Sweden, *European Journal of Forest Research* 128 (1): 51-60. doi:10.1007/s10342-008-0238-2
19. Bakys, R., A. Vasilias, K. Ihrmark, J. Stenlid, A. Menkis, R. Vasaitis (2011) Root rot, associated fungi and their impact on health condition of declining *Fraxinus excelsior* stands in Lithuania, *Scandinavian Journal of Forest Research* 26 (2): 128-135. doi:10.1080/02827581.2010.536569

20. Bakys, R. (2013) Dieback of *Fraxinus excelsior* in the Baltic Sea Region, Doctoral Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, 1-48.
21. Bensch, K., U. Braun, J. Z. Groenewald, P. W. Crous (2012) The genus *Cladosporium*, *Studies in Mycology* 72: 1-401. doi: 10.3114/sim0003.
22. Bernardi-Wenzel, J., A. García, C. J. R. Filho, A. J. Prioli, J. A. Pamphile (2010) Evaluation of foliar fungal endophyte diversity and colonization of medicinal plant *Luehea divaricata* (Martius et Zuccarini), *Biol. Res.* 43: 375–384. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-97602010000400001>
23. Bernadovičová S., H. Ivanová (2011): Hypomycetes and Coleomycetes fungi isolated from affected leaves and twigs of cherry laurel trees, *Folia Oecologica* 38 (2): 137-145.
24. Berner, D. K., E. L. Smallwood, M. B. McMahon, D. G. Luster, J. Kashefi (2007) First report of leaf spot caused by *Cladosporium herbarum* on *Centaurea solstitialis* in Greece, *Plant Disease* 91(4): 463. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-91-4-0463-A>
25. Bien, S., U. Damm (2020a) *Prunus* trees in Germany-a hideout of unknown fungi?, *Mycological Progress* 19 (7): 667– 690. doi:10.1007/s11557-020-01586-4
26. Bien S., U. Damm (2020b) *Arboricolonus simplex* gen. et sp. nov. and novelties in *Cadophora*, *Minutiella* and *Proliferodiscus* from *Prunus* wood in Germany, *MycoKeys* 63: 119-161. doi:10.3897/mycokeys.63.46836
27. Bitancourt, A. A. (1935) Uma nova doença do maracujá, *O Biológico* 1: 202-204.
28. Bitsadze, N., M. Beruashvili, K. Pavliashvili, R. Khazaradze, A. Jorjadze, G. Tchabashvili, S. Shanidze, N. Kobakhidze (2018) Main oak species and fungi associated with oak trees described in Georgian mycological herbarium, *Annals of Agrarian Science* 16 (4): 432-435. doi:10.1016/j.aasci.2018.06.004
29. Boddy, L. G. S. Griffith (1989) Role of endophytes and latent invasion in the development of decay communities in sapwood of angiospermous trees, *Sydowia* 41: 41-73. Dostupno na: https://www.zobodat.at/pdf/Sydowia_41_0041-0073.pdf (Pristupljeno 5.7.2021.)
30. Braun, U., P. W. Crous, F. M. Dugan, J. Z. Groenewald, G. S. de Hoog (2003) Phylogeny and taxonomy of cladosporium-like hyphomycetes, including *Davidiella* gen. nov., the teleomorph of *Cladosporium* s.str., *Mycological Progress* 2(1): 3–18. <http://dx.doi.org/10.1007/s11557-006-0039-2>
31. Brown A., E., R. Finlay, J. S. Ward (1987) Antifungal compounds produced by *Epicoccum purpurascens* against soil-borne plant pathogenic fungi, *Soil Biology and Biochemistry* 19(6): 657-664. doi: 10.1016/0038-0717(87)90044-7.

32. Brown, K. B., K. D. Hyde, D. I. Guest (1998) Preliminary studies on endophytic fungal communities of *Musa acuminata* species complex in Hong Kong and Australia, *Fungal Diversity* 1: 27–51. Dostupno na: https://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/FD_1_27-51.pdf (Pristupljeno 5.7.2021.)
33. Bruton, B. D., S. C. Redlin, J. K. Collins, C. E. Sams (1993) Postharvest Decay of Cantaloupe Caused by *Epicoccum nigrum*, *Plant Disease* 77(10): 1060-1062. doi:10.1094/PD-77-1060
34. De Cal, A., I. Larena, M. Liñán, R. Torres, N. Lamarca, J. Usall, P. Domenichini, A. Bellini, X. O. de Eribe, P. Melgarejo (2009) Population dynamics of *Epicoccum nigrum*, a biocontrol agent against brown rot in stone fruit, *Journal of Applied Microbiology* 106(2): 592-605. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.04030.x
35. Carey, F. (2012) *The Tree. Meaning and Myth*, The British Museum Press, p. 153.
36. Carbone, I., L. M. Kohn (1999) A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes, *Mycologia* 91: 553–556. <https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061051>
37. Carroll, G. (1988) Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont, *Ecology* 69: 2-9. doi:10.2307/1943154
38. Chen, Q., L. W. Hou, W. J. Duan, P. W. Crous, L. Cal (2017) *Didymellaceae* revisited, *Studies in Mycology* 87: 105–159. doi:10.1016/j.simyco.2017.06.002
39. Chen, Y. J., Y. H. Wan, L. J. Zou, H. R. Tong (2020) First Report of Leaf Spot Disease Caused by *Epicoccum layuense* on *Camellia sinensis* in Chongqing, China, *APS Publications*, unpaginated. Dostupno na: <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-19-1906-PDN>
40. Clay, K., C. Schardl (2002) Evolutionary Origins and Ecological Consequences of Endophyte Symbiosis with Grasses, *Am. Nat.* 160: 99-127. doi:10.1086/342161
41. Coghlan, D. R., J. A. Mackintosh, P. Karuso (2005) Mechanism of reversible fluorescent staining of protein with epicocconone, *Org Lett.* 7(12): 2401-2404. doi:10.1021/ol050665b
42. Crous, P. W., J. Z. Groenewald (2016) They seldom occur alone, *Fungal Biology* 120 (11): 1392-1415. doi:10.1016/j.funbio.2016.05.009
43. Crous, P. W., J. Z. Groenewald (2017) The Genera of Fungi – G 4: *Camarosporium* and *Dothiora*, *IMA Fungus* 8(1): 131-152. doi:10.5598/imafungus.2017.08.01.10
44. Cvjetković, B. (2010) *Mikoze i pseudomikoze voćaka i vinove loze*, Zrinski d.d. Čakovec 186-187: 204-205.

45. Dai, C. C., B. Y. Yu, X. Li (2008) Screening of endophytic fungi that promote the growth of *Euphorbia pekinensis*, *Afr. J. Biotechnol.* 7 (19): 3505-3509. Dostupno na: <http://www.academicjournals.org/AJB> (Pristupljeno 5.7.2021.)
46. Despoulain, B., F. Seigle-Murandi, R. Steiman, L. De Giorgis (1990) Fungal flora of corn White draft, *Cryptogam. Mycol.* 11: 79-88.
47. Diaz, R., E. Merlo (2008) Genetic Variation in Reproductive Traits in a Clonal Seed Orchard of *Prunus avium* in Northern Spain, *Silvae Genet* 57(3): 110-118. doi:10.1515/sg-2008-0017
48. Damm U., P. W. Crous, P. H. Fourie (2007a) *Bothryosphaeriaceae* as potential pathogens of *Prunus* species in South Africa, with descriptions of *Diplodia africana* and *Lasiodiplodia plurivora* sp. nov., *Mycologia* 99 (5): 664-680. doi:10.3852/mycologia.99.5.664
49. Damm U., P. H. Fourie, P. W. Crous (2007b) *Aplosporella prunicola*, a novel species of anamorphic *Botryosphaeriaceae*, *Fungal Diversity* 27 (1): 35-43. Dostupno na: https://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/27_3.pdf (Pristupljeno 5.7.2021.)
50. Damm U., P. W. Crous, P. H. Fourie (2008a) A fissitunicate ascus mechanism in the *Calosphaeriaceae*, and novel species of *Jattaea* and *Calosphaeria* on *Prunus* wood, *Persoonia* 20: 39-52. doi:10.3767/003158508X313940
51. Damm U., L. Mostert L., P. W. Crous, P. H. Fourie (2008b) Novel *Phaeoacremonium* species associated with necrotic wood of *Pinus* trees, *Persoonia* 20: 87-102. doi: 10.3767/003158508X324227
52. Damm U., G. M. Verkley, P. W. Crous, P. H. Fourie, A. Haegi, L. Riccioni (2008c): Novel *Paraconiothyrium* species on stone fruit trees and other woody hosts. *Persoonia* 20: 9-17. doi:10.3767/003158508X286842
53. Damm U., P. H. Fourie, P. W. Crous (2010) *Coniochaeta* (*Lecythophora*), *Collophora* gen. nov. and *Phaeomoniella* species associated with wood necroses of *Prunus* trees, *Persoonia* 24: 60-80. doi: 10.3767/003158510X500705
54. Daniels, H. A. (2017) Phylogenetic identification of pathogenic and endophytic fungal populations in west coast Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) foliage, Master thesis, Oregon State University, USA.
55. Domsch, K. H., W. Gams, T. H. Anderson (1980) *Compendium of soil fungi*, Vols. 1. & 2., Acad. Press, London.
56. Domsch, K. H., W. Gams, T. H. Anderson (1993) *Compendium of soil fungi*, Vol 1. Eching, IHW-Verlag.

57. Dugan, F. M., K. Schubert, U. Braun (2004) Check-list of *Cladosporium* names, *Schlechtendalia* 11: 1-103. Dostupno na: <https://www.researchgate.net/publication/269397010> (Pristupljeno 5.7.2021.)
58. Elad, Y., B. Williamson, P. Tudzynski, N. Delen (2007) *Botrytis* spp. and diseases they cause in agricultural systems, In: Elad, Y., B. Williamson, P. Tudzynski, N. Delen (eds.) *Botrytis: Biology, pathology and control*, Kluwer, Dordrecht, 1–24.
59. Ellis, M. B. (1971) *Dematiaceous hyphomycetes*, Kew, Commonwealth Mycological Institute, 608.
60. Ellis, M.B. (1976) *More dematiaceous hyphomycetes*, CMI, Kew.
61. El-Morsy, E. M. (2000) Fungi isolated from the endorhizosphere of halophytic plants from the Red Sea Coast of Egypt, *Fungal Diversity* 5: 43–54. Dostupno na: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.562.950&rep=rep1&type=pdf> (Pristupljeno 5.7.2021.)
62. Falconi, C. J., K. Mendgen (1994) Epiphytic fungi on apple leaves and their value for control of the postharvest pathogens *Botrytis cinerea*, *Monilinia fructigena* and *Penicillium expansum*, *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 101 (1): 38-47.
63. Farr, D. F., G. F. Bills, G. P. Chamuris, A. Y. Rossman (1989) *Fungi on plants and plant products in the United States*, APS Press, St. Paul, MN.
64. Farr, D. F., A. Y. Rossman (2010) Fungal Databases, Systemic Botany & Mycology Laboratory, USDA: ARS. Available at <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases>
65. Fatima, N., T. Ismail, S. A. Muhammad, M. Jadoon, S. Ahmed, S. Azhar, A. Mumtaz (2016) *Epiccocum* sp., an emerging source of unique bioactive metabolites, *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research* 73(1): 13-21.
66. Flannigan, B. (2001) Microorganisms in indoor air. In: *Microorganisms in Home and Indoor Work Environments: Diversity, Health Impacts, Investigation and Control* (Flannigan, B., R. A. Samson, J. D. Miller, eds), Taylor & Francis, London, 17–31.
67. Franjić, J., Ž. Škvorc (2010). *Šumsko drveće i grmlje Hrvatske*, Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
68. Freeman S., J. R. Rodriguez (1993) Genetic conversion of a fungal plant pathogen to a nonpathogenic, endophytic mutualist, *Science* 260: 75-78. doi:10.1126/science.260.5104.75

69. Ganley, R. J., R. A. Snieszko, G. Newcombe (2008) Endophyte-mediated resistance against white pine blister rust in *Pinus monticola*, *For. Ecol. Manage.* 255: 2751-2760. doi:10.1016/J.FORECO.2008.01.052
70. Gao, F., C. Dai, X. Liu (2010) Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens, *African Journal of Microbiology Research* 4 (13): 1346-1351. Available online at: <http://www.academicjournals.org/ajmr>
71. Gardes, M. T. D. Bruns (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts, *Mol. Ecol.* 2 (2): 113-118. doi: 10.1111/j.1365-294x.1993.tb00005.x
72. Giménez Mariño, C., R. Cabrera, M. Reina, A. González-Coloma (2007) Fungal endophytes and their role in plant protection, *Curr. Org. Chem.* 11: 707-720. doi:10.2174/138527207780598765
73. Glavaš, M. (1999) *Gljivične bolesti šumskoga drveća*, Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
74. Göre, M. E, C. Bucak (2007) Geographical and seasonal influences on the distribution of fungal endophytes in *Laurus nobilis*, *Forest Pathology* 37: 281 – 288. doi:10.1111/j.1439-0329.2007.00509.x
75. Grabowski, M. (2007) The study of new fungus species causing apple sooty blotch, *Folia Horticul.* 19(2): 89–97.
76. Gramaje, D., C. Agustí-Brisach, A. Pérez-Sierra, E. Moralejo, D. Olmo, L. Mostert, U. Damm, J. Armengol (2012): Fungal trunk pathogens associated with wood decay of almond trees on Mallorca (Spain), *Persoonia* 28: 1-13. doi:10.3767/003158512X626155
77. Griбановски-Sassu, O., F. H. Foppen (1967) The carotenoids of the fungus *Epicoccum nigrum* Link, *Phytochemistry* 6(6): 907-909. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)86041-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)86041-0)
78. de Gruyter J., J. H. C. Woudenberg, M. M. Aveskamp, G. J. M. Verkley, J. Z. Groenewald, P. W. Crous (2013): Redisposition of Phoma-like anamorphs in *Pleosporales*, *Stud Mycol* 75: 1-36. doi: 10.3114/sim0004
79. Haddadadrafshi N., K. Halász, T. Pósa, G. Péter, K. Hrotkó, L. Gáspár, N. Lukács (2011): Diversity of endophytic fungi isolated from cherry (*Prunus avium*), *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology* 15 (2): 1-6.
80. Hawksworth, D. L., P. M. Kirk, B. C. Sutton, D. N. Pegler (1995) *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*, 8th ed, Wallingford: CAB International.

81. Hall, T. A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
82. Heald, F. D. (1933) *Manual of Plant Diseases*, McGraw-Hill, New York.
83. Hecht, D., V. Zinkernagel (2006) Epidemiological studies of cherry leaf scorch (*Gnomonia erythrostoma* (Pers.) Auerswald), *Journal of Plant Diseases and Protection* 113 (2): 68-73. doi:10.1007/BF03356159
84. Heuchert, B., U. Braun, K. Schubert (2005) Morphotaxonomic revision of fungicolous *Cladosporium* species (hyphomycetes), *Schlechtendalia* 13: 1–78. Available at: https://www.zobodat.at/pdf/Schlechtendalia_13_0001-0078.pdf
85. Hinds, T. E., T. H. Laurent (1978) Common aspen diseases found in Alaska, *Plant Dis Rep* 62: 972–975.
86. Hinds, T. E. (1981) *Cryptosphaeria* canker and *Libertella* decay of aspen, *Phytopathology* 71: 1137–1145. doi:10.1094/Phyto-71-1137
87. Hirsh G.U., U. Braun (1992) Communities of parasitic micro-fungi. In: *Handbook of Vegetation Science: Fungi in vegetation science*, Vol. 19. (ed. W. Winterhoff). Kluwer Academic, Dordrecht, Netherlands, 225–250.
88. Hoffman, M. T., A. E. Arnold (2008) Geographic locality and host identity shape fungal endophyte communities in cupressaceous trees, *Mycological Research* 112: 331-344. doi:10.1016/j.mycres.2007.10.014
89. Holb, I. J. (2008) Brown rot blossom blight of pome and stone fruits: symptom, disease cycle, host resistance, and biological control, *Int J Hort Sci* 14: 15–21. <https://doi.org/10.31421/IJHS/14/3/796>
90. Hórtová B., D. Novotný (2011) Endophytic fungi in branches of sour cherry trees: a preliminary study, *Czech Mycol* 63: 77-82. Dostupno na: http://www.czechmycology.org/_cm/CM63107.pdf (Pristupljeno 5.7.2021.)
91. Humar, M., V. Vek, B. Bučar (2008) Properties of blue-stained wood, *Drvna industrija* 59 (2): 75-79.
92. Hyde, K. D., K. Soyong (2008) The fungal endophyte dilemma, *Fungal Diversity* 33: 163–173.
93. Idžojić, M. (2013a) *Listopadno drveće i grmlje u zimskom razdoblju*, Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
94. Idžojić, M. (2013b) *Dendrologija. List*, Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
95. Idžojić, M. (2013c) *Dendrologija. Cvijet, češer, plod, sjeme*, Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

96. Inacio, J., P. Pereira, M. de Cavalho, A. Fonseca, M. T. Amaral-Collaco, I. Spencer-Martins (2002) Estimation and diversity of phylloplane mycobiota on selected plants on a Mediterranean-type ecosystem in Portugal, *Microbial Ecology* 44(4): 344–353.
97. Islam, M., F. Hasin (2000) Studies on phylloplane mycoflora of *Amaranthus viridis* L., *National Academy Science Letters*, India 23(9–10): 121–123.
98. Ivanová, H., L. Hrehová, P. Pristaš (2016) First Confirmed Report on *Fusarium sporotrichioides* on *Pinus ponderosa* var. *jeffreyi* in Slovakia, *Plant Protect. Sci.* 52: 250-253. doi:10.17221/66/2016-PPS
99. Ivanová, H., M. Kaločaiová, M. Bolvanský (2012) Shot-hole disease on *Prunus persica* – the morphology and biology of *Stigmina carpophila*, *Folia Oecologica* 39 (1): 21-27.
100. Jarvis W. R. (1977) *Botryotinia and Botrytis species: Taxonomy, Physiology and Pathogenicity. A guide to the Literature*, Ottawa, Canada, Department of Agriculture, Monograph No. 15.
101. de Jager, E. S., F. C. Wehner, L. Korsten (2001) Microbial ecology of the mango phylloplane, *Microbial Ecology* 42(2): 201–207. doi:10.1007/s002480000106
102. Kajba D., J. Gračan, M. Ivanković, S. Bogdan, M. Gradečki-Poštenjak, T. Littvaj, I. Katičić (2006) Očuvanje genofonda šumskih vrsta drveća u Hrvatskoj, *Glas. šum. pokuse*, pos. izd. 5: 235 – 249.
103. Kajba, D., I. Katičić, I. Šumanovac, M. Žgela (2010) Važnost klonskih sjemenskih plantaža u sjemenarstvu i očuvanju genofonda šumskih vrsta drveća u Hrvatskoj, *Rad. Hrvat. šumar. inst.* 44(1): 37-52.
104. Karadžić, D., T. Milijašević (2008) The most important parasitic and saprophytic fungi in Austrian pine and scots pine plantations in Serbia, *Bulletin of the Faculty of Forestry* 97: 147-170. <https://doi.org/10.2298/GSF0897147K>
105. Katičić Bogdan, I., K. Švorinić, S. Bogdan, D. Kajba (2015) Generativna i vegetativna aktivnost divlje trešnje (*Prunus avium* L.) u klonskoj sjemenskoj plantaži, *Šumarski list* 7-8: 339-349.
106. Keitt, G. W., E. C. Blodgett, E. E. Wilson, R. O. Magie (1937) The epidemiology and control of cherry leafspot, *Wisc. Agric. Exp. Stn. Res. Bull.* 132: 117.
107. Kidd, S., C. Halliday, H. Alexiou, D. Ellis (2016) *Descriptions of medical fungi* 3rd edition, Newstyle Printing, Australia, ISBN: 9780646951294.
108. Kilpatrick, J. A., G. A. Chilvers (1981) Variation in a natural population of *Epicoccum purpurascens*, *Trans. Br. Mycol. Soc.* 77: 497-508. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(81\)80097-6](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(81)80097-6)

109. Kobliha, J. (2002) Wild cherry (*Prunus avium* (L.) L.) breeding program aimed at the use of this tree in the Czech forestry, *J. For. Sci* 48(5): 202–218.
110. Kogel, K. H., P. Franken, R. Hückelhoven (2006) Endophyte or parasite-what decides? *Curr. Opin. Plant Biol.* 9: 358-363. doi:10.1016/j.pbi.2006.05.001.
111. Kwon, J. H., S. W. Kang, J. S. Kim, C. S. Park (2001) Scab of Tea (*Thea sinensis*) Caused by *Cladosporium herbarum* in Korea, *Plant Pathol J.* 17: 350-353. Dostupno na: <https://www.ppjonline.org/upload/pdf/PPJ017-06-07.pdf> (Pristupljeno 5.7.2021.)
112. Larena, I., A. De Cal, P. Melgarejo (2004) Solid substrate production of *Epicoccum nigrum* conidia for biological control of brown rot on stone fruits, *International Journal of Food Microbiology* 94: 161–167. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.01.007>
113. Larena, I., R. Torres, M. A. De Cal, M. Liñán, P. Melgarejo, P. Domenichini, A. Bellini, J. F. Mandarin, J. Lichou, X. O. de Eribe, J. Usall (2005) Biological control of postharvest brown rot (*Monilinia* spp.) of peaches by field applications of *Epicoccum nigrum*, *Biological Control* 32: 305-310. doi:10.1016/j.biocontrol.2004.10.010
114. Leslie, J. F., B. A. Summerell (2006) *The Fusarium. Laboratory Manual*, Blackwell Professional, Ames, Iowa. ISBN: 978-0-813-81919-8
115. Levetin, E., K. Dorsey (2006) Contribution to leaf surface fungi to the air spora, *Aerobiologia* 22(1): 3–12. doi:10.1007/s10453-005-9012-9
116. Lewis, G. C. (2004) Effects of biotic and abiotic stress on the growth of three genotypes of *Lolium perenne* with and without infection by the fungal endophyte *Neotyphodium lolii*, *Ann. Appl. Biol.* 144: 53-63. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2004.tb00316.x>
117. Li G. J., K. D. Hyde, R. L. Zhao, S. Hongsanan, F. A. Abdel-Aziz i sur. (2016) Fungal diversity notes 253-366: taxonomic and phylogenetic contributions to fungal taxa, *Fungal Divers* 78: 1-237. <http://doi.org/10.1007/s13225-016-0366-9>
118. de Lima Fávaro, L. C., F. L. de Melo, C. I. Aguilar-Vildoso, W. L. Araújo (2011) Polyphasic Analysis of Intraspecific Diversity in *Epicoccum nigrum* Warrants Reclassification into Separate Species, *PLoS ONE* 6(8):e14828. doi: 10.1371/journal.pone.0014828.
119. Luginbühl, M., E. Müller (1981) Endophytische Pilze in oberirdischen Organen von 4 gemeinsam an gleichen Standorten wachsenden Pflanzen (*Buxus*, *Hedera*, *Ilex*, *Ruscus*), *Sydowia* 33: 185-209.

120. Malinowski, D. P., H. Zuo, D. P. Belesky, G. A. Alloush (2004) Evidence for copper binding by extracellular root exudates of tall fescue but not perennial ryegrass infected with *Neotyphodium* spp. endophytes, *Plant Soil* 267: 1-12. doi:10.1007/s11104-005-2575-y
121. Mallea, M., D. Pesando, P. Bernard, B. Khoualene (1991) Comparison between antifungal and antibacterial activities of several strains of *Epicoccum purpurascens* from the Mediterranean area, *Mycopathologia* 115: 83–88. doi:10.1007/BF00436796
122. Mari, M., R. Torres, L. Casalini, N. Lamarca, J. F. Mandarin, J. Lichou, I. Larena, M. A. De Cal, P. Melgarejo, J. Usall (2007) Control of post-harvest brown rot on nectarine by *Epicoccum nigrum* and physico-chemical treatments, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87: 1271.
123. McGinnis, M. R. (1980) *Laboratory handbook of medical mycology*, Academic Press.
124. Mejía, L. C., E. I. Rojas, Z. Maynard, S. V. Bael, E. A. Arnold, P. Hebbbar, G. J. Samuels, N. Robbins, E. A. Herre (2008) Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens, *Biol. Control* 46: 4-14. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.01.012>
125. Mims, C. W., E. A. Richardson (2005) Ultrastructure of sporodochium and conidium development in the anamorphic fungus *Epicoccum nigrum*, *Canadian Journal of Botany* 83(10): 1354-1363. doi: 10.1139/b05-137.
126. Moslemi, A., P. K. Ades, T. Groom, M. E. Nicolas, P. W. J. Taylor (2017) *Alternaria infectoria* and *Stemphylium herbarum*, two new pathogens of pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium*) in Australia, *Australasian Plant Pathology* 46(1): 91-101. doi:10.1007/s13313-016-0463-y
127. Moyo P., U. Damm, L. Mostert, F. Haleen (2018) *Eutypa*, *Eutypella* and *Cryptovalsa* species (*Diatrypaceae*) associated with *Prunus* species in South Africa, *Plant Dis* 102 (7): 1402-1409. doi:10.1094/PDIS-11-17-1696-RE
128. Mullins, J. (2001) Microorganisms in outdoor air. In: *Microorganisms in Home and Indoor Work Environments: Diversity, Health Impacts, Investigation and Control* (Flannigan, B., R. A. Samson, J. Miller, eds), Taylor & Francis, London. pp. 3–16.
129. Nelson, S. (2008) Sooty mold, *Plant Dis.* 52. Available at: www.stahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/PD-52.pdf

130. Norris, J. E., A. Di Iorio, A. Stokes, B. C. Nicoll, A. Achim (2008) *Slope Stability and Erosion Control: Ecotechnological Solutions*, Norris, J. E. (eds.), Springer Netherlands, 167–210.
131. O'Donnell, J., C. H. Dickinson (1980) Pathogenicity of *Alternaria* and *Cladosporium* isolates on *Phaseolus*, *Trans. Br. Mycol. Soc.* 74: 335-342.
132. Oliveira, R. R., R. L. Aguiar, D. J. Tessmann, W. M. C. Nunes (2014) First Report of Leaf Spot Caused by *Cladosporium perangustum* on *Syagrus oleracea* in Brazil, *APS Journals* 98(2): 280. doi:10.1094/PDIS-06-13-0595-PDN
133. Ogórek, R., A. Lejman, W. Pusz, A. Miłuch, P. Miodyńska (2012) Characteristics and taxonomy of *Cladosporium* fungi, *Mikologia Lekarska* 19(2): 80-85.
134. Özer, G., H. Bayraktar (2014) First report of *Botrytis cinerea* on Cornelian cherry, *Australasian Plant Dis. Notes* 9 (1): 126-128. doi:10.1007/s13314-014-0126-1
135. Pan, J. J., G. May (2009) Fungal–fungal associations affect the assembly of endophyte communities in maize (*Zea mays*), *Microb. Ecol.* 58 (3): 668–678. doi:10.1007/s00248-009-9543-7
136. Paul, N. C., H. B. Lee (2014) First Record of Endophytic *Paraconiothyrium brasiliense* Isolated from Chinese Maple Leaves in Korea, *Korean Journal of Medical Mycology* 42(2): 349-352. doi: 10.4489/KJM.2014.42.4.349
137. Peng, G., J. C. Sutton (1991) Evaluation of microorganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry, *Canadian Journal of Plant Pathology* 13 (3): 247–257. <https://doi.org/10.1080/07060669109500938>
138. Petrović, T., L. Bičak, K. Palčić-Jakopović, Ž. Herner, V. Novaković, M. Ševar, G. Kerežija, Ž. Budinščak, Z. Čmelik, A. Stanisavljević (2012) Tehnološke upute za integriranu proizvodnju voća za 2012 godinu, pp. 37-40., *Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja*.
139. Pimenta, R. S., J. F. M. Da Silva, J. S. Buyer, W. J. Janisiewicz (2012) Endophytic fungi from plums (*Prunus domestica*) and their antifungal activity against *Monilinia fructicola*, *Journal of Food Production* 75 (10): 1883–1889. doi:10.4315/0362-028X.JFP-12-156
140. Pleše, N., N. Juretić (1968) Istraživanja o virusima prstenaste pjegavosti, *Acta Botanica Croatica* XXVIII: 299-315.

141. Rashmi, M., J. S. Kushveer, V. V. Sarma (2019) A worldwide list of endophytic fungi with notes on ecology and diversity, *Mycosphere* 10(1): 798–1079. Available at: https://www.mycosphere.org/pdf/MYCOSPHERE_10_1_19.pdf
142. Riccioni, L., M. Manning, M. Valvassori, A. Haegi, S. Cassanato, R. Spinelli (2007) A new disease: leader die-back in *Actinidia chinensis* Hort16A in Italy, *Acta Horticulturae* 753: 669-976.
143. Riesen, T., T. Sieber (1985) *Endophytic fungi in winter wheat (Triticum aestivum L.)*, Swiss Federal Institute of Technology, Zürich.
144. Russell, K. (2003) EUFORGEN Technical Guidelines for genetic conservation and use for wild cherry (*Prunus avium*), *Biodiversity International*.
145. Saikkonen K, S. H. Faeth, M. Helander, T. J. Sullivan (1998) Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants, *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 29: 319-343. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.29.1.319>
146. Samson, R. A., E. S. Hoekstra, J. C. Frisvad, O. Filtenborg (1995) *Introduction to foodborne fungi*, Centraalbureau voor Schimmelcultures, P.O.Box 273, 3740 AG BAARN, The Netherlands.
147. Schoch, C. L., K. A. Seifert, S. Huhndorf, V. Robert, J. L. Spouge, C. A. Levesque, W. Chen, Fungal Barcoding Consortium (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (16): 6241-6246. doi:10.1073/pnas.1117018109
148. Schubert, K., J. Z. Groenewald, U. Braun, J. Dijksterhuis, M. S. Starink, C. F. Hill, P. Zalar, G. S. de Hoog, P. W. Crous, P.W. (2007) Biodiversity in the *Cladosporium herbarum* complex (*Davidiellaceae*, *Capnodiales*), with standardisation of methods for *Cladosporium* taxonomy and diagnostics, *Studies in Mycology* 58: 105–156. doi:10.3114/sim.2007.58.05
149. Schulz, B., C. Boyle (2005) The endophytic continuum, *Mycol. Res.* 109: 661-686. doi:10.1017/S095375620500273X
150. Schuster, M., K. R. Tobutt (2004) Screening of cherries for resistance to leaf spot, *Blumeriella jaapii*, *ISHS Acta horticulturae* 663: XI Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics, 1-5.
151. Sjulín, T. M., A. L. Jones, R. L. Andersen (1989) Expression of partial resistance to cherry leaf-spot in cultivars of sweet, sour, duke, and European ground cherry, *Plant Dis.* 73: 56–61. doi:10.1094/PD-73-0056

152. Stadler, M., M. Baumgartner (2001) Three new *Daldinia* species with yellowish stromatal pigments, *Mycotaxon* 80: 179-196.
153. Stadler, M., T. Læssøe, J. Fournier, C. Decock, B. Schmieschek, H.-V. Tichy, D. Peršoh (2014) A polyphasic taxonomy of *Daldinia* (Xylariaceae), *Studies in Mycology* 77: 1-143. doi: 10.3114/sim0016
154. Stohr, S. N., J. Dighton (2004) Effects of species diversity on establishment and coexistence: A phylloplane fungal community model system, *Microbial Ecology* 48(3): 431–438. doi:10.1007/s00248-003-1064-1
155. Strobel, G., B. Daisy (2003) Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67 (4): 491–502. doi:10.1128/MMBR.67.4.491-502.2003
156. Sun G., X. R. Zhai, R. Zhang, M. L. Gleason (2008) First report of *Aureobasidium pullulans* causing sooty blotch on apple fruit in China., *Phytopathology* 98: 156.
157. Sun, X., L. D. Guo (2012) Endophytic fungal diversity, review of traditional and molecular techniques, *Mycology* 3 (1): 1-12. doi:10.1080/21501203.2012.656724
158. Šubić, M. (2016) Mogućnosti i ograničenja suzbijanja štetnih organizama u suvremenim nasadima trešanja prema integriranim načelima, *Glasilo biljne zaštite* 16(4): 365-377.
159. Tanaka, A., B. A. Tapper, A. Popay, E. J. Parker, B. Scott (2005) A symbiosis expressed non-ribosomal peptide synthetase from a mutualistic fungal endophyte of perennial ryegrass confers protection to the symbiotum from insect herbivory, *Mol. Microbiol.* 57 (4): 1036-1050. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04747.x
160. Tančeva Crmarić, O., S. Štambuk, Z. Šatović, D. Kajba (2011) Genotipska raznolikost divlje trešnje (*Prunus avium* L.) u dijelu prirodne rasprostranjenosti u Hrvatskoj, *Šumarski list* br. 11-12, CXXXV: 543 – 555.
161. Tarbath, M. P., P. F. Measham, M. Glen, K. M. Barry (2014) Host factors related to fruit rot of sweet cherry (*Prunus avium* L.) caused by *Botrytis cinerea*, *Australasian Plant Pathology Society Inc.*, 1-11. doi:10.1007/s13313-014-0286-7
162. Tewari, J. P. (1983) Cellular alterations in the blackspot of rapeseed caused by *Alternaria brassicae*, *Phytopathology* 73: 831.
163. Thambugala, K. M., H. A. Ariyawansa, Y.-M. Li, S. Boonmee, S. Hongsanan, Q. Tian, C. Singtripop, D. J. Bhat, E. Camporesi, R. Jayawardena, Z.-Y. Liu, J.-C. Xu,

- E. Chukeatirote, K. D. Hyde (2014) *Dothideales*, *Fungal Diversity* 68: 105-158. doi: 10.1007/s13225-014-0303-8
164. Thomma, B. P. H. J. (2003) *Alternaria* spp.; from general saprophyte to specific parasite, *Molecular Plant Pathology* 4(4): 225-236. doi:10.1046/j.1364-3703.2003.00173.x
 165. Tian, Q., J. K. Liu, K. D. Hyde, D. N. Wanasinghe, S. Boonmee, S. C. Jayasiri, Z. L. Luo, J. E. Taylor, A. J. L. Phillips, D. J. Bhat, W. J. Li, H. A. Ariyawansa, K. M. Thambugala, E. B. G. Jones, P. Chomnunti, A. H. Bahkali, J. C. Xu, E. Camporesi (2015) Phylogenetic relationships and morphological reappraisal of *Melanommataceae* (Pleosporales), *Fungal Diversity* 74: 267–324.
 166. Tibpromma S., K. D. Hyde, R. Jeewon, S. S. Maharachchikumbura, J. K. Liu i sur. (2017) Fungal diversity notes 491-602: taxonomic and phylogenetic contributions to fungal taxa, *Fungal Divers* 83: 1-261. doi:10.1007/s13225-017-0378-0
 167. Tomiczek, C., D. Diminić, T. Cech, B. Hrašovec, H. Krehan, M. Pernek, B. Perny (2007) *Bolesti i štetnici urbanog drveća*, Šumarski institut, Jastrebarsko, Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
 168. Trouillas, F. P., F. Peduto Hand, P. Inderbitzin, W. D. Gubler (2015) The genus *Cryptosphaeria* in the western United States: taxonomy, multilocus phylogeny and a new species, *C. multicontinentalis*, *Mycologia* 107(6): 1304–1313. doi:10.3852/15-115
 169. Vega, F. E., F. Posada, M. C. Aime, M. Pava-Ripoll, F. Infante, S. A. Rehner (2008) Entomopathogenic fungal endophytes, *Biol. Control* 46 (1): 72-82. doi:10.1016/j.biocontrol.2008.01.008
 170. Verkley, G. J. M., M. Da Silva, D. T. Wicklow, P. W. Crous (2004) *Paraconiothyrium*, a new genus to accomodate the mycoparasite *Coniothyrium minitans*, anamorphs of *Paraphaeosphaeria*, and four new species, *Studies in Mycology* 50: 323-335. Available at: <https://edepot.wur.nl/23136>
 171. Verkley, G. J. M., K. Dukik, R. Renfurm, M. Göker, J. B. Stielow (2014) Novel genera and species of coniothyrium-like fungi in *Montagnulaceae* (Ascomycota), *Persoonia* 32: 25-51. <http://dx.doi.org/10.3767/003158514X679191>
 172. Vidaković, M. (1996) Podizanje klonske sjemenske plantaže hrasta lužnjaka. U: Klepac, D. (ur.) *Hrast lužnjak (Quercus robur L.) u Hrvatskoj*, pp. 127-138. HAZU, Centar za znanstveni rad, Vinkovci i Hrvatske šume d. o. o., Vinkovci – Zagreb.

173. Vidaković, M., D. Kajba, S. Bogdan, V. Podnar, J. Bećarević (2000) Estimation of genetic gain in a progeny trial of pedunculate oak (*Quercus robur* L.), *Glas. šum. pokuse* 37: 375–381.
174. Vončina, D., J. Ražov, Z. Sever, D. Ivić, B. Barić (2013) *Apiognomonina erythrostoma*, *Scolytus rugulosus* i ekstremni klimatski uvjeti – uzročnici propadanja stabala trešnje i višnje u Dalmaciji, *Glasilo biljne zaštite* 13(5): 405-412.
175. De Vries, G. A. (1952) *Contribution to the knowledge of the genus Cladosporium Link ex. Fr.*, Hollandia Press, Baarn. pp. 121.
176. Vukelić, J (2012) *Šumska vegetacija Hrvatske*, Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Državni zavod za zaštitu prirode.
177. Zheng, C., Z. H. Liu, S. S. Tang, D. Lu, X. Y. Huang (2014) First report of leaf spot caused by *Cladosporium oxysporum* on greenhouse eggplant in China, *Plant Dis.* 98(4): 566. doi:10.1094/PDIS-06-13-0606-PDN
178. Walker, C., M. F. B. Muniz, J. M. Rolim, R. R. O. Martins, V. C. Rosenthal, C. G. Maciel, R. Mezzomo, L. R. S. Reiniger (2016) Morphological and molecular characterization of *Cladosporium cladosporoides* species complex causing pecan tree leaf spot, *Genet. Mol. Res.* 15(3): gmr.15038714, 1-11. doi:http://dx.doi.org/10.4238/gmr.15038714
179. Welk, E., D. de Rigo, G. Caudullo (2016) *Prunus avium* in Europe: distribution, habitat, usage and threats, U: San-Miguel-Ayanz, J., de Rigo, D., Caudullo, G., Houston Durrant, T., Mauri, A. (eds.) *European Atlas of Forest Tree Species*, pp. 140-141., Publ. Off. EU, Luxembourg.
180. Whalley, A. J. S. (1996) The xylariaceous way of life, *Mycol. Res.* 100: 897-922.
181. Wharton, P. S., A. Iezzoni, A. L. Jones (2003) Screening cherry germ plasm for resistance to leaf spot, *Plant Dis.* 87 (5): 471–477. doi:10.1094/PDIS.2003.87.5.471
182. White, T. J., T. Bruns, S. Lee, J. W. Taylor (1990) *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press Inc., New York, USA, 315-322.
183. Wilkinson, H. H., M. R. Siegel, J. D. Blankenship, A. C. Mallory, L. P. Bush, C. L. Schardl (2000) Contribution of fungal loline alkaloids to protection from aphids in a grass-endophyte mutualism, *Mol. Plant Microbe* 13 (10): 1027-1033. doi:10.1094/MPMI.2000.13.10.1027

184. Williamson, B., B. Tudzynski, P. Tudzynski, J. A. L. van Kan (2007) *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease, *Molecular Plant Pathology* 8(5): 561- 580. doi:10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x
185. Woudenberg, J. H. C., J.Z. Groenewald, M. Binder, P.W. Crous (2013) *Alternaria* redefined, *Studies in Mycology* 75(1): 171–212. doi: 10.3114/sim0015
186. Xu, X. M., C. Bertone, A. Berrie (2007) Effects of wounding, fruit age and wetness duration on the development of cherry brown rot in the UK, *Plant Pathol* 56: 114–119. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01502.x>