

Prisutnost patogenih gljiva na lovoru (*Laurus nobilis* L.) na području grada Opatije

Alilović, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:108:569698>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-30**



Repository / Repozitorij:

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



**FAKULTET ŠUMARSTVA I DRVNE TEHNOLOGIJE SVEUČILIŠTA U
ZAGREBU**

ŠUMARSKI ODSJEK

SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

URBANO ŠUMARSTVO, ZAŠTITA PRIRODE I OKOLIŠA

IVA ALILOVIĆ

**PRISUTNOST PATOGENIH GLJIVA NA LOVORU (*Laurus
nobilis* L.) NA PODRUČJU GRADA OPATIJE**

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2022.

**FAKULTET ŠUMARSTVA I DRVNE TEHNOLOGIJE SVEUČILIŠTA U
ZAGREBU**

ŠUMARSKI ODSJEK

**PRISUTNOST PATOGENIH GLJIVA NA LOVORU (*Laurus nobilis* L.) NA
PODRUČJU GRADA OPATIJE**

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. Milivoj Franjević

3. doc. dr. sc. Marko Vucelja

Studentica: Iva Alilović

JMBAG: 0068225414

Datum odobrenja teme: 2. travnja 2022.

Datum predaje rada: 26. rujna 2022.

Datum obrane rada: 28. rujna 2022.

Zagreb, rujna 2022.

Dokumentacijska kartica

Naslov	Prisutnost patogenih gljiva na lovoru (<i>Laurus nobilis</i> L.) na području grada Opatije
Title	Presence of pathogenic fungi on laurel (<i>Laurus nobilis</i> L.) in the area of the town Opatija
Autor	Iva Alilović
Adresa autora	S.S. Kranjčevića bb, Čaplina
Mjesto izrade	Zagreb
Vrsta objave	Diplomski rad
Mentor	prof. dr. sc. Danko Diminić
Godina objave	2022.
Sadržaj rada	Broj stranica: 47 Broj tablica: 6 Broj slika: 24 Broj navoda literature: 92
Ključne riječi	lovor, izbojci, izolacija gljiva, inokulacija, <i>Colletotrichum fioriniae</i> , <i>C. nymphae</i> , <i>C. karsti</i>
Key words	laurel, shoots, fungal isolation, inoculation, <i>Colletotrichum fioriniae</i> , <i>C. nymphae</i> , <i>C. karsti</i>
Sažetak	U srpnju 2019. primijećeno je značajno sušenje običnog lovora (<i>Laurus nobilis</i> L.) u Opatiji. Simptomi počinju kao sušenje vršnih izbojaka što naposljetku dovodi do sušenja i odumiranja cijelih biljaka. Cilj rada bio je utvrditi uzrok odumiranja običnog lovora na području grada. Analizirani izbojci sakupljeni su sa dvije lokacije (park Angiolina i park Margarita). Izbojci su analizirani klasičnim metodama izolacije gljiva na hranjive podloge, nakon čega su dobiveni miceliji identificirani molekularnim metodama. Analizom su utvrđena 32 taksona gljiva iz ukupno 31 uzorka. Od toga ih je 17 zabilježeno kao patogen, četiri su saprofita i tri endofita. Među izoliranim taskonima. zabilježene su i tri patogene <i>Colletotrichum</i> vrste kao mogući uzročnici nekroze i

	<p>odumiranja, te je proveden test patogenosti kojim su inokulirane zdrave trogodišnje sadnice lovora. Preliminarnim rezultatima testa patogenosti utvrđeno je da <i>C. nymphae</i>, <i>C. karsti</i> i <i>C. fioriniae</i> mogu prouzrokovati nekrozu kore, stoga bi one mogle biti potencijalan uzrok odumiranja stabala na području Opatije.</p>
Abstract	<p>In July 2019, significant drying of laurel (<i>Laurus nobilis</i> L.) was noticed in Opatija. The symptoms begin as the drying of the top shoots, which eventually leads to the drying and death of the entire plant. The aim of this study was to determine the cause of the death of laurel in the area of the city. The analyzed shoots were collected from two locations (Angiolina Park and Margarita Park). Shoots were analyzed by classical fungal isolation methods onto the nutrient media, after which the obtained mycelia were identified by the molecular methods. The analysis revealed 32 taxa of fungi from a total of 31 samples. Of these, 17 are recorded as pathogens, four are saprophytes and three are endophytes. Among the isolated fungi, three pathogenic <i>Colletotrichum</i> species as possible causes of necrosis and dieback were obtained and pathogenicity test was performed in healthy three-year-old laurel seedlings. The preliminary results of the pathogenicity test determined that <i>C. nymphae</i>, <i>C. karsti</i> and <i>C. fioriniae</i> can cause necrosis of the bark, therefore they could be a potential cause of the death of trees in the area of Opatija.</p>

	IZJAVA O IZVORNOSTI RADA	OB ŠF DS 01
		Revizija: 2
		Datum: 18. 2. 2019.

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

Iva Alilović

U Zagrebu 28. rujna 2022.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Obični lovor (<i>Laurus nobilis</i> L.)	1
1.2. Lokacije istraživanja na području grada Opatije	4
1.2.1. Perivoj Angiolina	4
1.2.2. Park Margarita	5
2. MATERIJALI I METODE	7
2.1. Izolacija micelija gljiva iz izbojaka običnog lovora	7
2.2. Identifikacija taksona dobivenih micelija molekularnim metodama	9
2.3. Inokulacija	14
2.3.1. Čiste kulture micelija korištene za inokulaciju.....	15
2.3.2. Postupak inokulacije sadnica lovora.....	16
2.3.3. Praćenje razvoja simptoma na sadnicama	17
3. REZULTATI S RASPRAVOM	18
3.1. Rezultati istraživanja prisutnosti gljiva na običnom lovoru	18
3.2. Rezultati inokulacije sadnica običnog lovora	22
3.3. Izolirane <i>Colletotrichum</i> vrste	29
3.3.1. Gljive roda <i>Colletotrichum</i> pronađene u izbojcima običnog lovora	31
<i>Colletotrichum nymphaeae</i> (Pass.) Aa	31
<i>Colletotrichum karsti</i> Yan L. Yang, Zuo Y. Liu, K.D. Hyde & L. Cai.....	33
<i>Colletotrichum fioriniae</i> (Marcelino & Gouli) R.G. Shivas & Y.P. Tan	35
4. ZAKLJUČAK	38
5. LITERATURA	39

Popis slika:

Slika 1. Obični lovor (<i>L. nobilis</i> L.) https://plants.ces.ncsu.edu/plants/laurus-nobilis/	2
Slika 2. Perivoj Angiolina, Opatija https://hr-cro.com/croatia/opatija_park_angiolina/eng	4
Slika 3. Perivoj Margarita, Opatija https://hr-cro.com/croatia/opatija_park_margarita/eng	6
Slika 4. Površinska sterilizacija uzoraka.....	7
Slika 5. Petrijevke s čistim kulturama	8
Slika 6. Centrifuga	10
Slika 7. PCR uređaj.....	13
Slika 8. Raspored tretiranih 18 sadnica lovora s dva izolata + kontrola.....	15
Slika 9. Sadnice s tracicama	16
Slika 10. Postupak inokulacije.....	17
Slika 11. Primjer izgleda mjesta inokulacije: a - crni nekrotični prsten na zaraženom izbojku; b – kalusno tkivo na kontrolnom izbojku.....	22
Slika 12. Razvoj simptoma inokuliranih lovora s <i>Colletotrichum nymphaeae</i>	23
Slika 13. Razvoj simptoma inokuliranih lovora s <i>Colletotrichum karsti</i>	24
Slika 14. Razvoj simptoma inokuliranih lovora s <i>Colletotrichum fioriniae</i>	25
Slika 15. Ravoj simptome inokuliranih lovora s <i>Thyridium</i> sp.....	26
Slika 16. Grafički prikaz dužina nekroze po broju inokulirane sadnice.....	28
Slika 17. Odnos ukupne dužine nekroza po patogenu	29
Slika 18. Micelij vrste <i>C. nymphaeae</i>	31
Slika 19. Morfološke i kulturološke karakteristike <i>C. nymphaeae</i> (Chen i sur 2022).....	32
Slika 20. Rasprostranjenost vrste <i>C. nymphaeae</i> , CABI, 2022. https://www.cabi.org/isc/datasheet/120357#toDistributionMaps	33
Slika 21. Micelij vrste <i>C. karsti</i>	34
Slika 22. Rasprostranjenost vrste <i>C. karstii</i> , CABI, 2022. https://www.cabi.org/isc/datasheet/119134#toDistributionMaps	35
Slika 23. Micelij vrste <i>C. fioriniae</i>	36
Slika 24. Rasprostranjenost vrste <i>C. fioriniae</i> . CABI, 2022. https://www.cabi.org/isc/datasheet/118779#toDistributionMaps	37

Popis tablica:

Tablica 1. Koncentracije pojedinih sastojaka smjese za PCR s ITS početnicama	11
Tablica 2. Uvjeti lančane reakcije polimerazom za ITS regiju	11
Tablica 3. Koncentracije pojedinih sastojaka smjese za PCR s TEF početnicama	12
Tablica 4. Uvjeti lančane reakcije polimerazom za TEF regiju	12
Tablica 5. Rezultati istraživanja grupirani po taksonima	21
Tablica 6. Iznos dužine nekrotičnog tkiva po patogenu	27

1. UVOD

Obični lovor (*Laurus nobilis* L.) jedan je od glavnih ukrasnih vrsta u uređenju okoliša i u parkovima grada Opatije. Adamović (1929) u svojim hvalospjevima navodi kako se: "nigdje na Jadranu, pa čak niti u raskošnoj, izabranim raslinjem dekoriranoj talijansko-francuskoj Rivijeri ne može pronaći tako izvorne i brojne kolekcije, dapače šume lovora, kao u Opatiji. Opatija stoji u tom smislu sama i jedinstvena na cijelom svijetu."

U srpnju 2019. godine zabilježeno je značajno sušenje lovorovih stabala na području grada. Prvi simptomi, uočeni u parku Angiolina, bili su sušenje vršnih izbojaka koje se dalje širilo prema drugim dijelovima biljke, što je naposljetku dovelo do sušenja i odumiranja cijelih stabala. Lovori u tome parku kompletno su posječeni 2020. godine, te su se samostalno regenerirali iz panja. Na mladim biljkama, 2022. godine ponovno su uočeni blagi simptomi u donjim dijelovima krošnje. Do ožujka 2022. godine sušenje lovora prisutno je na cijelom području grada, te su zabilježeni i prvi slučajevi u Lovranu.

Cilj ovog rada je utvrditi uzrok odumiranja običnog lovora u povijesnim parkovima i perivojima grada Opatije, uz hipotezu da je uzrok odumiranja patogena gljiva.

1.1. Obični lovor (*Laurus nobilis* L.)

Prema Franjiću i Škvorcu (2010) obični lovor je vazdazeleni grm ili manje stablo (*slika 1*) iz porodice *Lauraceae*. Doseže visinu do 12 (-15) m te promjer oko 60 cm. Kod odraslih jedinki grane su usmjerene prema gore, tvoreći tako gustu i široku krošnju. Listovi su jednostavni, duguljasti, dugi 8-12 i široki 3-5 cm, prema vrhu zašiljeni te dorzoventralni. Izmjenično su poredani, te aromatični zbog prisutnih žlijezda s eteričnim uljem. Cvjeta od veljače do svibnja sitnim, prljavo bijelim do žutim cvjetovima. Budući da se radi o dvodomnoj biljci, stabla nose muške ili ženske cvjetove. Plod je jajasta, kuglasta ili elipsoidna, sjajna jednosjemena i crna aromatična boba, koja je duga 8-12 (-15) mm. Kora je pepeljasta, glatka i mjestimično sjajna, prilično tanka, a kod starijih stabala je crna i hrapava. Korijenov je sustav vrlo razvijen s razvijenom žilom srčanicom koja prodire duboko u tlo, posebice ono koje je krševito, u potrazi za fiziološkom

vlagom i hranjivim sastojcima te osigurava stabilnost cijele biljke. List je bez palistića, dok mu je nervatura perasto mrežasta s istaknutom glavnom žilom (Herman 1971, Matković 1972a, Šilić 1973, Idžojić 2013, Franjić i Škvorc 2010, 2020, Španjol i sur. 2021). Rasprostire se do 400 m nadmorske visine.



Slika 1. Obični lovor (*L. nobilis* L.)
<https://plants.ces.ncsu.edu/plants/laurus-nobilis/>

Obični je lovor podrijetlom iz Male Azije i zemalja oko Sredozemnog mora. U Hrvatskoj je rasprostranjen u priobalnom području i na otocima (Istra, Kvarner, Dalmacija), a najljepše i

najbrojnije populacije lovora su na području Opatije, Lovrana, Brijuna i Trstena (Franjić i Škvorc 2010). Prema Šimiću (2018) lovor je prisutan na prostoru arboretuma Trsteno od osnutka ladanjskog posjeda Gučetić još od 1494. godine.

Kako navode Ujčić i sur. (2010) o ljepoti lovora i specifičnosti njegovih šuma na području Opatije pisali su još davne 1891. Hirc, 1911. i 1929. godine Adamović, kao i Domac 1955. Također ističu da zahvaljujući specifičnoj mikroklimi Opatija ima jednu od najljepših šuma lovora na Mediteranu. Hirc (1891;203) navodi: "U vrtovih vinogradih, oko kucah i po pećinah porasla je tamno-zelena lovorika (*Laurus nobilis*). Osobito je bujna na Rieci, u Istri oko dražestne naše Opatije i draguda."

Prema Adamoviću (Horvat 1951) najčešće se pojavljuje u manjim ili većim skupinama u najtoplijem području hrasta medunca i crnog jasena. Iako je on mediteranski florni element, najbolje se razvija na granici izrazito mediteranske regije na gornjoj granici vazdazelenog područja gdje mu odgovaraju vlažniji položaji i svježiji tereni. Lovor dolazi i u toplijem eumediteranskom području u šumama crnike i alepskog bora na plodnijim tlima, u vrtovima, uvalama, uz ograde, rjeđe u makiji.

Granica bujne lovorove šume kreće se u rasponu od 140 do 230 m n.v., a što se tiče granice visinske rasprostranjenosti, ona je od 220 do 350 m n.v., gdje su zabilježeni samo mladi, izolirani primjerci. Na opatijskom području zabilježena su tri najvrjednija primjerka s maksimalnom visinom od 16 m i koji imaju maksimalni opseg od 155 cm (Ujčić i sur. 2010).

U prirodi, najčešće pridolazi u sastavu zimzelenih šuma i makija hrasta crnike i drugih vrsta (Razred *Quercetea ilicis* Br.-Bl. 1947; Red *Quercetalia ilicis* Br.-Bl. (1931) 1936; Sveza *Quercion ilicis* Br.-Bl. (1931) 1936) koja obuhvaća najznačajnije i površinski najveće šumske zajednice u eumediteranskoj zoni priobalnog vegetacijskog pojasa, posebno na otocima. Svojstvene stablašice i grmovi navedene zajednice su uz crniku (*Quercus ilex* L.), planika (*Arbutus unedo* L.), mirta (*Myrtus communis* L.), lovor, crni jasen (*Fraxinus ornus* L.), širokolisna zelenika (*Phillyrea latifolia* L.), alepski bor (*Pinus halepensis* Mill.) i dr.. Horvatić je izdvojio facies crnikovih šuma s lovorom (*laureosum*) u humidnijem području, graničnom području prema submediteranu i na dubljim tlima u Istri (Kovačić i sur. 2008, Vukelić 2012).

1.2. Lokacije istraživanja na području grada Opatije

1.2.1. Perivoj Angiolina

U Opatiji se u drugoj polovici 19. stoljeća javljaju razni primjeri javne i privatne perivojne arhitekture. Tako je između 1845. i 1860. godine bogati riječki trgovac Higinio Scarpa dao urediti perivoj oko vile Angiolina. Vila nazvana prema njegovoj pokojnoj ženi, služila je kao ljetnikovac, ali je s vremenom postala i središte društvenog života dolaskom raznih gostiju te je time privatni vrt pretvoren u perivoj. Od 1882. godine ovaj perivoj prelazi u vlasništvo Društva južnih željeznica i dolazi do rekonstrukcije i proširenja starog perivoja. Za precizno osmišljavanje prostora oko vile i crkve sa spomenutim perivojem u središtu zaslužan je Carl Schubert, ravnatelj bečkog Društva za izgradnju perivoja. Građevine karakteristične za historicističke perivoje su ribnjak, Švicarska kuća i gospodarski dio s rasadnikom, dok se zeleni parter ispred vile upotpunjuje cvjetnim gredicama koje naglašavaju palme (Vahtar-Jurković, 2010). S obzirom na povijesni kontekst, arhitekturu i funkciju, perivoj pripada historicističkom stilu koji je u Hrvatskoj krajem 19. stoljeća bio vrlo popularan (Bojanić Obad Šćitaroci i Obad Šćitaroci 2004).

Od 1968. godine, ovaj središnji opatijski perivoj proglašen je zaštićenim spomenikom parkovne arhitekture (*slika 2*).



Slika 2. Perivoj Angiolina, Opatija
https://hr-cro.com/croatia/opatija_park_angiolina/eng

Prema posljednjem popisu biljaka iz 2006. godine u parku se nalazi 124 vrste biljaka, a osnovu perivoja čini lovor. Lokacija uz obalu, lovorov gaj, egzotične biljke i niski parter koji omogućuje nesmetan pogled na more, dokaz je pažljivo osmišljene lokacije i botaničke vrijednosti perivoja. Istočno od vile uređeni su razni vijugavi putevi, nasadi i odmorišta. Nekadašnji stalagmit i glazbeni paviljon su sadržaji tipični za lječilišni perivoj, a u skladu s historicizmom, javljaju se i klupe te svjetiljke. Spomenuta stilska obilježja su većinom ostala sačuvana i danas (Vahtar-Jurković 2010).

1.2.2. Park Margarita

Park Margarita, koji se nekad nazivao perivoj Franje Josipa I, smješten je u drugom pojasu grada s ciljem pružanja bolje zaštite od bure u izvorno očuvanoj šumi lovora i hrasta medunca koja pruža mir i odmor. Teren je razmjerno nagnut, sastoji se od 22 parcele, a biljne vrste su uglavnom iste kao u parku Angiolina. Park je nepravilnog oblika te nema arhitektonskih elemenata. Naglasak je više na florističkom sastavu (*slika 3*).

Povijesni dio perivoja na jugu graniči s hotelom Opatija, na jugoistoku s Domom zdravlja, privatne vile nalaze se na sjeveroistoku, Nova Cesta sa sjeverne strane, a granica prema Ulici Velog Jože je kod sportskih terena. Nagib terena odredio je uređenje staza te povezivanje različitih razina stubištem i odmorištima. Park je osmišljen kao pejzažno-romantičarski s mrežom staza i puteljaka. Šljunčane staze, polja obrubljena kamenom, odmorišta i klupe su uz biljne vrste glavni elementi. Prevlast flore nad arhitekturom i odmorišta tipična su romantička obilježja. Obilježja stila u povijesnom dijelu parka sačuvana su i danas (Vahtar-Jurković 2010).



Slika 3. Perivoj Margarita, Opatija
https://hr-cro.com/croatia/opatija_park_margarita/eng

2. MATERIJALI I METODE

Izbojci običnog lovora sakupljeni su 29. ožujka 2022. godine s vizualno simptomatičnih stabala na području parka Margarita i perivoja Angiolina u Opatiji. Uzimani su izbojci s izraženim simptomima sušenja, prerezom od par centimetara ispod diskoloracije. Utvrđivana je prisutnost patogenih gljiva na izbojcima metodom izolacije micelija na hranjive podloge te molekularnim metodama identifikacije vrsta. Analiziralo se 9 izbojaka iz parka Angiolina i 22 iz parka Margarita. Također je započeo i test patogenosti.

2.1. Izolacija micelija gljiva iz izbojaka običnog lovora

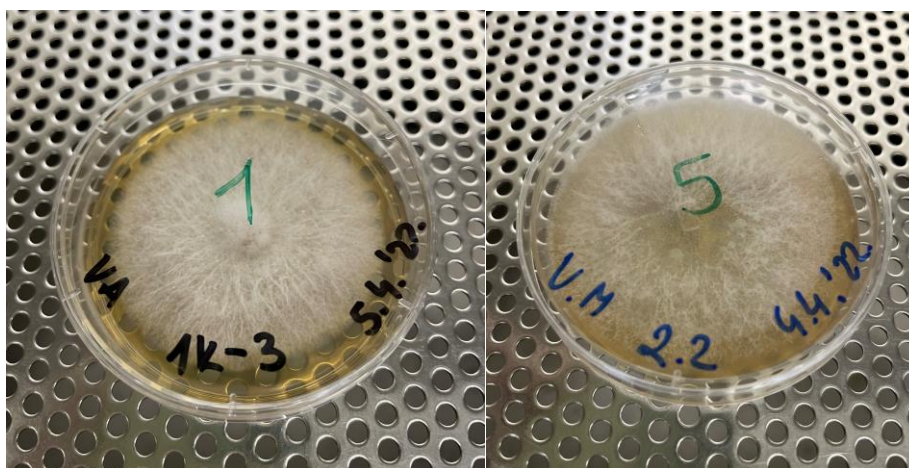
Uzorci - 15 cm dugi izbojci običnog lovora površinski su sterilizirani uranjanjem u 1% NaOCl (natrijev hipoklorit, varikina) na točno 1 minutu zatim u 70%-tni etanol također na 1 minutu. Potom su isprani u destiliranoj vodi te ostavljeni na papirnate ručnike kako bi se osušili. Cijeli postupak obavljao se u laminarnom kabinetu za rad u atmosferi čistog zraka (*slika 4*).



Slika 4. Površinska sterilizacija uzoraka

Nakon što su se uzorci osušili, sterilnim skalpelom i pincetom na radnoj dasci uzimani su komadići tkiva veličine 0,5-1cm. Komadići su uzimani s kore, drva i poprečnog presjeka izbojka. Sa svakog tkiva su uzeta po 4 komadića, i to s granice prijelaza simptomatičnog i zdravog tkiva, gdje je aktivnost gljive najjača. Potom su po 4 komadića stavljana u Petrijevu zdjelicu promjera 90 mm na MEA hranjivu podlogu (Malt Extract Agar, ThermoFisher scientific, SAD) s dodatkom antibiotika (streptomycin sulfat, 0,2 g/L, Sigma-Aldrich, SAD). Svaka Petrijeva zdjelica je zatvorena, označena prvim slovom lokacije (VA1,VM1...), brojem uzorka i datumom, te su spremljene u plastične vrećice i pohranjene u komoru rasta u tamu na temperaturu od 21°C.

Prva kontrola razvoja micelija bila je nakon tjedan dana, te se dalje kontrola obavljala svaka 2 dana. Nakon četiri tjedna miceliji su presađeni u manje Petrijeve zdjelice na MEA hranjivu podlogu u svrhu dobivanja čistih kultura (*slika 5*).



Slika 5. Petrijevke s čistim kulturama

Dobivene čiste kulture gljiva su na temelju morfoloških značajki promatranih golim okom svrstani u morfotipove. Promatrane morfološke značajke su uključivale boju i teksturu micelija, obojenje hranjive podloge, boju na poledini Petrijeve zdjelice te brzinu rasta. Za svaki utvrđeni morfotip odabran je jedan reprezentativni izolat za identifikaciju vrste. Miceliji su za potrebe izolacije DNK uzgojeni u MEB (Malt Extract Broth) tekućoj hranjivoj podlozi u mikroeprijetama (2 ml) s po jednom čeličnom kuglicom.

2.2. Identifikacija taksona dobivenih micelija molekularnim metodama

Izolacija DNK iz micelija vršena je metodom isoljavanja (Miller i sur. 1988) s modifikacijama (Kranjec 2017). Nakon sedam dana rasta u komori, mikroeprevete s micelijima su centrifugirane na 20 000x g, 5 minuta na 20°C (Eppendorf AG 5804 R laboratorijska centrifuga) (slika 6). Nakon toga je hranjiva podloga ispipetirana te je u mikroeprevete dodano 300 µl pufera za lizu (20 mM Tris, 200 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10 % SDS, pH 8,0) koje su zatim homogenizirane u Tissue Lyseru 3 minute na 30 Hz. Nadalje, dodano je 150 µl natrijevog acetata (3 M NaAc, pH 5,2) te inkubirano na -20°C u trajanju od 10 minuta, nakon čega su mikroeprevete podvrgnute centrifugiranju na 18 000x g, 5 minuta. Supernatant je ispipetiran u nove mikroeprevete i dodan je jednak volumen izopropanola (270 µl) koji služi za taloženje DNK. Nakon inkubacije na 4°C u trajanju od 5 minuta, mikroeprevete su centrifugirane na 4°C i 20 000x g 20 minuta. Potom je izopropanol pažljivo izliven iz mikroepreveta te je dodano 500 µl ledeno hladnog 70% etanola i centrifugirano na 4°C i 20 000x g, 3 minute. Etanol je zatim ispipetiran iz epruveta koje su stavljene u termoblok na 39°C, 5 minuta, na sušenje, kako bi ostatak etanola ispario, i ostao samo talog DNK koji je naposljetku otopljen u 50 µl TE pufera (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 8,0). Tako pripremljeni uzorci su pohranjeni do daljnje uporabe na 4°C kako bi se nukleinske kiseline hidratizirale i potpuno otopile.



Slika 6. Centrifuga

U lančanoj reakciji polimerazom (PCR) umnažana je ITS regija izolirane genomske DNK (Schoch i sur. 2012) korištenjem početnica ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') i ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') (White i sur. 1990). Konačne koncentracije pojedinih sastojaka smjese za PCR (*tablica 1*) te uvjeti reakcije (*tablica 2*) određeni su empirijski prema Bakys i sur. (2013.).

Tablica 1. Koncentracije pojedinih sastojaka smjese za PCR s ITS početnicama.

Sastojak*	Početna koncentracija	Konačna koncentracija za reakciju	Volumen za 1 reakciju (μl)
Taq DNA polimeraza	5 U/μl	1,5 U/50 μl	0,3
početnica ITS1-F	10 μM	0,2 μM	1,3
početnica ITS4	10 μM	0,2 μM	1,3
dNTP smjesa	10 mM	0,2 mM	1,3
MgCl ₂	25 mM	2,75 mM	7,15
pufer za PCR	10 x	1 x	6,5
sterilna H ₂ O	-	-	43,55
DMSO 5 %	4	2,6	2,6
DNK kalup	-	3-90 ng/μl	1
Ukupno			65

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

Tablica 2. Uvjeti lančane reakcije polimerazom za ITS regiju

Početna denaturacija	35 ciklusa			Završno produljivanje lanca DNK
	Denaturacija	Nalijeganje	Produljivanje lanca DNK	
5 min na 95 °C	30 s na 95 °C	30 s na 55 °C	30 s na 72 °C	7 min na 72 °C

Za dio uzoraka za koje sekvenciranje nije bilo uspješno umnažanjem ITS regije, rađen je PCR gdje je umnažana TEF regija izolirane genomske DNK korištenjem početnica EF1-1018F (5'GAYTTCATCAAGAACATGAT3') i EF1-1620R (5'GACGTTGAADCCRACRTTGTC3') (Stielow 2015). Konačne koncentracije pojedinih sastojaka smjese za PCR te uvjeti reakcije prikazani su u *tablici 3* i *tablici 4*.

Tablica 3. Koncentracije pojedinih sastojaka smjese za PCR s TEF početnicama

Sastojak*	Početna koncentracija	Konačna koncentracija za reakciju	Volumen za 1 reakciju (μl)
Taq DNA polimeraza	5 U/μl	1 U/50 μl	0,26
početnica EF1-1018F	10 μM	0,4 μM	1,3
početnica EF1-1620R	10 μM	0,4 μM	1,3
dNTP smjesa	10 mM	0,2 mM	1,3
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	6,5
pufer za PCR	10 x	1 x	6,5
sterilna H ₂ O	-	-	43,59
DMSO 5 %	5	3,25	3,25
DNK kalup	-	3-90 ng/μl	1
Ukupno			65

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

Tablica 4. Uvjeti lančane reakcije polimerazom za TEF regiju

Početna denaturacija	35 ciklusa			Završno produljivanje lanca DNK
	Denaturacija	Nalijeganje	Produljivanje lanca DNK	
2 min na 94 °C	30 s na 94 °C	60 s na 56 °C	60 s na 72 °C	10 min na 72 °C

PCR reakcije izvodile su se na uređaju Eppendorf AG Mastercycler EP Gradient u pojedinačnom volumenu od 50 μl (slika 7). Tijekom svakog izvođenja reakcije uključena je i negativna kontrola (1 μl sterilne H₂O umjesto DNK kalupa).



Slika 7. PCR uređaj

Specifičnost, duljina (pb) te približna koncentracija dobivenih PCR produkata provjerene su elektroforezom u 1,5 %-tnom 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, 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 nanošeno je po 1 μ l svakog PCR produkta pomiješanog s 4 μ l sterilne destilirane vode (razrjeđenje zbog visoke koncentracije dobivenih produkata) te 1 μ l pufera za nanošenje uzoraka (6x DNA Loading Buffer, TransGen Biotech, Kina). Tijekom svake izvođene elektroforeze u jednu je od jažica nanošen molekularni marker poznate veličine (100 bp DNA Ladder, TransGen Biotech, Kina) radi procjene duljine i koncentracije PCR produkata. Nakon završene elektroforeze su PCR produkti na gelu vizualizirani te fotografirani pomoću UV transiluminatora s kamerom (Bio-Imaging Systems DNR, MiniBIS

Pro) te računalnoga programa GelCapture. Približna duljina PCR produkata određena je pomoću računalnoga programa GelAnalyzer 2010a (www.GelAnalyzer.com).

Izolacija genomske DNK iz odabranih čistih kultura micelija te umnažanje ciljanih sekvenci (ITS regije) u lančanoj reakciji polimerazom (PCR) izvršeni su u Molekularno-biološkome laboratoriju Zavoda za šumarsku genetiku, dendrologiju i botaniku na Fakultetu šumarstva i drvne tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Dobiveni nepročišćeni PCR produkti slani su u Macrogen Inc. (Amsterdam, Nizozemska) na sekvenciranje.

Kromatogrami dobiveni sekvenciranjem provjereni su i obrađeni u računalnome programu BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.2.5 (Hall 1999). Izolati su identificirani usporedbom obrađenih sekvenci s postojećima u bazi gena NCBI GenBank primjenom algoritma BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (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 94 – 97 % na također 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.

2.3. Inokulacija

Kako bi se utvrdilo jesu li pronađene gljive zaista uzročnici sušenja izbojaka i odumiranja lovora, postavljen je test patogenosti na način da su se zdrave biljke lovora inokulirale micelijem gljiva te je praćeno hoće li se razviti jednaki simptomi kao na terenu.

Za inokulaciju je korišteno 18 trogodišnjih sadnica lovora, koje su nabavljene u rasadniku Drijen u Zagrebu. Inokulacija 12 sadnica je obavljena 18. srpnja 2022., dok je preostalih 6 sadnica inokulirano 19. srpnja 2022.

Test patogenosti se provodi kako bi bili zadovoljeni Kochovi postulati koji glase:

1. Patogeni mikroorganizam mora biti prisutan u svim organizmima koji pate od bolesti dok u zdravim organizmima ne smije biti prisutan,
2. Mikroorganizam mora biti izoliran iz oboljelog organizma i uzgojen u čistoj kulturi,

3. Uzgojeni patogeni mikroorganizam mora moći uzrokovati bolest, odnosno jednake simptome, nakon što je ponovno inokulacijom uveden u zdrav organizam,
4. Patogeni mikroorganizam mora biti ponovno izoliran iz inokulirana eksperimentalna domaćina na kojem su razvijeni simptomi bolesti te identificiran kao onaj koji je identičan izvornom specifičnom uzročniku bolesti (Lagier i sur. 2018).

2.3.1. Čiste kulture micelija korištene za inokulaciju

Za inokulaciju sadnica lovora odabrane su 4 čiste kulture micelija gljiva za koje se pretpostavlja da bi mogle biti uzročnici sušenja lovora u Opatiji. Ti izolati su: *Colletotrichum nymphaeae* (CN), *C. karsti* (CK), *C. fioriniae* (CF), *Thyridium* sp.(XX). Na svakoj sadnici rađena je i kontrola (K).

Raspodjela inokulacije s četiri navedene gljive po sadnicama, prikazana je na slici 8.



Slika 8. Raspored tretiranih 18 sadnica lovora s dva izolata + kontrola

Colletotrichum nymphaeae (CN) - zeleno/bijela traka (zeleno)

Colletotrichum karsti (CK) - smeđa traka (žuta)

Colletotrichum fioriniae (CF) - plava traka (plava)

Thyridium sp. (XX) - bijela traka (siva)

Kontrola (K)

2.3.2. Postupak inokulacije sadnica lovora

Postupak inokulacije sadnica lovora obavljen je u fitopatološkom laboratoriju Zavoda za zaštitu šuma i lovno gospodarstvo na Fakultetu šumarstva i drvne tehnologije. Inokulirane su trogodišnje sadnice lovora sa po 4 izbojka na način da su 2 izbojka zaražena micelijem gljiva, a jedan sterilnom MEA hranjivom podlogom kao kontrola. Svaki inokulirani izbojak je označen odgovarajućom trakom u boji. Bijelom trakom je označena vrsta roda *Thyridium*, izbojak zaražen micelijem gljive *C. nymphaeae* označen je zeleno-bijelom trakom, *C. karsti* smeđom trakom, *C. fioriniae* plavom trakom, dok kontrolni izbojak nije bio označen. (slika 9).



Slika 9. Sadnice s trakicama

U laminarnom kabinetu prije same inokulacije su pripremljeni „čepovi“ micelija i sterilne hranjive podloge u Petrijevim zdjelicama veličine 5 mm. Na izbojku lovora, na visini oko 5 cm je

sterilnim svrdlom promjera 0,5 cm skinuta kora te je sterilnom iglom uzet prethodno pripremljen micelij koji je prislonjen na tkivo s kojeg je skinuta kora. Mjesto inokulacije je vrlo pažljivo omotano Parafilmom (Bemis Company, Inc.), prijanjajućom trakom koja sprječava gubitak vlage i štiti od utjecaja vanjskih čimbenika. Svrdlo, igla i pinceta su prije svake nove inokulacije sterilizirani uranjanjem u 96% etanol te kratko izloženi otvorenom plamenu (*slika 10*).



Slika 10. Postupak inokulacije

2.3.3. Praćenje razvoja simptoma na sadnicama

Sadnice su u posudama stavljene u dvorište Zavoda gdje se pratio tijekom razvoja simptoma. Tjedan dana nakon inokulacije, 26. srpnja 2022., s izbojaka je skinut Parafilm te su praćeni simptomi.

Izmjera nekrotičnog tkiva oko mjesta inokulacije izvršena je 9. rujna 2022. godine. Mjernom vrpcom je mjerena duljina nekroze od ruba inokuliranog dijela u smjeru korjena i prema vrhu izbojaka, pa je zbroj te dvije vrijednosti iznosio ukupnu duljinu nekroze toga izbojaka.

3. REZULTATI RADA S RASPRAVOM

3.1. Rezultati istraživanja prisutnosti gljiva na običnom lovoru

Nakon obavljenoga postupka izolacije micelija na MEA hranjivoj podlozi, otkrivena je prisutnost 32 taksona gljiva iz ukupno 31 izbojka lovora. Do razine vrste je identificirano 18, a do razine roda 14 taksonomskih jedinica. U tablici 5 prikazani su svi identificirani taksoni pronađenih gljiva prema NCBI GenBank bazi podataka. Također je prikazan broj izolata dobivenih iz tkiva kao i količina izbojaka na kojima su navedene gljive determinirane. 17 taksona pripada patogenim gljivama, četiri su saprotrofa te tri endofita. Među patogene taksone ubrajaju se: *Alternaria alternata*, *Aspergillus* sp., *Aureobasidium pullulans*, *Biscogniauxia nummularia*, *Botryosphaeria dothidea*, *Cladosporium* sp., *Colletotrichum* sp., *C.floriniae*, *C.karsti*, *C.nymphae*, *Diaporthe eres*, *Dothiorella iberica*, *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Pestalotiopsis chamaeropsis*, *Phaeoacremonium* sp. i *Seiridium italicum*. Determinirani saprotrofi su: *Angustimassarina* sp., *Cladosporium cladosporioides*, *Sacothecium sepincola* i *Thyridium* sp. Otkrivena tri endofita su *Clonostachys rosea*, *Paraconiothyrium brasiliense* i *Phyllosticta citribraziliensis*. Unutar 8 identificiranih rodova gljiva nalaze se i patogeni i endofiti i saprotrofi. Najviše izolata pripada rodu *Thyridium* sp., čije su vrste saprotrofi koji ne igraju značajnu ulogu u našem istraživanju. Iza njih slijedi endofit *Clonostachys rosea* sa 57 izolata. Vrsta je zabilježena kao saprotrof u tlu te endofit na biljakama. Kao mikoparazit, *C. rosea* pokazuje jaku sposobnost biološke kontrole protiv brojnih biljnih patogena, nematoda i insekata (Sun i sur. 2020). Sa 47 izolata ističe se patogena gljiva *Colletotrichum nymphae* kao mogući uzročnik odumiranja izbojaka lovora.

Vrste koje su imale značajan utjecaj na zdravstveno stanje lovora su označene u tablici 5. Navedene vrste, osim roda *Colletotrichum* poznate su kao patogeni koji uzrokuju nekrozu kore i utječu na sušenje izbojaka i grana različitih biljnih domaćina.

Vrsta *Diaporthe eres* zabilježena je kroz niz istraživanja kao značajni patogen te ključni uzročnik odumiranja velikog broja vrsta, kako stabala i voćkarica, tako i poljoprivrednih kultura (Van Rensburg i sur. 2006). Poznata je po tome što uzrokuje rak debela na nekoliko vrsta šumskoga drveća (Anagnostakis 2007), trulež plodova dunje (*Cydonia oblonga* Mill.) (Ristić i sur. 2016) i

propadanje sjemena soje u Srbiji (Petrović 2015). Također je otkrivena u nekrotičnome tkivu vrste *Fraxinus excelsior* (Kowalski i sur. 2016, Langer 2017).

D. eres je prvi put u Hrvatskoj zabilježena na vinovoj lozi što je ujedno i prva potvrda patogenosti te vrste na vinovoj lozi u svijetu (Kaliterna i sur., 2012). Prema Bastide i sur. (2017) u Francuskoj je na poljoprivrednim kulturama utvrđena kao glavni uzročnik sušenja i pojave jakih simptoma u obliku nekrotičnih lezija i crnih nekrotičnih mrlja na stabljikama gdje je daljnjim razvojem došlo do sušenja poljoprivrednih kultura čime je potvrđena značajna patogenost ove gljive. Udayanga i sur. (2014) opisuju *D. eres* kao oportunističkog parazita koji napada velik broj biljnih vrsta te na taj način stvara veliku genetsku varijabilnost ovisno o domaćinu kojeg napada.

Biscogniauxia nummularia, kako navodi Ogris (2013), dolazi kao endofit u kori bukve u normalnim uvjetima, a parazitsku fazu pokreću visoke temperature i stres od suše, prema tome se još naziva i latentni patogen. *B. nummularia* povezana je s ozbiljnim propadanjem bukve zabilježenim u posljednjih 20 godina u južnoj Italiji (Granata i Whalley 1994; Moriondo i sur. 1999; Capretti i sur. 2003; Granata i Sidoti 2004). Ova gljiva uzrokuje pojavu raka i truljenje drva kod drveća koje trpi jak nedostatak vode tijekom sezone rasta (Hendry et al. 1998). *B. nummularia* provodi dio svog životnog ciklusa u latentnom obliku u tkivima domaćina bez simptoma (Granata i Whalley 1994; Hendry i sur. 2002; Capretti i sur. 2003).

Simptomi infekcije vidljivi su na kori kao izdužene, crnkaste lezije na deblu i granama. (Patejuk i sur. 2022). Problem je uočen 2003. u Mađarskoj, 2014. u Španjolskoj i 2017. u Češkoj te uslijed klimatskih promjena, dugih sušnih razdoblja predstavlja sve veći problem na bukove šume u Europi.

Botryosphaeria dothidea tipska je vrsta roda *Botryosphaeria*. Gljive koje žive u ovom redu su među najrasprostranjenijim i najvažnijim uzročnicima raka i odumiranja drveća diljem svijeta, s *B. dothidea* jednom od najčešćih vrsta na velikom broju domaćina. Dugotrajna latentna infekcija ili endofitna faza od posebne je važnosti, jer implicira da gljiva može lako proći neotkrivena sustavima karantene u živim biljkama, voću i drugim dijelovima biljaka kojima se trguje (Marsberg i sur. 2016). Vrste iz roda *Botryosphaeria* smatraju se patogenima povezanim sa stresom (Czemmel i sur., 2015.; Desprez-Loustau i sur., 2006.; Ma i sur., 2001.b; Mehl i sur., 2013.; van Niekerk i sur., 2011. ; Piškur i sur., 2011; Slippers i Wingfield, 2007; Smith i sur., 1994; Stanosz i sur., 2001;

Zhang i sur., 2013). Simptomi bolesti uključuju rak na grančicama, granama i stabljikama, odumiranje vrhova i grana, trulež plodova, plave mrlje ili, u ekstremnim slučajevima, smrt biljke domaćina (Michailides, 1991.; Slippers i Wingfield, 2007.; Smith et. al., 1994; Swart i Wingfield, 1991). To uključuje prstenastu trulež jabuke (Kim i sur., 2004.; Tang i sur., 2012.; Xu i sur., 2015.), trulež plodova maslina (Phillips i sur., 2005.), bolest debela vinove loze (Li i sur., 2010.; van Niekerk i sur., 2006.; Qiu i sur., 2008.), pjegavosti lišća i lezije na hortikulturnim biljkama (Cunnington i sur., 2007.), kao i odumiranje i rak stabljike na bagremu (Gezahgne i sur., 2004.), eukalptusu (Burgess i sur., 2005; Gezahgne i sur., 2004; Mohali i sur., 2007), crnom grabu (Jurc i sur., 2006), boru (Gezahgne i sur., 2004), mangu (Slippers i sur., 2005), topoli (Grasso i Granata, 2010; Slippers i sur., 2004b) i koštuničastom voću (Inderbitzin i sur., 2010; Slippers i sur., 2004b; Wang i sur., 2011).

Dothiorella iberica opisali su Phillips i sur. (2005) na *Quercus ilex* u Španjolskoj, a zabilježena je i na *J. communis* u Portugalu (Alves i sur., 2013). Gljiva je također zabilježena na bademu u Kaliforniji (Doll i sur., 2015). Prema Valencia i sur. (2018) *D. iberica* je zabilježena kao patogen na avokadu u Čileu gdje uzrokuje rak na granama i odumiranje avokada.

Fusarium sp. Ovom rodu pripada jako puno vrsta koje se ubrajaju među najvažnije patogene gljive tla sa širokim spektrom domaćina. U prvom su redu poznate kao uzročnici polijeganja ponika, a zatim kao patogeni šumskog sjemena. Karakteristično je za njih da na napadnutim plodovima i sjemenu tvore navlake micelija s konidijama u obliku sitnih jastučića, gdje boja micelija ovisi o vrsti. Bitno je naglasiti da ovaj patogen prelazi na klice i mlade biljke iz sjemena, prouzrokujući tako polijeganje ponika (Glavaš 1999).

Seiridium italicum Samarak., Camporesi & K.D. Hyde, *sp. nov.* Prvi put je pronađen u Italiji u pokrajini Forlì-Cesena, Camposonardo - Santa Sofia, na odmrloj grani *Laurus nobilis*, 6. travnja 2016. Determinirana je kao nova vrsta. Poznata je samo po spolnom stadiju, dok nespolni stadij nije određen (Samarakoon i sur. 2022).

Tablica 5. Rezultati istraživanja grupirani po taksonima

Identificirani taksoni pronađenih gljiva prema NCBI GenBank bazi podataka	Broj izolata dobivenih iz tkiva	Količina izbojaka na kojima je determiniran
<i>Alternaria alternata</i>	1	1
<i>Angustimassarina</i> sp.	1	1
<i>Apiospora</i> sp.	1	1
<i>Aspergillus</i> sp.	1	1
<i>Aureobasidium pullulans</i>	1	1
<i>Biscogniauxia nummularia</i>	1	1
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	3	1
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1	1
<i>Cladosporium</i> sp.	7	5
<i>Clonostachys rosea</i>	57	9
<i>Colletotrichum fioriniae</i>	5	2
<i>Colletotrichum karsti</i>	11	2
<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	47	12
<i>Colletotrichum</i> sp.	7	1
<i>Cyphellophora europaea</i>	2	2
<i>Cyphellophora</i> sp.	2	2
<i>Diaporthe eres</i>	11	7
<i>Diaporthe</i> sp.	1	1
<i>Didymella</i> sp.	1	1
<i>Dothiorella iberica</i>	8	3
<i>Fusarium</i> sp.	4	4
<i>Paraconiothyrium brasiliense</i>	5	3
<i>Penicillium</i> sp.	1	1
<i>Penicillium sumatraense</i>	3	2
<i>Pestalotiopsis chamaeropsis</i>	7	2
<i>Phaeoacremonium</i> sp.	3	1
<i>Phyllosticta citribraziliensis</i>	1	1
<i>Pleosporales</i> sp.	1	1
<i>Sacrothecium sepincola</i>	1	1
<i>Sclerostagonospora</i> sp.	4	2
<i>Seiridium italicum</i>	9	4
<i>Thyridium</i> sp.	67	18

3.2. Rezultati inokulacije sadnica običnog lovora

Početne promjene na zaraženim izbojcima uočene su tri tjedna nakon što je skinut Parafilm kao blage diskoloracije oko mjesta inokulacije na kori. Pri sljedećem pregledu sadnica sredinom kolovoza uočeno je da se nekroza kore širi, no ne zauzima velike površine, svega par milimetara od mjesta inokulacije. Većina kontrolnih izbojaka nije zaraženo te je uočeno je da mjesto ozljede kalusira (*slika 11*).



Slika 11. Primjer izgleda mjesta inokulacije: a - crni nekrotični prsten na zaraženom izbojku; b – kalusno tkivo na kontrolnom izbojku

Na *slikama 12.-15.* prikazan je razvoj simptoma na inokuliranim biljakama.

Lovor test patogenosti - *Colletotrichum nymphaeae* (CN); status 16.8.2022.



Slika 12. Razvoj simptoma inokuliranih lovora s *Colletotrichum nymphaeae*

Lovor test patogenosti - *Colletotrichum karsti* (CK); status 16.8.2022.



Slika 13. Razvoj simptoma inokuliranih lovora s *Colletotrichum karsti*

Lovor test patogenosti - *Colletotrichum fioriniae* (CF); status 16.8.2022.



Slika 14. Razvoj simptoma inokuliranih lovora s *Colletotrichum fioriniae*

Lovor test patogenosti - Nepoznata vrsta; status 16.8.2022.

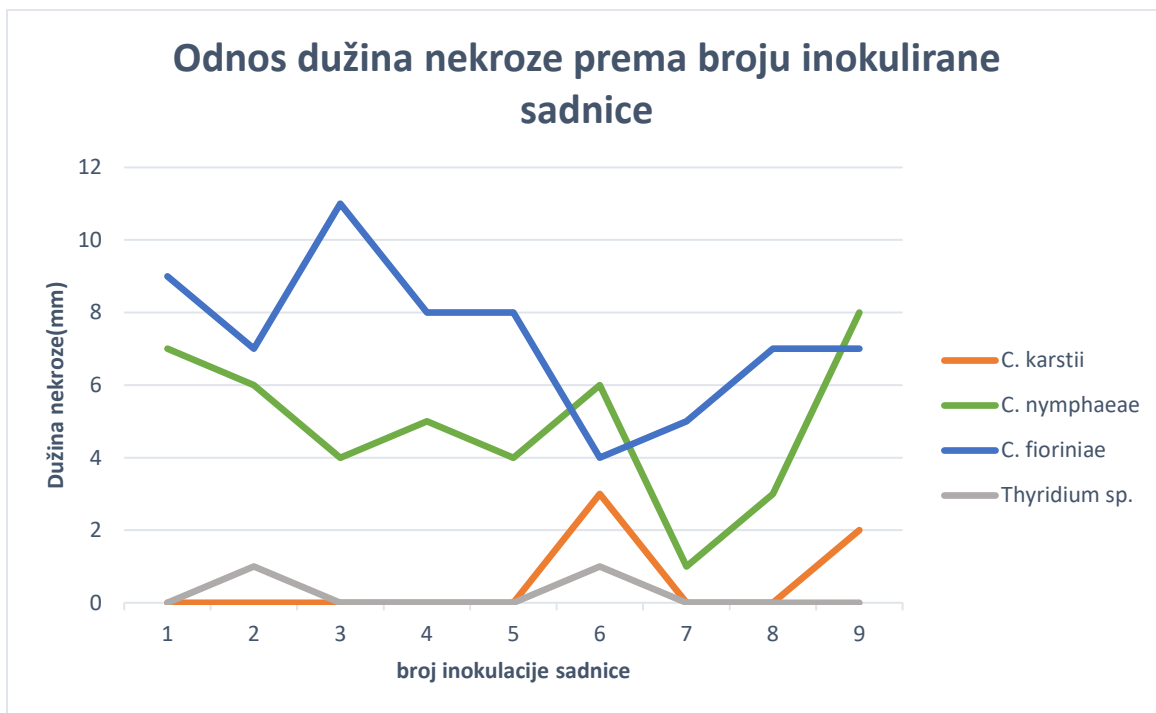


Slika 15. Ravoj simptima inokuliranih lovora s *Thyridium* sp.

Nakon obavljenog postupka inokulacije na zdravim sadnicama lovora, ustanovljeno je da vrsta iz roda *Thyridium* ima neznatan utjecaj na sušenje izbojaka. Patogeni roda *Colletotrichum* uzrokuju nekrozu kore, gdje *C. karstii* uzrokuje najmanje nekroze, *C. nymphae* nešto više, dok je *C. fioriniae* najvirulentnija. U tablici 6 prikazani su patogeni i dužina nekrotičnog tkiva u milimetrima. Navedeni podaci prikazani su i grafički (slika 12).

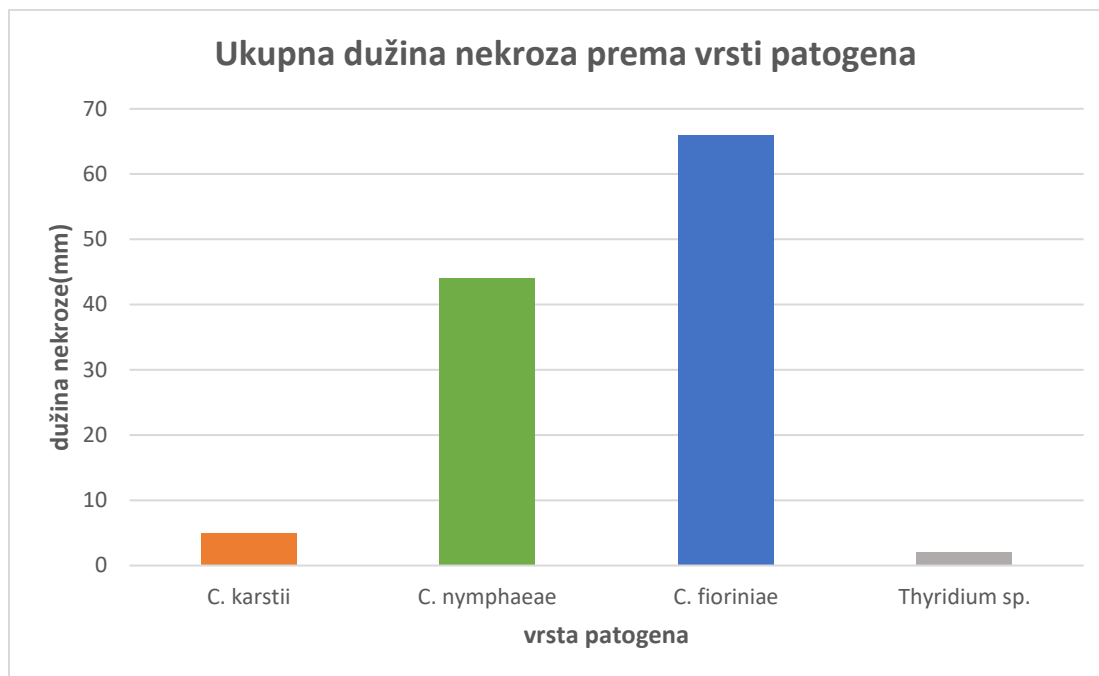
Tablica 6. Iznos dužine nekrotičnog tkiva po patogenu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Σ (mm)
<i>C. karstii</i>	0	0	0	0	0	3	0	0	2	5
<i>C. nymphae</i>	7	6	4	5	4	6	1	3	8	44
<i>C. fioriniae</i>	9	7	11	8	8	4	5	7	7	66
<i>Thyridium</i> sp.	0	1	0	0	0	1	0	0	0	2



Slika 16. Grafički prikaz dužina nekroze po broju inokulirane sadnice

Na slici 13 prikazana je ukupna dužina svih nekroza po patogenu gdje se jasno može vidjeti da je najvirulentnija vrsta *C. fioriniae* koja je uzrokovala nekrozu ukupne duljine 66 mm, s izraženim nekrozama od 44 mm slijedi *C. nymphaeae*, dok blage simptome uzrokuje *C. karstii* s dužinom ukupne nekroze od 5 mm. U pokusu, vrsta roda *Thyridium* pokazuje neznatne simptome.



Slika 17. Odnos ukupne dužine nekroza po patogenu

3.3. Izolirane *Colletotrichum* vrste

Rod *Colletotrichum* opisao je Corda 1831. godine, a pripada porodici *Glomerellaceae* (*Glomerellales*, *Sordariomycetes*), te je jedini njen član (Réblová i sur. 2011). Većina vrsta iz ovog roda važni su patogeni koji uzrokuju bolesti širokog spektra drvenastih i zeljastih biljaka, dok su neke endofiti i saprotrofi (Cannon i sur. 2012, Hyde i sur. 2009a, Jayawardena i sur. 2016). Primarno je rasprostranjen u tropskim i suptropskim krajevima, iako postoje neke poznate vrste koje utječu na usjeve umjerenog pojasa. Rod je nedavno proglašen osmom najvažnijom skupinom biljnih patogenih gljiva u svijetu, na temelju percipirane znanstvene i ekonomske važnosti (Dean i sur. 2012).

Kao biljni patogeni, vrste *Colletotrichum* prvenstveno se opisuju kao uzročnici bolesti antraknoze, iako su zabilježene i druge bolesti poput crvene truleži šećerne trske, bolesti bobica kave, truleži jagoda i banana i smeđe mrlje graška (Lenné 2002). Simptomi bolesti antraknoze uključuju ograničene, često udubljene nekrotične lezije na lišću, stabljikama, cvjetovima i

plodovima, kao i trulež krošnje i stabljike, plamenjaču sadnica itd. (Waller i sur. 2002). Mnoge vrste mogu se prenositi sjemenom i mogu dobro preživjeti u tlu rastući saprotrofno na mrtvim dijelovima biljaka, a mogu se i širiti raspršivanjem konidija putem vode i prijenosom askospora zrakom iz spolnih oblika (Nicholson i Moraes 1980). Infekcija se događa putem apresorija koji se razvija iz klijajuće spore na površini biljke, nakon čega slijedi prodiranje kutikule uzrokovano turgorom, a u nekim slučajevima i prodiranje epidermalnih stanica putem infektivnih hifa (Deising i sur. 2000). Novonastale kolonije u većini slučajeva tada ulaze u biotrofnu fazu sa zaraženim tkivima koja izvana ne pokazuju simptome. Ta faza može biti kratka (1-3 dana) (O'Connell i sur. 2000) ili produljena i vjerojatno uključuje dormantnost gljive (Prusky i Plumbley 1992). Zatim, gljiva ulazi u nekrotrofnu fazu koja rezultira značajnom smrću biljnih stanica i pojavom patogenih lezija. Ova odgođena pojava simptoma bolesti može dovesti do značajnih gubitaka nakon žetve, pri čemu naizgled zdravi usjevi degeneriraju u skladištu (Prusky i Plumbley 1992). Biotrofne životne strategije koje su usvojile vrste *Colletotrichum* također mogu pridonijeti njihovoj istaknutosti kao endofiti bez simptoma u živim biljnim tkivima (Lu i sur. 2004, Joshee i sur. 2009, Rojas i sur. 2010).

Dugi niz godina pretpostavljalo se da su vrste *Colletotrichum* specifične za biljke koje su zarazile, što je dovelo do velikog broja opisanih taksona s malo razlikovnih obilježja osim identiteta njihovih biljnih domaćina. Trenutačno razumijevanje opsega u kojoj vrste *Colletotrichum* pokazuju specifičnost domaćina je nedovoljno zbog brojnih čimbenika, uključujući nepotpuno uzorkovanje, ograničenje podataka uglavnom na populacije koje utječu na usjeve ili ukrasne biljke i slabo poznavanje patogenih učinaka. Informacije o većini sojeva u zbirkama kultura ukazuju na povezanost s određenom biljnom vrstom, ali rijetko daju pojedinosti o interakciji. Mnoge studije o rodu *Colletotrichum* ograničene su na sojeve koji utječu na jednu vrstu usjeva (Buddie i sur. 1999, González i sur. 2006), čime se značajno smanjuje obujam genskog fonda koji se uzorkuje.

Postoje dobro dokumentirani slučajevi *Colletotrichuma* koji žive kao endofiti i uzročnici bolesti četinjača (Wang i sur. 2008, Joshee i sur. 2009, Damm i sur. 2012a) i paprati (MacKenzie i sur. 2009). Vrste ovog roda su uvelike povezane i sa zeljastim i s drvenastim biljkama, iako se čini da potonje uglavnom sadrže kolonije u plodovima, lišću i drugim ne-lignificiranim tkivima. Također, postoje izolirani izvještaji o vrstama *Colletotrichum* koje uzrokuju infekcije insekata. (Marcelino i sur. 2008)

U vrijeme prve monografske obrade roda *Colletotrichum* (von Arx 1957) postojalo je oko 750 naziva (Cannon i sur. 2012). Von Arx (1957.) to je sveo na 11 taksona na temelju morfoloških karakteristika. Sutton (1980) je prihvatio 22 vrste, dok je Sutton (1992) prihvatio 39 vrsta na temelju morfoloških i kulturnih karakteristika. Hyde i sur. (2009b) dali su prvi sveobuhvatan pregled ovog roda sa 66 naziva u uobičajenoj upotrebi i 19 sumnjivih imena te su također istaknuli potrebu za revizijom ovog roda korištenjem molekularnih metoda (Hyde i sur. 2009a).

Trenutačno istraživači snažno preporučuju primjenu polifaznog pristupa, uključujući analizu zemljopisnih, ekoloških, morfoloških i genetskih podataka kako bi se uspostavio prirodni sustav klasifikacije za rod *Colletotrichum* (Cai i sur. 2009).

3.3.1. Gljive roda *Colletotrichum* pronađene u izbojcima običnog lovora

Colletotrichum nymphaeae (Pass.) Aa

C. nymphaeae pripada kompleksu vrsta *acutatum* i može se odvojiti od drugih vrsta analizom sekvence TUB2 (Damm i sur. 2012b). Dostupni su podaci o sekvencama cijelog genoma *C. nymphaeae* (Baroncelli i sur. 2016.). Testovi patogenosti provedeni su na ovoj vrsti kako bi se potvrdila njezina patogenost (Baroncelli i sur. 2016.). Razvijeni micelij ove vrste prikazan je na slici 14.



Slika 18. Micelij vrste *C. nymphaeae*

Opis vrste (*slika 15*): Vegetativne hife su promjera 1-5 μm , prozirne, glatke, septirane i razgranate. Konidiofori se formiraju izravno na hifama. Konidiofori su prozirni i glatki; nekoliko ih je septiranih i razgranatih. Konidiogene stanice su prozirne, glatke, cilindrične ili fuziformne i nisu jasno odvojene od hifa septumom. Konidije su ravne i cilindrične do klavate, s jednim krajem zaobljenim, a drugim krajem ili dva kraja oštrim, (6,8–)9–13(–15,9) \times (3,4–)4–4,5(–5,3) μm , srednja vrijednost \pm SD = 11,24 \pm 2,19 \times 4,24 \pm 0,44 μm (n = 50), omjer L/W = 2,7. Apresoriji su jednostavni ili u maloj skupini i uglavnom su okruglasti ili eliptični; nekoliko ih ima nepravilan obris, (4,8–)6,5–,5(–9) \times (4,3–)5–6(–7,9) μm , srednja vrijednost \pm SD = 6,97 \pm 0,85 \times 5,64 \pm 0,60 μm (n = 50), omjer L/W = 1,2. Čiste kulture na PDA su ravne s cijelim rubom. Zračni micelij je rijedak, prema sredini sivkastožut ili cimetast, a na rubu bijel; u reversu je tamno maslinasto siv. Ima stopu rasta od 54-60 mm nakon 7 dana (Chen i sur 2022).

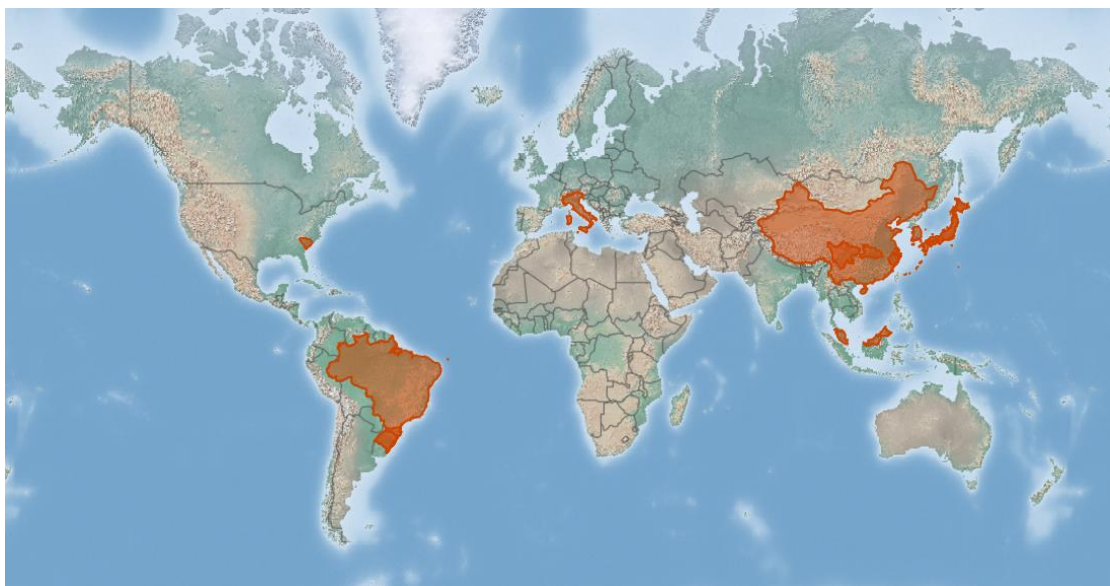


Slika 19. Morfološke i kulturološke karakteristike *C. nymphaeae* (Chen i sur 2022)

Ova vrsta je utvrđena je kao patogen na vrstama *Anemone* sp. (Izrael, Italija i Nizozemska), *Capsicum* sp. (Indonezija i Zimbabve), *Fragaria* \times *ananassa* (Bugarska, Kanada, Francuska, Izrael, Italija, Nizozemska, Južna Afrika, Španjolska, Švicarska, UK i SAD), *Leucaena* sp. (Meksiko), *Malus domestica* (Brazil i Uruguay), *Nuphar luteum* (Nizozemska), *Nymphaea alba* (Nizozemska), *Oenothera* sp. (Nizozemska), *Olea europaea* (Portugal), *Pelargonium graveolens* (Indija), *Photinia* sp. (UK), *Protea* sp. (Australija i Južna Afrika), *Phaseolus* sp. (Nizozemska) i *Vitis vinifera* (Kina) (Damm i sur. 2012b, Velho i sur. 2014, 2015, Baroncelli i sur. 2015b, Talhinhos i sur. 2015, Liu i sur. 2016).

Rasprostranjenost ove vrste u svijetu prikazana je na *slici 16*. Utvrđena je u Australiji, Brazilu, Bugarskoj, Kanadi, Francuskoj, Indiji, Indoneziji, Izraelu, Italiji, Keniji, Meksiku,

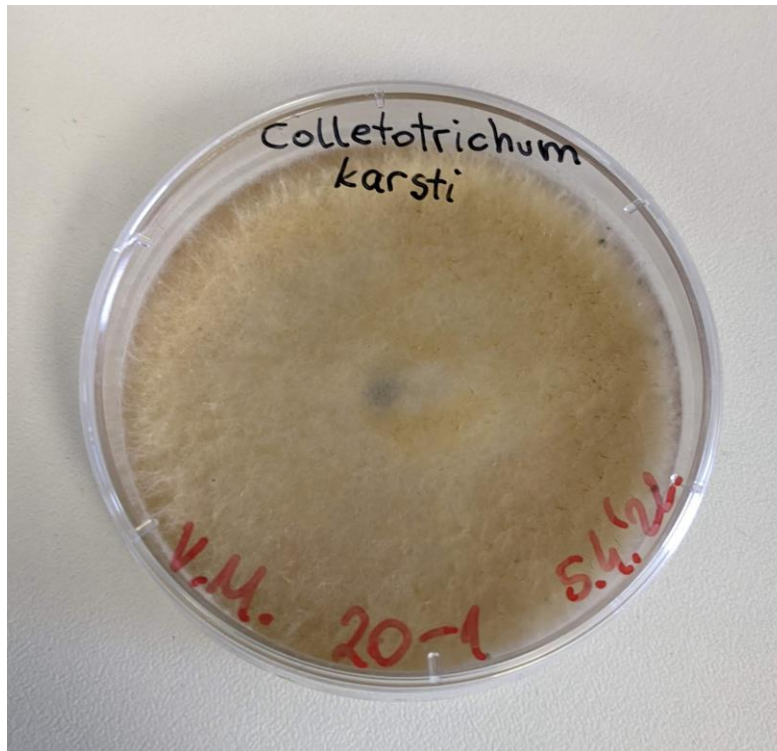
Nizozemskoj, Portugalu, Južnoj Africi, Španjolskoj, Švicarskoj, Tajlandu, UK-u, SAD-u, Zimbabveu (Damm i sur. 2012b), Keniji (Barnocelli i sur. 2015), Kini (Jayawardena i sur. 2016b, Wu i sur. 2018, Damm i sur. 2020, Li i Li 2020), Maleziji, Šri Lanki i u Južnoj Koreji (Jayawardena i sur. 2021).



Slika 20. Rasprostranjenost vrste *C. nymphaeae*, CABI, 2022.
<https://www.cabi.org/isc/datasheet/120357#toDistributionMaps>

Colletotrichum karsti Yan L. Yang, Zuo Y. Liu, K.D. Hyde & L. Cai

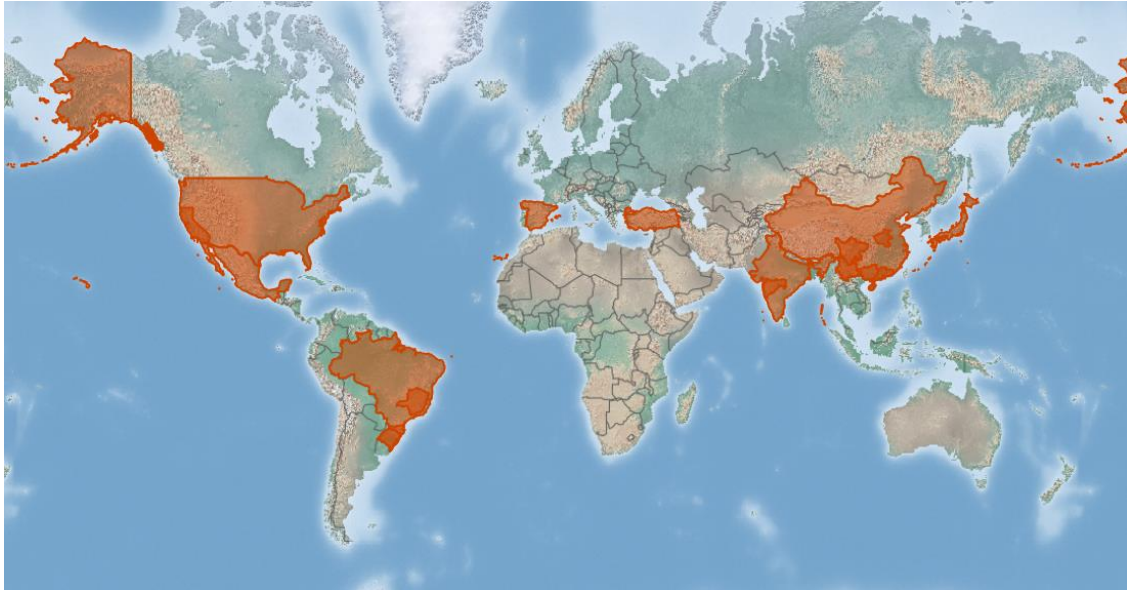
C. karsti najčešća je i geografski najraznovrsnija vrsta u kompleksu *boninense* 565 (Damm i sur. 2012a, Jayawardena i sur. 2016a). Morfološka i genetska varijabilnost ove vrste vrlo je velika, što otežava njezinu identifikaciju. Dostupni su testovi patogenosti za ovu vrstu (Yang i sur., 2011). Razvijeni micelij ove vrste na našim uzorcima prikazan je na *slici 17*.



Slika 21. Micelij vrste *C. karsti*

Ova vrsta ima širok raspon domaćina uključujući *Annona cherimola*, *Anthurium* sp., *Bletilla ochracea*, *Bombax aquaticum*, *Camellia* sp., *Capsicum annuum*, *Carica papaya*, *Citrus* sp., *Clivia miniata*, *Coffea* sp., *Cucumis melo*, *Diospyros australis*, *Eucalyptus grandis*, *Malus domestica*, *Mangifera indica*, *Olea europaea*, *Pistacia vera*, *Quercus salicifolia*, *Rubus glaucus*, *Theobroma cacao*, *Zamia oblique* i dr. (Damm i sur. 2012a, Jayawardena i sur. 2016a, Farr i Rossman 2021)

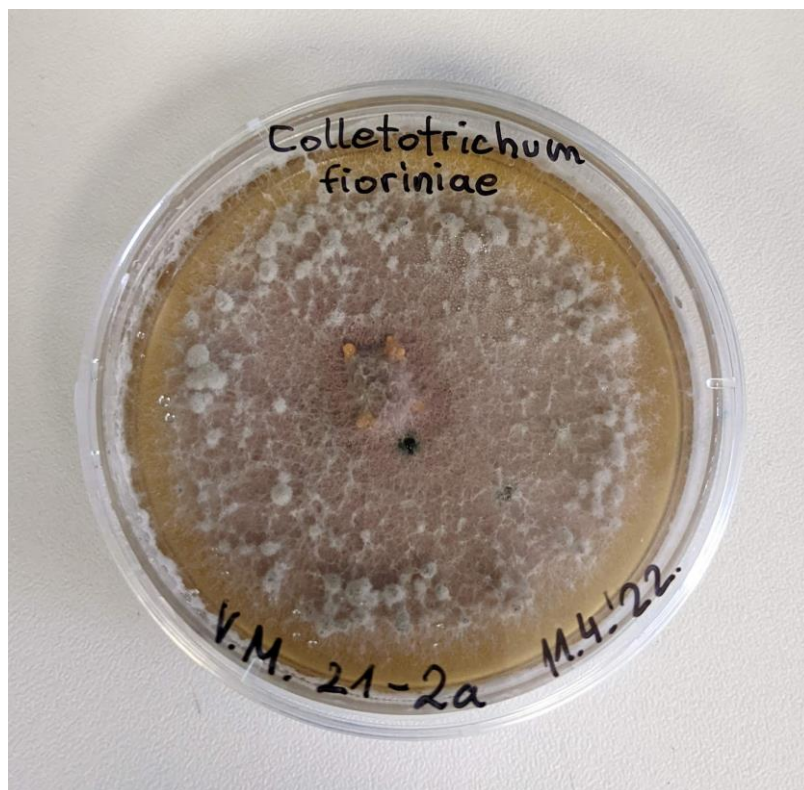
Rasprostranjenost ove vrste je prikazana na slici 18. Utvrđena je u Australiji, Brazilu, Kini, Kolumbiji, Njemačkoj, Indiji, Italiji, Japanu, Meksiku, Novom Zelandu, Panami, Portugalu, Južnoj Africi, Španjolskoj, Tajlandu, SAD-u, Zimbabveu (Damm i sur. 2012a, Jayawardena i sur. 2016a, Farr i Rossman 2021).



Slika 22. Rasprostranjenost vrste *C. karstii*, CABI, 2022.
<https://www.cabi.org/isc/datasheet/119134#toDistributionMaps>

Colletotrichum fioriniae (Marcelino & Gouli) R.G. Shivas & Y.P. Tan

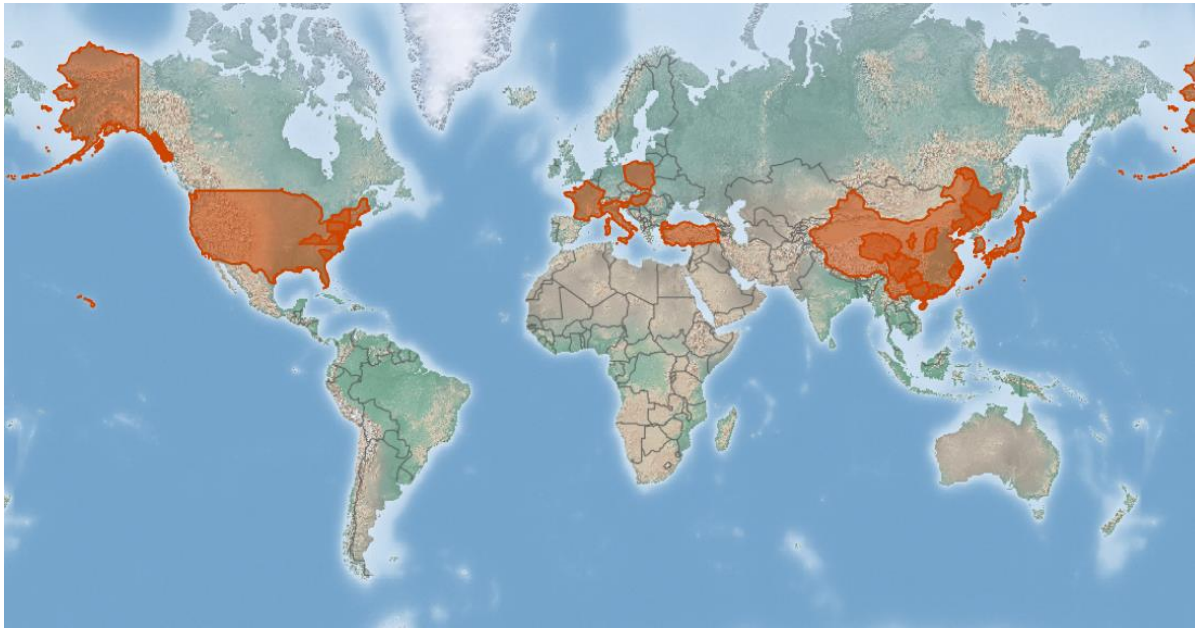
C. fioriniae je vrsta izvorno opisana kao entomopatogen kukca ljuskara u SAD-u, a također je zabilježena kao endofit u nekoliko biljaka (Marcelino i sur. 2008). *C. fioriniae* zabilježen je i kao uzročnik paleži lišća i stabljike na *Acacia acuminata* (Golzar 2009 kao *C. acutatum*) i truleži plodova avokada (Shivas i Tan 2009) u Australiji. Lako se identificira pomoću bilo kojeg od šest gena koje su analizirali Damm i sur. (2012b). Postoje studije patogenosti ili virulentnosti vezane uz ovu vrstu. Također, dostupni su i podaci o sekvencama cijelog genoma za ovu vrstu (Barnocelli i sur. 2014b). Razvijeni micelij ove vrste prikazan je na slici 19.



Slika 23. Micelij vrste *C. fioriniae*

Javlja se na sljedećim biljkama: *Magnifera indica* (endofit stabljike), *Malus domestica* (oštećenje ploda), *Malus pumila*, *Myriophyllum spicatum*, *Olea europaea*, *Parthenocissus* sp., cv. 'Disci' (meka trulež), *Penstemon* sp., *Persea americana* (trulež plodova), *Piper nigrum*, *Primula* sp. (lisne pjegje), *Pyrus* sp. (trulež ploda), *Rhododendron* sp., *Rubus* sp., *Solanum lycopersicum* (trulež ploda), *Tulipa* sp., *Vaccinium corymbosum* (trulež ploda), *Vitis vinifera* (Damm et al. 2012b), *Lycium barbarum*, *Lycium chinense*, *Ailanthus altissima*, *Pistacia vera*, *Litchi chinensis*, *Prunus persica*, *Solanum melongena*, *Zanthoxylum armatum* (Jayawardena i sur. 2021).

Rasprostranjenost je prikazana na slici 20. Utvrđena je u Australiji, Nizozemskoj, Novom Zelandu, Portugalu, UK-u, SAD-u (Damm i sur. 2012b), Kini (Liu i sur. 2016, Han i sur. 2020, Ling i sur. 2020), Koreji (Lee i sur. 2018, 2020), Italiji (Hyde i sur. 2017), Poljskoj (Pszczolkowska i sur. 2016).



Slika 24. Rasprostranjenost vrste *C. fioriniae*. CABI, 2022.
<https://www.cabi.org/isc/datasheet/118779#toDistributionMaps>

4. ZAKLJUČAK

Nakon provedenih izolacija čistih kultura i DNK analize utvrđena su 32 taksona gljiva, od kojih je 14 identificirano do razine roda, a 18 do razine vrste. Ustanovljeno je 17 patogenih gljiva od kojih su, prema pregledu literature, najvirulentnije i potencijalni uzročnici nekroze lovora tri vrste roda *Colletotrichum*. Uz to, determinirana su tri endofita te četiri saprotrofa.

Budući da *C. fioriniae*, *C. nymphaeae* i *C. karsti* do sad nisu poznate kao patogeni kore lovora, proveden je test patogenosti s ove tri vrste u cilju da se utvrdi mogu li prouzrokovati odumiranje tkiva kore izbojaka i grančica lovora.

Prema preliminarnim rezultatima testa patogenosti utvrđeno je da *C. nymphaeae*, *C. karsti* i *C. fioriniae* mogu prouzrokovati nekrozu kore, stoga bi one mogle biti potencijalan uzrok odumiranja izbojaka lovora te u konačnici i cijelih stabala na području Opatijskih gradskih vrtova. Zamijećeno je kako je od njih najvirulentnija *C. fioriniae*, a najmanje virulentna *C. karstii*. Uz spomenute tri *Colletotrichum* vrste, značajan utjecaj u odumiranju izbojaka i grančica običnog lovora imala je gljiva *Diaporthe eres*, te nešto manje izraženu ulogu u sušenju su imale *Biscogniauxia nummularia*, *Botryosphaeria dothidea*, *Dothiorella iberica*, *Fusarium* sp. i *Seiridium italicum*.

5. LITERATURA

- Adamović, L. (1911) *Die Pflanzenwelt Dalmatiens*, Verlag von Dr. Werner Klinkhardt, Leipzig.
- Adamović, L. (1915) *Führer durch die Natur der Nördlichen Adria*. Ien und Leipzig.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers i D. J. Lipman (1990) *Basic local alignment search tool*, Journal of Molecular Biology, 215 (3): 403–10.
- Arx J.A. von. (1957) *Die Arten der Gattung Colletotrichum Cda*. Phytopathologische Zeitschrift 29, 413–468.
- Bakys, R. (2013) *Dieback of Fraxinus excelsior in the Baltic Sea region: associated fungi, their pathogenicity and implications for silviculture*. Uppsala: Sveriges lantbruksuniv., Acta Universitatis Agriculturae Sueciae, 1652-6880 ; 2013:10.
- Bakys, R., A. Vasiliaskas, K. Ihrmark, J. Stenlid, A. Menkis i 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.
- Bakys, R., R. Vasaitis, P. Barklund, K. Ihrmark i J. Stenlid (2009) *Investigations concerning the role of Chalara fraxinea in declining Fraxinus excelsior*, Plant Pathology, 58: 284–292.
- Baroncelli R., Sarrocco S., Zapparata A., Tavarini S., Angelini L.G., Vannacci G. (2015a) Characterization and epidemiology of Colletotrichum acutatum sensu lato (C. chrysanthemi) causing Carthamus tinctorius anthracnose. Plant Pathology 64, 375–384.
- Baroncelli R., Sreemviasaprasad S., Lane C.R., Thon M.R., Sukno S.A. (2014) First report of Colletotrichum acutatum sensu lato (Colletotrichum godetiae) causing anthracnose in grapevine (Vitis vinifera) in the United Kingdom. New Disease Report 29, 26.
- Baroncelli R., Zapparata A., Sarrocco S., Sukno S.A., Lane C.R., Thon M.R., Vannacci G., Holub E., Sreenivasaprasad S. (2015b) Molecular diversity of anthracnose pathogen populations associated with UK strawberry production suggests multiple introductions of three different Colletotrichum species. PloS One 10, e0129140.

- Bastide, F., Sérandat, I., Gombert, J., Laurent, E., Morel, E., Kolopp, J., ... Poupard, P. (2016) *Characterization of fungal pathogens (Diaporthe angelicae and D. eres) responsible for umbel browning and stem necrosis on carrot in France*. *Plant Pathology*, 66(2), 239–253.
- Bojanić Obad Šćitaroci, B. i Obad Šćitaroci, M. (2004) *Gradski perivoji Hrvatske u 19. stoljeću, javna perivojna arhitektura hrvatskih gradova u europskom kontekstu*. Šćitaroci, Arhitektonski fakultet, Zagreb, 265 str.
- Buddie A.G., Martinez-Culebras P., Bridge P.D., Garcia M.D., Querol A., et al. (1999) *Molecular characterization of Colletotrichum strains derived from strawberry*. *Mycological Research* 103: 385–394.
- Cai L., Hyde K.D., Taylor P.W.J., Weir B., Waller J.M., Abang M.M., Zang J.C., Yang Y.L., Phouliyong S., Prihastuti Z.Y., Shivas R.G., McKenzie E.H.C., Johnston P.R. (2009) *A polyphasic approach for studying Colletotrichum*. *Fungal Diversity* 39, 183–204.
- Cannon P.F., Damm U., Johnston P.R., Weir B.S. (2012) *Colletotrichum current status and future directions*. *Studies in Mycology* 73, 181–213.
- Chen, Y.; Fu, D.; Wang, W.; Gleason, M.L.; Zhang, R.; Liang, X.; Sun, G. (2022) *Diversity of Colletotrichum Species Causing Apple Bitter Rot and Glomerella Leaf Spot in China*. *J. Fungi*, 8, 740. <https://doi.org/10.3390/jof8070740>
- D. A. Doll, P. E. Rolshausen, J. Pouzoulet, and T. J. Michailides (2015) *First Report of Dothiorella iberica Causing Trunk and Scaffold Cankers of Almond in California*.
- Damm U., Cannon P.F., Woudenberg J.H.C., Crous P.W. (2012b) *The Colletotrichum acutatum species complex*. *Studies in Mycology* 73, 37–113.
- Damm U., Cannon P.F., Woudenberg J.H.C., Johnston P.R., Weir B.S., Tan Y.P., Shivas R.G., Crous P.W. (2012a) *The Colletotrichum boninense species complex*. *Studies in Mycology* 73, 1–36.
- Damm U., Sun Y.C., Huang C.J. (2020) *Colletotrichum eriobotryae sp. nov. and C. nymphaeae, the anthracnose pathogens of loquat fruit in Central Taiwan, and their sensitivity to azoxystrobin*. *Mycological Progress* 19, 367–380.

- Damm U., Woudenberg J.H.C., Cannon P.F., Crous P.W. (2009) *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. *Fungal Diversity* 39, 45–87.
- Dean R., Van Kan J.A.L., Pretorius Z.A., Hammond-Kosack K.E., Di Pietro A., et al. (2012) *The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology*. *Molecular Plant Pathology* 13: 414–430.
- Deising H.B., Werner S., Wernitz M. (2000) *The role of fungal appressoria in plant infection*. *Microbes and Infection* 2: 1631–1641.
- Diminić, D., Kranjec Orlović, J., Lukić, I., Ježić, M., Ćurković Perica, M. i Pernem, M. (2019) *First Report of Charcoal Disease of Oak (*Biscogniauxia mediterranea*) on *Quercus* spp. in Croatia*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-19-0458-PDN>
- Farr D.F., Rossman A.Y. (2021) *Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory*, ARS, USDA. <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>
- Franjić, J., Ž. Škvorc (2010) *Šumsko drveće i grmlje Hrvatske*. Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet, Zagreb.
- Franjić, J., Ž. Škvorc (2020) *Šumsko drveće i grmlje Hrvatske (novo izdanje)*. Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet, Zagreb, p.516.
- Glavaš M. (1999) *Gljivične bolesti šumskog drveća*, Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
- Granata, G., Sidoti, A. (2004) *Biscogniauxia nummularia*: pathogenic agent of a beech decline. *Forest Pathology*, 34(6), 363-367
- Golzar H. 2009 – First report of anthracnose of Acacia in Australia. *Australasian Plant Disease Notes* 4, 70–71.
- González E., Sutton T.B., Correll J.C. (2006) Clarification of the etiology of Glomerella leaf spot and bitter rot of apple caused by *Colletotrichum* spp. based on morphology and genetic, molecular and pathogenicity tests. *Phytopathology* 96: 982–992.

- 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.
- Han S., Jiang Y., Yi J., Li S. et al. 2020 – First report of *Colletotrichum fiorinae* infection on *Zanthoxylum armatum* in China. *Plant Disease* 104, 2292.
- Herman, J. (1971) *Šumarska dendrologija*. Stanbiro, Zagreb, p.470.
- Hirc, D. (1891) *Pogled u floru hrvatskog Primorja s osobitim obzirom na šumsko drveće i grmlje*. Šumarski list, Vol 15, No 5, p. 195-208.
- Horvat, A. (1951) *O važnosti uzgoja lovora*. Šumarski list, Vol LXXV, No 12, p. 329-395.
- Hyde K.D., Cai L., Cannon P.F., Crouch J.A., Crous P.W., Damm U., Goodwin P.H., Chen H., Johnston P.R., Jones E.B.G., Liu Z.Y., McKenzie E.H.C., Moriwaki J., Noireung P., Pennycook S.R., Pfenning L.H., Prihastuti H., Sato T., Shivas R.G., Tan Y.P., Taylor P.W.J., Weir B.S., Yang Y.L., Zhang J.Z. (2009b) *Colletotrichum—names in current use*. *Fungal Diversity* 39, 147–182.
- Hyde K.D., Cai L., McKenzie E.H.C., Yang Y.L., Zhang J.Z., Prihastuti H. (2009a) *Colletotrichum: a catalogue of confusion*. *Fungal Diversity* 39, 1–17.
- Hyde K.D., Norphanphoun C., Abreu V.P., Bazzicalupo A. et al. 2017 – Fungal Diversity notes 603–708, taxonomic and phylogenetic notes on genera and species. *Fungal Diversity* 87, 1–235.
- Idžojić, M. (2013) *Dendrologija. Cvijet, češer, plod, sjeme*. Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet, Zagreb.
- Jayawardena R.S., Bhunjun C.S., Hyde K.D., Gentekaki E., Itthayakorn P. (2021) *Colletotrichum: lifestyles, biology, morpho-species, species complexes and accepted species*. *Mycosphere* 12(1), 519–669. Doi: 10.5943/mycosphere/12/1/7
- Jayawardena R.S., Hyde K.D., Damm U., Cai L., Liu M., Li X.H., Zhang W., Zhao W.S., Yan J.Y. (2016) *Notes on currently accepted species of Colletotrichum*. *Mycosphere* 7(8) 1192–1260, Doi 10.5943/mycosphere/si/2c/9

- Joshee S., Paulus B.C., Park D., Johnston P.R. (2009) *Diversity and distribution of fungal foliar endophytes in New Zealand Podocarpaceae*. *Mycological Research* 113: 1003–1015.
- Kaliterna, J., Miličević, T., & Cvjetković, B. (2012) *Grapevine Trunk Diseases Associated with Fungi from the Diaporthaceae Family in Croatian Vineyards / Identifikacija Vrsta Roda Fusarium Izoliranih S Plodova Jabuke Nakon Skladištenja*. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 63(4), 471–479.
- Kleemann J., Rincon-Rivera L.J., Takahara H., Neumann U., van Themaat E.V.L., et al. (2012) *Sequential delivery of host-induced virulence effectors by appressoria and intracellular hyphae of the phytopathogen Colletotrichum higginsianum*. *PLoS Pathogens* 8(4): e1002643. doi:10.1371/journal.ppat.1002643.
- Kovačić, S., Nikolić, T., Ruščić, M., Milović, M., Stamenković, V., Mihelj, D., Jasprica, N., Bogdanović, S. i Topić, J. (2008) *Flora jadranske obale i otoka, 250 najčešćih vrsta*. Školska knjiga, Zagreb, p. 560 str.
- Kranjec, J. (2017) *Uloga gljiva i gljivama sličnih organizama u odumiranju poljskoga jasena (Fraxinus angustifolia Vahl) u posavskim nizinskim šumama u Republici Hrvatskoj*, Doktorska disertacija, Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- Lagier. J-C., Dubourg G., Amrane S., Raoult D. (2018) *Koch Postulate: Why Should we Grow Bacteria?* DOI: 10.1016/j.arcmed.2018.02.003
- Lee D., Hassan O., Kim C., Chang T. (2018) *First report of peach (Prunus persica) anthracnose caused by (Colletotrichum fioriniae) in Korea*. *Plant Disease* 102, 2650–2651.
- Lee D.M., Hassan O., Chang T. (2020) *Identification, characterization, and pathogenicity of Colletotrichum species causing anthracnose of peach in Korea*. *Mycobiology* 48, 210–218.
- Lenné J.M. (2002) *Some major plant diseases*. *Plant Pathologist's Pocketbook* (Waller JM, Lenné JM, Waller SJ, eds). 3rd edn. CABI, Wallingford, UK: 4–18.
- Li S.Z., Li H. (2020) *Colletotrichum numphaeae causing anthracnose on Camellia oleifera in China*. *Plant Disease* 104, 1860.

- Ling J.F., Peng A., Jiang Z., Xi P. et al. (2020) *First Report of Anthracnose Fruit Rot Caused by Colletotrichum fiorinae on Litchi in China*. Plant Disease. Doi 10.1094/PDIS-07-20-1539-PDN
- Liu F., Wang M., Damm U., Crous P.W., Cai L. (2016) *Species boundaries in plant pathogenic fungi: a Colletotrichum case study*. BMC Evolutionary Biology 16, article81.
- Lu G., Cannon P.F., Reid A., Simmons C.M. (2004) *Diversity and molecular relationships of endophytic Colletotrichum isolates from the Iwokrama Forest Reserve, Guyana*. Mycological Research 108: 53–63.
- Luchi, N., Capretti, P., Vettraino, A. M., Vannini, A., Pinzani, P., & Pazzagli, M. (2006) *Early detection of Biscogniauxia nummularia in symptomless European beech (Fagus sylvatica L.) by TaqMan™ quantitative real-time PCR*. Letters in Applied Microbiology, 43(1), 33–38.
- Mackenzie S.J., Peres N.A., Barquero M.P., Arauz L.F., Timmer L.W. (2009) *Host range and genetic relatedness of Colletotrichum acutatum isolates from fruit crops and leatherleaf fern in Florida*. Phytopathology 99: 620–631.
- Marcelino J., Giordano R., Gouli S., Gouli V. et al. (2008) *Colletotrichum acutatum var. forinae (teleomorph: Glomerella acutata var. forinae var. nov.) infection of a scale insect*. Mycologia 100, 353–374.
- Marsberg, A., Kemler, M., Jami, F., Nagel, J. H., Postma-Smidt, A., Naidoo, S., ... Slippers, B. (2016) *Botryosphaeria dothidea: a latent pathogen of global importance to woody plant health*. Molecular Plant Pathology, 18(4), 477–488.
- Matković, P. (1972a) *Biomorfološka, filogenetska i ekološka svojstva lovorike – Laurus nobilis L.* Hortikultura, Vol 39, No 3, p. 80-84.
- Miller, S. A., Dykes, D., i Polesky, H. F. (1988) *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells*. doi: [10.1093/nar/16.3.1215](https://doi.org/10.1093/nar/16.3.1215)
- Nicholson R.L., Moraes W.B.C. (1980) *Survival of Colletotrichum graminicola: importance of the spore matrix*. Phytopathology 70: 255–261.

- Ogris, N. (2013) *Short-term forecast for occurrence of strip-cankering of beech (Biscogniauxia nummularia) in Slovenia*. Plant Protection Society of Slovenia.
- O’Connell R.J., Perfect S., Hughes B., Carzaniga R., Bailey J.A., et al. (2000) *Dissecting the cell biology of Colletotrichum infection processes*. In: *Colletotrichum. Host Specificity, Pathology and Host-Pathogen Interaction* (Prusky D, Freeman S, Dickman MB, eds). APS Press, St Paul, USA: 57–77.
- O’Connell R.J., Thon M.R., Hacquard S., Amyotte S.G., Kleemann J., et al. (2012) *Life-style transitions in plant pathogenic Colletotrichum fungi deciphered by genome and transcriptome analyses*. *Nature Genetics* doi:10.1038/ng.2372.
- Prusky D. i Plumbly R.A. (1992) *Quiescent infections of Colletotrichum in tropical and subtropical fruit*. In *Colletotrichum. Biology, Pathology and Control* (Bailey JA, Jeger MJ, eds). CABI, Wallingford, UK: 289–307.
- Pszczolkowska A., Okorski A., Pauksto L., Jastrzebski J. 2016 – First report of anthracnose disease caused by *Colletotrichum fioriniae* on blueberry in Western Poland. *Plant Disease* 100, 2167.
- Réblová M., Gams W., Seifert K.A. (2011) – *Monilochaetes and allied genera of the Glomerellales, and a reconsideration of families in the Microascales*. *Studies in Mycology* 68, 163–191.
- Rojas E.I., Rehner S.A., Samuels G.J., Van Bael S.A., Herre E.A., et al. (2010) *Colletotrichum gloeosporioides s.l. associated with Theobroma cacao and other plants in Panama: multilocus phylogenies distinguish pathogen and endophyte clades*. *Mycologia* 102: 1318–1338.
- Samarakoon, M.C., Hyde, K.D., Maharachchikumbura, S.S.N. et al. (2022) *Taxonomy, phylogeny, molecular dating and ancestral state reconstruction of Xylariomycetidae (Sordariomycetes)*. *Fungal Diversity* 112, 1–88.
- Santos, J.M. and Phillips, A.J.L. (2009) *Resolving the complex of Diaporthe (Phomopsis) species occurring on Foeniculum vulgare in Portugal*. *Fungal Diversity* 34: 111-125.

- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Crous, P. W. (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.
- Shivas R.G., Tan Y.P. (2009) *A taxonomic re-assessment of Colletotrichum acutatum, introducing C. fioriniae comb.et stat. nov. and C. simmondsii sp. nov.* Fungal Diversity 39, 111–122.
- Stielow, J. B., Lévesque, C. A., Seifert, K. A., Meyer, W., Irinyi, L., Smits, D., ... Chaduli, D. (2015). *One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes. Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi, 35(1), 242–263.*
- Sun, Z., Li, S., Ren, Q., Xu, J., Lu, X., & Sun, M. (2020) *Biology and applications of Clonostachys rosea*. Journal of Applied Microbiology.
- Sutton B.C. (1980) *The Coelomycetes. Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 1–696.
- Sutton B.C. (1992) *The genus Glomerella and its anamorph Colletotrichum*. In: *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control* (Bailey JA, Jeger MJ, eds). CABI, Wallingford, UK: 1–26.
- Šilić, Č. (1973) *Atlas drveća i grmlja*. Zavod za izdavanje udžbenika, Sarajevo, 218 str.
- Šimić, I. (2018) *Stanje ishranjenosti biljaka tipičnih za renesansu kao podloga za revitalizaciju arboretuma Trsteno*. Doktorski rad. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet Zagreb, p. 122.
- Španjol, Ž., Dorbić, B. i Vučetić, M. (2021) *Planika (Arbutus unedo L.) i lovor (Laurus nobilis L.) – značajne (važne) vrste našeg mediteranskog krša*. Vatrogastvo i upravljanje požarima, Vol. XI No.
- Talhinhas P., Gonçalves E., Sreenivasaprasad S., Oliveira H. (2015) *Virulence diversity of anthracnose pathogens (Colletotrichum acutatum and C. gloeosporioides species complexes) on eight olive cultivars commonly grown in Portugal*. European Journal of Plant Pathology 142, 73–83.

- Udayanga, D., Castlebury, L. A., Rossman, A. Y., Chukeatirote, E., & Hyde, K. D. (2014) *Insights into the genus Diaporthe: phylogenetic species delimitation in the D. eres species complex*. Fungal Diversity, 67(1), 203–229.
- Ujčić, I., Brozović, G. i Karlović, K. (2010) *Analiza zastupljenosti lovora na području Opatije*. Glasnik zaštite bilja, Vol 4, p. 46-51.
- Vahtar Jurković, K. (2010) *Opatijski gradski perivoji*. Glosa, Rijeka i Arhitektonski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Rijeka, 211 str.
- Valencia, A. L., Gil, P. M., Rosales, I. M., & Latorre, B. A. (2018) *Characterization and Pathogenicity of Botryosphaeriaceae Species Obtained from Avocado Trees with Branch Canker and Dieback, and from Avocado Fruit with Stem End Rot in Chile*. Plant Disease.
- Velho A.C., Alaniz S., Casanova L., Mondino P., Stadnik M.J. (2015) *New insights into the characterization of Colletotrichum species associated with apple diseases in southern Brazil and Uruguay*. Fungal Biology 119, 229–244.
- Velho A.C., Stadnik M.J., Casanova L., Mondino P., Alaniz S. (2014) *First report of Colletotrichum nymphaeae causing apple bitter rot in southern Brazil*. Plant Disease 98, 567.
- Vukelić, J. (2012) *Šumska vegetacija Hrvatske*, Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet, Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb.
- Waller J.M., Lenné J.M., Waller S.J. (2002) *Plant Pathologists's Pocketbook*. CABI, Wallingford, UK.
- Wang Y.T., Lo H.S., Wang P.H. (2008) Endophytic fungi from Taxus mairei in Taiwan: first report of Colletotrichum gloeosporioides as an endophyte of Taxus mairei. Botanical Studies 49: 39–43.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee i 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., 315–322.
- Yang Y., Cai L., Liu Z., Hyde K.D. et al. (2011) *Colletotrichum species on Orchidaceae in southwest China*. Cryptogamie Mycology 32, 229–253.