

UNIVERZITET U BEOGRADU

ŠUMARSKI FAKULTET

Milica P. Zlatković

***BOTRYOSPHAERIACEAE* KOMPLEKS  
NA RAZLIČITIM DRVENASTIM  
VRSTAMA U SRBIJI**

Doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF FORESTRY

Milica P. Zlatković

***BOTRYOSPHAERIACEAE* SPECIES  
OCCURRING ON VARIOUS WOODY  
HOSTS IN SERBIA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

## **Mentori:**

Dr Nenad Keča, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu  
Šumarski fakultet

Dr Bernard Slippers, redovni profesor  
Univerzitet u Pretoriji  
Institut za šumarstvo, poljoprivredu i biotehnologiju (FABI)

## **Članovi komisije:**

Dr Vesna Golubović-Ćurguz, vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu  
Šumarski fakultet

Dr Ivan Milenković, naučni saradnik  
Univerzitet u Beogradu  
Institut za šumarstvo

**Datum odbrane:**

## **Thesis supervisors:**

Dr Nenad Keča, full professor  
University of Belgrade  
Faculty of Forestry

Dr Bernard Slippers, full professor  
University of Pretoria  
Forestry and Agricultural Biotechnology Institute (FABI)

## **Examiners:**

Dr Vesna Golubović-Ćurguz, associate professor  
University of Belgrade  
Faculty of Forestry

Dr Ivan Milenković, scientific associate  
University of Belgrade  
Institute of Forestry

**Thesis defended on:**

# **BOTRYOSPHAERIACEAE KOMPLEKS NA RAZLIČITIM DRVENASTIM VRSTAMA U SRBIJI**

## **Izvod**

U zemljama Zapadnog Balkana zabeleženo je intenzivno sušenje brojnih drvenastih i žbunastih vrsta tokom poslednje decenije. Simptomi bolesti bili su tipični za one koje izazivaju gljivični patogeni iz familije *Botryosphaeriaceae*. Ciljevi ovog istraživanja bili su: 1. izolacija gljiva iz familije *Botryosphaeriaceae* iz obolelih stabala u Srbiji, Crnoj Gori i Bosni i Hercegovini i njihova karakterizacija, 2. da se utvrde domaćini i distribucija gljiva iz familije *Botryosphaeriaceae* u Srbiji, Crnoj Gori i Bosni i Hercegovini, u kontinentalnom i mediteranskom području, 3. da se utvrde domaćini gljive *Diplodia sapinea* u Srbiji i Crnoj Gori, 4. da se utvrdi genetički diverzitet i razmena genotipova između različitih populacija gljiva *Neofusicoccum parvum* i *D. sapinea* u Srbiji i Crnoj Gori.

Karakterizacija izolata najpre je izvršena uz pomoć DNA sekvenci internog transkribovanog spejsera (ITS) rDNA i identifikovano je šest glavnih klada. Reprezentativni izolati svake klade su zatim dodatno okarakterisani uz pomoć DNA sekvenci translacionog elongacionog faktora 1-alpha (TEF 1- $\alpha$ ),  $\beta$ -tubulin-2 (BT2) dela gena i velike podjedinice (LSU) rRNA, kao i morfoloških karakteristika aseksualnog izgleda ovih gljiva. *D. sapinea*-slični izolati su dodatno okarakterisani uz pomoć TEF 1- $\alpha$  dela gena. Genetički diverzitet i protok genotipova gljiva *N. parvum* i *D. sapinea* utvrđeni su uz pomoć DNA sekvenci ITS regiona, TEF 1- $\alpha$ , BT2 dela gena i mikrosatelitskih markera. Izolati gljive *D. sapinea* poreklom iz različitih domaćina proučavani su na nivou populacija poreklom iz *Cedrus* spp. i *Pinus* spp. Izolati gljiva *D. sapinea* i *N. parvum* koji potiču iz regiona sa različitim uslovima spoljašnje sredine proučavani su na nivou populacija iz kontinentalnog (CR) i Mediteranskog (MR) regiona.

Identifikovano je deset vrsta gljiva iz familije *Botryosphaeriaceae* od kojih su osam i to *Dothiorella sarmentorum*, *Neofusicoccum parvum*, *Botryosphaeria dothidea*, *Phaeobotryon cupressi*, *Sphaeropsis visci*, *Diplodia seriata*, *D. sapinea* i *Diplodia mutila* bili nauci poznati taksoni. Preostale dve vrste mogle su biti identifikovane samo do nivoa roda i to kao *Dothiorella* spp. Takođe, opisan je *Dichomera* sin-aseksualni izgled gljiva *D. sapinea*,

*Dothiorella* sp. 2 i *B. dothidea*, kao i jedinstvene morfološke karakteristike osam nauci poznatih vrsta.

Sa izuzetkom gljiva *S. visci* i *P. cupressi* koje su izolovane iz samo jednog domaćina, sve ostale *Botryosphaeriaceae* vrste izolovane su iz više od jedne biljke domaćina. Gljiva *P. cupressi* bila je prisutna samo u mediteranskom regionu, a gljive *S. visci*, *Dothiorella* sp. 1, *Do. sarmentorum* i *D. seriata* nađene su samo u regionu sa kontinentalnom klimom. Testovi patogenosti izvršeni su na dvedeset stvarnih domaćina ovih gljiva, ali i na *Pinus patula* i *Eucalyptus grandis*.

Gljiva *D. sapinea* izolovana je iz šesnaest biljaka domaćina iz rodova *Abies*, *Cedrus*, *Chamaecyparis*, *Juniperus*, *Picea*, *Pinus*, *Pseudotsuga* i *Fagus*. Četiri drvenaste vrste bile su novi domaćini ove gljive na području Balkana, a *D. sapinea* je izolovana po prvi put u svetu iz *Fagus sylvatica*. Testovi patogenosti izvršeni su na biljkama iz kojih je *D. sapinea* izolovana, ali i na *Picea abies*, *Thuja occidentalis*, *Prunus laurocerasus*, *E. grandis* i *P. patula*. Inokulacije su izvršene na sadnicama u prirodnim uslovima u polju, u kontrolisanim uslovima u stakleniku i na izbojcima. Inokulacije *Picea pungens*, *Picea omorika*, *P. abies*, *Pseudotsuga menziesii*, *Abies concolor*, *Pinus nigra* i *Pinus sylvestris* dovele su do sušenja sadnica 5-16 nedelja nakon inokulacije. Gljiva *D. sapinea* proizvela je lezije na sadnicama *Juniperus horizontalis* and *P. patula*, kao i na izbojcima *F. sylvatica*.

Utvrđeno je da gljive *N. parvum* i *D. sapinea* imaju mali diverzitet gena i genotipova, a diverzitet genotipova iznosio je od 2.5 do 2.87 (%) u slučaju gljive *N. parvum* i od 3.5 do 13.5 (%) kada su u pitanju različite populacije gljive *D. sapinea*. Svi genotipovi *D. sapinea* koji su nađeni na domaćinima iz roda *Pinus* spp. bili su isto tako prisutni i na domaćinima iz roda *Cedrus* spp. Utvrđeno je da su CR i MR populacije gljiva *N. parvum* i *D. sapinea* delimično izolovane jedna od druge geografskom barijerom.

Većina gljiva iz familije *Botryosphaeriaceae* identifikovana u ovom istraživanju predstavlja prvi nalaz u svetu na određenom domaćinu i većina ovih gljiva po prvi put je nađena na području Zapadnog Balkana. Inokulacije su pokazale da većina *Botryosphaeriaceae* vrsta može ostvariti infekciju na stvarnim domaćinima ali isto tako može recipročno inficirati i druge biljne vrste. Ovo istraživanje je pokazalo da kako faktori spoljašnje sredine (npr. edafski faktori) tako i gentičke karakteristike samog domaćina najverovatnije utiču na diverzitet, distribuciju i ko-infektivnost gljiva iz familije *Botryosphaeriaceae* na području Zapadnog Balkana. Recipročne inokulacije pokazale su da

gljiva *D. sapinea* nije selektivna u pogledu izbora domaćina i može izazvati bolest i na drvenastim vrstama iz kojih nije izolovana. Ipak, ova gljiva je bila najagresivnija prema nekim drvenastim vrstama iz familije *Pinaceae*. Mali diverzitet gena i izolacija gljiva *N. parvum* i *D. sapinea* iz pretežno alohtonih drvenastih vrsta i egzota ukazali su na to da je najverovatnije reč o introdukovanim gljivama koje su na područje Zapadnog Balkana najverovatnije dospele procesom međunarodne trgovine zaraženim sadnicama ukrasnih drvenastih i žbunastih vrsta. Do nastanjivanja populacija gljive *N. parvum* na području Zapadnog Balkana najverovatnije je došlo nedavno i to “efektom osnivača”, sa osnivačkim individuaama poreklom iz nepoznate izvorne populacije. Populacije gljive *D. sapinea* najverovatnije su kolonizovale i nastanile ovo područje pre nekoliko decenija, sa osnivačima poreklom iz Centralne Evrope ili Severne Amerike. Rezultati ovog istraživanja proširili su naše znanje o distribuciji, privrženosti gljiva iz familije *Botryosphaeriaceae* određenim domaćinima, populacionoj genetici i ulozi gljiva iz familije *Botryosphaeriaceae* u procesu sušenja drvenastih vrsta na području Zapadnog Balkana.

**Ključne reči:** Botryosphaeriales, morfologija, filogenetika, patogeni drveća, privrženost biljci domaćinu, ko-infekcija, invazivni gljivični patogen, populaciona genetika, mikrosatelitski marker, haploidna mreža

**Naučna oblast:** Biotehničke nauke

**Uža naučna oblast:** Zaštita šuma i ukrasnih biljaka

**UDK**

**GDK**

# ***BOTRYOSPHAERIACEAE* SPECIES OCCURRING ON VARIOUS WOODY HOSTS IN SERBIA**

## **Abstract**

Extensive die-back and mortality of various trees and shrubs has been observed in parts of the Western Balkans region during the past decade. The disease symptoms have been typical of those caused by fungal pathogens residing in the *Botryosphaeriaceae*. The aims of this study were to 1. isolate and characterize *Botryosphaeriaceae* species associated with diseased trees in Serbia, Montenegro, Bosnia and Herzegovina, 2. consider the host range and distribution of *Botryosphaeriaceae* species, spanning a Mediterranean and a Continental region, 3. consider the host range of *Diplodia sapinea* in Serbia and Montenegro 4. determine genetic diversity and genotype flow between different populations of *Neofusicoccum parvum* and *D. sapinea* from Serbia and Montenegro.

Isolates were initially characterized based on the DNA sequence data for the internal transcribed spacer (ITS) rDNA and six major clades were identified. Representative isolates from each clade were further characterized using DNA sequence data for the translation elongation factor 1-alpha (TEF 1- $\alpha$ ),  $\beta$ -tubulin-2 (BT2) and large subunit (LSU) rRNA gene regions, as well as the morphology of the asexual morphs. *D. sapinea*-like isolates were additionally characterized using TEF 1- $\alpha$ . Genetic diversity and genotype flow of *N. parvum* and *D. sapinea* were determined using DNA sequence data of the ITS region, TEF 1- $\alpha$ , BT2 and microsatellite markers. The relationship between isolates of *D. sapinea* from different hosts was considered using populations from *Cedrus* spp. and *Pinus* spp. The relationships between isolates from environmentally different regions included populations of each species from the Continental (CR) and Mediterranean (MR) regions.

Ten species of the *Botryosphaeriaceae* were identified of which eight, i.e. *Dothiorella sarmentorum*, *Neofusicoccum parvum*, *Botryosphaeria dothidea*, *Phaeobotryon cupressi*, *Sphaeropsis visci*, *Diplodia seriata*, *D. sapinea* and *Diplodia mutila* were known taxa. The remaining two species could be identified only as *Dothiorella* spp. *Dichomera* syn-asexual



morphs of *D. sapinea*, *Dothiorella* sp. 2 and *B. dothidea*, as well as unique morphological characters for a number of the known species are described.

With the exception of *Sphaeropsis visci* and *Phaeobotryon cupressi*, which occurred on one host, all the species had a broader host range. *Phaeobotryon cupressi* was found only in the Mediterranean region and *S. visci*, *Dothiorella* sp. 1, *Do. sarmentorum* and *Diplodia seriata* were present only in the Continental region. Pathogenicity tests were conducted on twenty hosts from which the *Botryosphaeriaceae* were isolated, as well as on *Pinus patula* and *Eucalyptus grandis*.

*Diplodia sapinea* was identified from sixteen hosts in the genera *Abies*, *Cedrus*, *Chamaecyparis*, *Juniperus*, *Picea*, *Pinus*, *Pseudotsuga* and *Fagus*. Four species represented new hosts in the Balkans and this is the first report of *D. sapinea* from *Fagus sylvatica* anywhere in the world. Pathogenicity tests were conducted on the hosts from which *D. sapinea* was isolated, as well as on *Picea abies*, *Thuja occidentalis*, *Prunus laurocerasus*, *E. grandis* and *P. patula*. Inoculations were done on seedlings in the field, in the greenhouse or on cut branches. Inoculations of *Picea pungens*, *Picea omorika*, *P. abies*, *Pseudotsuga menziesii*, *Abies concolor*, *Pinus nigra* and *Pinus sylvestris* resulted in the death of the seedlings 5-16 weeks after inoculation. *Diplodia sapinea* produced lesions on *Juniperus horizontalis* and *P. patula* seedlings and *F. sylvatica* cut branches.

*N. parvum* and *D. sapinea* were shown to have low genetic and genotypic diversity, with the latter values ranging from 2.5 to 2.9 (%) for *N. parvum* and from 3.5 to 13.5 (%) for different populations of *D. sapinea*. All genotypes of *D. sapinea* found on *Pinus* spp. were also present on *Cedrus* spp. The CR and MR populations of each species were found to be partly isolated from one another by a geographical barrier.

Based on host plants and geographic distribution, the majority of *Botryosphaeriaceae* species found represent new records. Inoculations showed that the majority of the *Botryosphaeriaceae* could also co-infect hosts other than those from which they were isolated. The results suggest that a combination of host and environmental factors (e.g. edaphic factors) affect the diversity, distribution and co-infectivity of the *Botryosphaeriaceae* in the Western Balkans. Reciprocal inoculations showed that *D. sapinea* is not host specific, causing disease on tree species from which it was not isolated. The pathogen was, however, most aggressive on some members of the *Pinaceae*. Low genetic diversity and dominance of *N. parvum* and *D. sapinea* on non-native trees suggests that these species have most likely

been introduced into Western Balkans, possibly through the movement of diseased ornamental plants linked to the nursery trade. *N. parvum* populations were most likely established by recent founder events from an unknown source population. *D. sapinea* populations were likely established through earlier colonization events, possibly originating from Central Europe or North America. The results of this study have contributed to our knowledge on the distribution, host associations, population genetics and impacts of these fungi on trees in the Western Balkans.

**Key Words:** Botryosphaerales, morphology, phylogeny, tree pathogens, host pattern, co-infection, invasive fungal pathogen, population genetics, microsatellite, haplotype network

**Scientific field:** Biotechnical sciences

**Scientific discipline:** Protection of forest and ornamental plants

**UDK**

**GDK**

## Sadržaj

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. Opšti uvod .....</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1. <i>Botryosphaeriaceae</i> : taksonomija, filogenetika i identifikacija.....                  | 1         |
| 1.1.1. Taksonomska istorija roda <i>Botryosphaeria</i> i familije <i>Botryosphaeriaceae</i> ..... | 1         |
| 1.1.2. Morphološke karakteristike .....   | 2         |
| 1.1.2.1. Karakteristike seksualnog oblika <i>Botryospaheriaceae</i> .....                         | 2         |
| 1.1.2.2. Karakteristike aseksualnog oblika <i>Botryosphaeriaceae</i> .....                        | 3         |
| 1.1.3. Koncepti vrste.....  | 3         |
| 1.1.4. Molekularna identifikacija.....  | 5         |
| 1.2. <i>Botryosphaeriaceae</i> kao endofiti i patogeni drveća .....                               | 7         |
| 1.2.1. <i>Botryosphaeriaceae</i> kao endofiti i latentni patogeni.....                            | 7         |
| 1.2.2. Infekciona biologija.....  | 7         |
| 1.2.3. Simptomi oboljenja .....   | 8         |
| 1.2.4. Epidemiologija .....   | 9         |
| 1.2.5. Biljke domaćini .....  | 10        |
| 1.2.6. Kontrola.....  | 10        |
| 1.3. Biološka invazija <i>Botryosphaeriaceae</i> gljivama .....                                   | 10        |
| 1.3.1. Populaciona biologija invazivnih vrsta .....   | 11        |
| <b>2. Opšti ciljevi istraživanja .....</b>  | <b>12</b> |
| <b>3. <i>Botryosphaeriaceae</i> na bolesnom drveću u urbanim sredinama Zapadnog</b>               |           |
| <b>Balkana.....</b>   | <b>14</b> |
| 3.1. Uvod .....   | 14        |
| 3.2. Ciljevi istraživanja.....  | 18        |
| 3.3. Materijal i metode.....  | 18        |
| 3.3.1. Sakupljanje uzoraka i izolacija <i>Botryospaheriaceae</i> gljiva.....                      | 18        |
| 3.3.2. DNA ekstrakcija, PCR and sekvenciranje.....  | 24        |
| 3.3.3. Poravnavanje sekvenci i fiologenetske analize .....  | 25        |
| 3.3.4. Morfološka karakterizacija i porast na različitim temperaturama.....                       | 26        |
| 3.3.5. Statističke analize porasta micelije na različitim temperaturama.....                      | 27        |
| 3.4. Rezultati.....   | 27        |
| 3.4.1. <i>Botryosphaeriaceae</i> izolacija i molekularna fiologenetska identifikacija.....        | 27        |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.4.2. Morfološka karakterizacija .....  | 30        |
| 3.4.2.1. Taksonomija .....   | 30        |
| 3.4.3. Porast micelije na različitim temperaturama .....   | 42        |
| 3.5. Diskusija .....   | 44        |
| 3.6. Zaključci .....   | 47        |
| <b>4. Novi i neočekivani domaćini gljive <i>Diplodia sapinea</i> na području Zapadnog Balkana .....</b>  | <b>48</b> |
| 4.1. Uvod .....  | 48        |
| 4.2. Ciljevi istraživanja.....   | 50        |
| 4.3. Materijal i metode.....   | 50        |
| 4.3.1. Sakupljanje uzoraka i izolacija gljive <i>D. sapinea</i> .....  | 50        |
| 4.3.2. Filogenetske analize .....  | 50        |
| 4.3.3. Inokulacije sadnica u polju .....   | 55        |
| 4.3.4. Inokulacije izbojaka.....   | 58        |
| 4.3.5. Inokulacije u stakleniku .....  | 59        |
| 4.3.6. Statističke analize .....   | 59        |
| 4.4. Rezultati.....  | 59        |
| 4.4.1. Sakupljanje uzoraka i izolacija gljive <i>D. sapinea</i> .....  | 59        |
| 4.4.2. Filogenetske analize .....  | 60        |
| 4.4.3. Inokulacije sadnica u polju .....   | 62        |
| 4.4.4. Inokulacije izbojaka.....   | 66        |
| 4.4.5. Inokulacije u stakleniku.....   | 66        |
| 4.4.6. Diskusija i zaključci .....   | 66        |
| <b>5. Prvi nalaz gljive <i>Neofusicoccum parvum</i> uzročnika rupičavosti lišća lovorvišnje (<i>Prunus laurocerasus</i> L.) u Srbiji .....</b> | <b>71</b> |
| 5.1. Uvod .....  | 71        |
| 5.2. Ciljevi istraživanja.....   | 71        |
| 5.3. Materijal i metode.....   | 73        |
| 5.4. Rezultati i diskusija .....   | 74        |
| <b>6. Novi domaćini ko-inficirajućih <i>Botryosphaeriaceae</i> na ukrasnom i šumskom drveću na području Zapadnog Balkana.....</b>              | <b>76</b> |
| 6.1. Uvod .....  | 76        |

|   |            |
|---|------------|
| 6.2. Ciljevi istraživanja .....   | 78         |
| 6.3. Materijal i metode .....   | 78         |
| 6.3.1. Sakupljanje uzoraka i izolacija <i>Botryosphaeriaceae</i> gljiva .....   | 78         |
| 6.3.2. Tipovi klime .....   | 79         |
| 6.3.3. Analize DNA sekvenci .....   | 79         |
| 6.3.4. Analize diverziteta <i>Botryosphaeriaceae</i> gljiva .....   | 80         |
| 6.3.5. Inokulacije sadnica u polju .....  | 80         |
| 6.3.6. Inokulacije izbojaka i listova .....   | 83         |
| 6.3.7. Inokulacije u stakleniku .....   | 86         |
| 6.3.8. Statističke analize .....  | 86         |
| 6.4. Rezultati .....  | 86         |
| 6.4.1. Simptomi bolesti .....   | 86         |
| 6.4.2. Izolacija <i>Botryosphaeriaceae</i> gljiva .....   | 90         |
| 6.4.3. Analize DNA sekvenci .....   | 90         |
| 6.4.4. Analize diverziteta <i>Botryosphaeriaceae</i> gljiva .....   | 93         |
| 6.4.5. Inokulacije sadnica u polju .....  | 102        |
| 6.4.6. Inokulacije izbojaka i listova .....   | 111        |
| 6.4.7. Inokulacije u stakleniku .....   | 115        |
| 6.5. Diskusija .....  | 115        |
| 6.6. Zaključci .....  | 119        |
| <b>7. Genetička uniformnost karakteriše invazivno širenje gljiva <i>Neofusicoccum parvum</i> i <i>Diplodia sapinea</i> na području Zapadnog Balkana .....</b> | <b>120</b> |
| 7.1. Uvod .....   | 120        |
| 7.2. Ciljevi istraživanja .....   | 122        |
| 7.3. Materijal i metode .....   | 122        |
| 7.3.1. Izolati gljiva .....   | 122        |
| 7.3.2. DNA ekstrakcija, amplifikacija mikrosatelitskim-PCR i genotipovanje .....  | 123        |
| 7.3.3. Molekularno kloniranje .....   | 126        |
| 7.3.4. Mikrosatelitske analize .....  | 127        |
| 7.3.5. Statističke analize .....  | 128        |

|   |            |
|---|------------|
| 7.3.6. Haploidne mreže .....  | 128        |
| 7.4. Rezultati .....  | 129        |
| 7.4.1. Genetički i genotipski diverzitet gljive <i>N. parvum</i> .....  | 129        |
| 7.4.2. Genetički i genotipski diverzitet gljive <i>D. sapinea</i> .....   | 132        |
| 7.4.3. Haploidne mreže .....  | 138        |
| 7.4.4. Filogeografske veze sa haplotipovima izvan teritorije Zapadnog Balkana .....   | 139        |
| 7.5. Diskusija .....  | 142        |
| 7.6. Zaključci .....  | 145        |
| <b>8. Generalni zaključci .....</b>   | <b>146</b> |
| <b>9. Literatura.....</b>   | <b>148</b> |
| <b>10. Prilozi .....</b>  | <b>172</b> |
| 10.1. Prilozi: Poglavlje 3.....   | 172        |
| 10.1.1. Tabela S1. Drveće i žbunje uzorkovano u ovom istraživanju .....   | 172        |
| 10.1.2. Tabela S2. Dimenzije spermacija i hlamidospora <i>Botryosphaeriaceae</i><br>vrsta.....  | 173        |
| 10.2. Prilozi: Poglavlje 6 .....  | 174        |
| 10.2.1. Tabela S3. Drveće i žbunje uzorkovano u ovom i predhodnim istraživanjima ...  | 174        |
| 10.2.2. Tabela S4. Izolati korišćeni u filogenetskim analizama .....  | 175        |
| 10.3. Prilozi: Poglavlje 7.....   | 186        |
| 10.3.1. Tabela S5. Izolati gljiva <i>Diplodia sapinea</i> i <i>Neofusicoccum parvum</i> analiziranih<br>u ovom istraživanju.....  | 186        |
| 10.3.2. Tabela S6. Preklapanje multilokusnih genotipova (MLG) koji se odnose na<br>različite domaćine gljiva <i>Neofusicoccum parvum</i> i <i>Diplodia sapinea</i> .....          | 192        |
| 10.3.3. Tabela S7. Izolati <i>Diplodia sapinea</i> i <i>Neofusicoccum parvum</i> preuzeti<br>iz Banke Gena i korišćeni za konstrukciju haploidnih mreža.....                      | 193        |
| 10.3.4. Tabela S8. Patogenost and agresivnost različitih genotipova gljiva<br><i>Neofusicoccum parvum</i> i <i>Diplodia sapinea</i> inokulisanih u sadnice različitih vrsta ..... | 197        |

# 1. Opšti uvod

## 1.1. *Botryosphaeriaceae*: taxonomija, filogenetika i identifikacija

### 1.1.1. Taksonomska istorija roda *Botryosphaeria* i familije *Botryosphaeriaceae*

Rod *Botryosphaeria* Ces. & De Not. uveden je 1863 (Cesati and De Notaris 1863). Bazira se na tipskoj vrsti *Botryosphaeria dothidea* (Moug. : Fr.) Ces. & De Not. Od kako je rod *Botryosphaeria* uveden, pozicija ovog roda predmet je brojnih taksonomskih promena i kontraverzi, kako je rezimirano u radu Phillips i sar. (2013). Theissen i Sydow (1915) svrstali su rod *Botryosphaeria* u familiju *Botryosphaerieae*, sub-familiju familije *Pseudosphaeriaceae* a Theissen (1916) je familiju *Pseudosphaeriaceae* svrstao u red Myriangiales. Ipak, Theissen i Sydow (1917) bili su mišljenja da *Pseudosphaeriaceae* treba ujediniti sa *Dothideaceae* (Dothideales) jer *Dothideaceae* sadrži multilokularne morfološke forme slične onima iz roda *Botryosphaeria*. Tako su Theissen i Sydow (1918) oformili sub-klasu Dothideineae koja je sadržala red Pseudosphaeriales, familiju *Botryosphaeriaceae*, i rod *Botryosphaeria*. Petrak (1923) je odbacio klasifikaciju Theissen i Sydow i postavio rod *Botryosphaeria* u sub-familiju *Pseudosphaerieae* (*Pleosporaceae*: Sphaeriales).

Miller (1928) je postavio rod *Botryosphaeria* (*Pseudosphaeriaceae*) u red Dothideales jer je ovaj red sadržao askostromatične peritecije bez parafiza nasuprot pravim peritecijama i parafizama roda *Sphaeriales*. Miller (1938) je zadržao rod *Botryosphaeria* u familiji *Pseudosphaeriaceae*, ali je prabacio ovu familiju u red Pseudosphaeriales. Luttrell (1955) je promenio naziv Pseudosphaeriales u Pleosporales i smestio rod *Botryosphaeria* u Pleosporales. Ipak, Von Arx i Müller (1975) su stavili rod *Botryosphaeria* u familiju *Botryosphaeriaceae*, red Dothideales koji je sadržao sve bitunikatne askomicete.

Konačno, na osnovu multigeneske filogenetike male pod-jedinice (SSU), velike pod-jedinice rRNA gena (LSU), translacionog elongacionog faktora 1-alpha (TEF1- $\alpha$ ) i RNA polimeraze druge velike podjedinice (RPB2) Schoch i sar. (2006) zadržali su rod *Botryosphaeria* u familiji *Botryosphaeriaceae*, ali su postavili familiju u novi red Botryosphaeriales.

Familija *Botryosphaeriaceae* je najpre sadržala tri roda, i to rodove *Botryosphaeria*, *Phaeobotryon* i *Dibotryon* (Theissen i Sydow 1918), ali su vremenom u ovu familiju uključeni i dodatni rodovi. Na primer, Damm i sar. (2007) su dodali rod *Aplosporella* u

Botryosphaeriaceae, dok su Rojas i sar. (2008) pokazali da je rod *Endomelanconiopsis* isto tako deo ove familije. Phillips i Alves (2009) su prepoznali rod *Melanops* kao deo familije *Botryosphaeriaeae*. Wikee i sar. (2013) su prebacili rod *Phyllosticta* (= *Guignardia*) u familiju *Phyllostictaceae*, dok su Slippers i sar. (2013) uveli nove familije za rodove *Saccharata* (*Saccharataceae*), *Melanops* (*Melanopsaceae*), *Aplosporella* and *Bagnisiella* (*Aplosporellaceae*). Slippers i sar. (2013) prepoznali su 17 rodova u familiji *Botryosphaeriaceae*. Ipak, Crous i sar. (2015) uveli su četiri nova roda i prebacili *Tiarosporella*-slične gljive u rod *Darkera*, rod koji sadrži gljive prouzrokovaoče bolesti četina. *Botryosphaeriaceae* trenutno čini 21 rod, i to *Barriopsis*, *Botryobambusa*, *Botryosphaeria* (= *Fusicocccum*, uklj. *Dichomera*), *Cophinforma*, *Dothiorella*, *Diplodia*, *Endomelanconiopsis*, *Lasiodiplodia* (uklj. *Auerswaldia*, *Macrovalsaria*), *Macrophomina*, *Neodeightonia*, *Neofusicocccum* (uklj. *Dichomera*), *Neoscytalidium*, *Phaeobotryon*, *Phaeobotryosphaeria*, *Pseudofusicocccum*, *Spencermartinsia*, *Tiarosporella*, *Eutiarosporella*, *Marasasiomyces*, *Mucoharknessia* i *Sakireeta* (Fungi: Ascomycota: Pezizomycotina: Dothideomycetes: Botryosphaeriales).

## 1.1.2. Morfološke karakteristike

### 1.1.2.1. Karakteristike seksualnog oblika *Botryosphaeriaceae*

Peritecije *Botryosphaeriaceae* vrsta mogu se javiti u formi jednolokularnih ili multilokularnih struktura. Unilokularne forme mogu se javiti pojedinačno ili kao agregati (“botryose klasteri”) više peritecija koje se često nalaze delimično uronjene u bazalnu stromu. Sadržaj ovih peritecija je, kada se preseče, obično bele boje. Peritecije su tipične za *Loculoascomycetes* i u njima se askusi formiraju unutar lokula koje su uronjene u stromu. Tkiva strome su tipa *textura angularis* i čine ih braon, debelozidne ćelije. Zidove čini pet do 30 ćelija ili više. Lokule su obložene tankozidnim, hijalinskim ćelijama. Centrum je tipa *Pleospora*, a između askusa se nalaze pseudoparafize. Askusi su bitunikantni sa tankom ektotunikom i debelom endotunikom. Oni su širi u osnovi a sužavaju se ka vrhu, nekada cilindrični, često sa kratkom drškom. Askospore se nasilno izbacuju “Jack-in-the-box” procesom pri čemu ektotunika uzdužno puca, a endotunika se izdužuje izbacujući spore.

Askospore mogu biti hijalinske, aseptirane, glatke, ali mogu postati obojene, 1–2-septirane i hrapave sa starenjem. Mogu imati i apikulus na jednom ili oba kraja. Zidovi su tanki, ali kod vrsta sa *Diplodia* aseksualnim izgledom mogu biti i umerene debljine. Njihov



oblik može biti fuziforman ili ovoidan. Pseudoparafize su hifama-slične, hijalinske, tankozidne, septirane i razgranate (Phillips i sar. 2013).

### **1.1.2.2. Karakteristike aseksualnog oblika *Botryosphaeriaceae***

Plodonosna tela mogu biti unilokularna, piknidijska ili multilokularna. Ona su stromatična i piknidijska šupljina se formira u stromi. Kada su prisutni, konidiofori su hijalinski, tankozidni, većinom cilindrični, ponekad razgranati i septirani. Prva konidija formira se holoblastično. Naredne konidije formiraju se unutrašnjom proliferacijom konidiogenih ćelija koja rezultuje pojavom periklinalnih zadebljanja, ili perkurentnom proliferacijom koja daje anelide. Konidiogene ćelije su hijalinske, tanko-zidne, sa glatkim zidovima, izduženo cilindrične, kratko lageniformne ili ampuliformne.

Konidije mogu biti tankozidne, uske i *Fusicoccum*-slične ili debelozidne, šire, hijalinske ili braon obojene, *Diplodia*-slične. Tankozidne, *Fusicoccum*-slične konidije mogu biti fusiformne, ovoidne ili eliptične, hijalinske, aseptirane i mogu postati braon sa starenjem. Mogu postati i septirane i obojene ili samo centralna ćelija može postati obojena. *Diplodia*-slične konidije mogu biti aseptirane, 1-septirane ili multiseptirane, većinom ovoidne, sa spoljne strane glatke, sa unutrašnje strane hrapave, kod *Lasiodiplodia* vrsta uzdužno brazdaste. Kod *Diplodia* vrsta, konidije obično ostaju hijalinske ili mogu postati braon i septirane, ali tek nakon što budu izbačene iz plodonosnog tela. Nasuprot, kod *Dothiorella* vrsta konidije mogu postati obojene često dok se još uvek nalaze na konidiogenim ćelijama. Konidije sa *Dichomera* sinaseksualnim izgledom su obojene, muriformne, a *Neoscytalidium* vrste imaju suve, praškaste konidije koje nastaju u arktičkim lancima. Parafize su hijalinske i ponekad proširene na vrhu. Spermiospore su hijalinske, većinom cilindrične sa zaobljenim krajevima (Phillips i sar. 2013).

### **1.1.3. Koncepti vrste**

Definisanje “vrste” od ključne je važnosti ne samo za razumevanje procesa i mehanizma specijacije, već i za kontrolu bolesti i biljni karantin. Različiti koncepti vrste, i to morfološki, biološki, ekološki i filogenetski korišćeni su pri identifikaciji gljiva (Harrington i Rizzo 1999; Taylor i sar. 2000). Najrevolucionarnijom promenom u konceptu vrste smatra se analiza DNA sekvenci koja je, sa otkrićem lančane reakcije polimerazom (PCR) postala široko prihvaćena u procesu identifikacije vrsta 1980-ih godina prošlog veka (Berlocher 1998). Važna posledica

primene PCR metoda pri identifikaciji gljivičnih vrsta bilo je otkriće postojanja velikog broja kriptičnih vrsta unutar predhodno opisanih taksona, izdvojenih na osnovu morfoloških karakteristika.

U upotrebi su bila dva osnovna koncepta za razdvajanje vrsta u porodici *Botryosphaeriaceae* i oni uključuju morfološki i filogenetski koncept vrste. Morfološki koncept počeo je da se primenjuje 1863 kada su Cesati i de Notaris uveli rod *Botryosphaeria* i taksonomija ovih gljiva bazirala se isključivo na morfologiji. Slabosti morfološkog koncepta vrste ogledaju se u tome da specijacija nije uvek u korelaciji sa morfološkim promenama i morfološki definisane vrste često čini više od jednog taksona (Taylor i sar. 2000). Identifikacija *Botryosphaeriaceae* vrsta bazirana isključivo na morfološkim karakteristikama nije pouzdana jer se morfološke karakteristike pojedinih vrsta preklapaju. Takođe, Slippers i sar. (2013) nedavno su pokazali da morfološke karakteristike predhode nastanku rodova u porodici *Botryosphaeriaceae*, te se zbog toga ne mogu koristiti kao jedino sredstvo za identifikaciju vrsta iz ove porodice.

Biološki koncept vrste, koji se intenzivno primenjuje u taksonomiji drugih gljiva kao što je, na primer *Fusarium fujikuroi* kompleks vrsta i *Armillaria* spp. (Leslie 1995; Keča i sar. 2014), nikada nije bio primenjen na porodicu *Botryosphaeriaceae*, jer ove gljive retko proizvode seksualna plodnosna tela u kulturi. Nasuprot, ekološki koncept vrste često se primenjuje pri identifikaciji *Botryosphaeriaceae* vrsta. Koncept jedan domaćin-jedna gljiva često se kombinuje sa morfološkom karakterizacijom *Botryosphaeriaceae* vrsta (Cesati i de Notaris 1863; Saccardo 1877, 1882; Denman i sar. 2000; Phillips i sar. 2013). Ovaj pristup, ipak, nije praktičan, jer se brojne *Botryosphaeriaceae* vrste javljaju na velikom broju domaćina, npr. *Neofusicoccum parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips i *B. dothidea* (Phillips i sar. 2013).

Upotreba poređenja DNA sekvenci u identifikaciji *Botryosphaeriaceae* vrsta započeta je radom Jacobs i Rehner (1998). Ovi autori su kombinovali morfološke karakteristike sa ITS sekvencama. Upotreba filogenetskog koncepta vrste pri identifikaciji *Botryosphaeriaceae* vrsta u širokoj je upotrebi (npr. Zhou i Stanosz 2001; Phillips i sar. 2005; Alves i sar. 2006; Jami i sar. 2012; Crous i sar. 2015). Filogenetski pristup označen kao “genealogical concordance phylogenetic species recognition” (GSPCR) najčešće se koristio za identifikaciju *Botryosphaeriaceae* vrsta (npr. Pavlic i sar. 2009; Jami i sar. 2012). Oslanjajući se na podudarnost nevezanih genskih genologija, ovaj metod eliminiše ograničenja primene

filogenetskih analiza pojedinačnih gena (Taylor i sar. 2000). Ovaj metod je najpre korišćen u istraživanjima *Botryosphaeriaceae* vrsta od strane de Wet i sar. (2003). Ovi autori su koristili delimične sekvence šest gena koji kodiraju proteine i šest mikrosatelitskih lokusa kako bi utvrdili filogenetske veze među izolatima *Diplodia sapinea* (Fr.) Fuckel koji predstavljaju A, B i C predhodno opisane morfotipove ove gljive. GCPSR koncept pokazao je da su izolati B morfotipa genetički udaljeni od *D. sapinea* i ovaj morfotip je zatim prepoznat kao nova vrsta opisana pod nazivom *Diplodia scrobiculata* J. de Wet, Slippers & M.J. Wingf. (de Wet i sar. 2003). Ovo je bila prva vrsta u familiji *Botryosphaeriaceae* prepoznata na osnovu multi-lokusnih sekvenci i primene GCPSR.

#### 1.1.4. Molekularna identifikacija

Geni koji kodiraju jedarne i mitohondrijalne RNA gene i njihove intergenske prostore široko se koriste u filogenetskoj identifikaciji vrste. ITS region najčešće se koristi pri identifikaciji *Botryosphaeriaceae* vrsta. Tri sublokusa ITS regiona imaju različitu brzinu evolucije: izuzetno varijabilan ITS1, konzervativan 5.8S gen i varijabilan ili delimično konzervativan ITS2 (Hershkovitz i Lewis 1996). Dva intergenska regiona (ITS1 i ITS2) su transkribovani ali ne kodiraju genski product i evoluiraju brže u odnosu na ribozomalne genske podjedinice (Geiser 2004). Korišćenje samo ITS sekvenci pri identifikaciji *Botryosphaeriaceae* vrsta može biti problematično, jer je ITS region često suviše konzervativan da bi razdvojio vrste i evoluirao sporo (Pavlic i sar. 2009; Slippers i sar. 2013; Phillips i sar. 2013). Upravo iz ovog razloga, ITS region se često koristi kao prvi korak u molekularnoj identifikaciji *Botryosphaeriaceae* vrsta, a još jedan ili nekoliko gena se dodaju radi precizne identifikacije do nivoa vrste. Kao dodatak ITS regionu, delovi gena koji kodiraju proteine, a bogati su intronima npr. TEF 1- $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin-2 (BT2), RPB2 i drugi lokusi neophodni su da bi se obezbedio ubedljiv dokaz multigenske filogenetske podudarnosti pri identifikaciji *Botryosphaeriaceae* vrsta, naročito onih koje čine komplekse vrsta, kakav je npr. *Neofusicoccum parvum*-*N. ribis* kompleks (Pavlic i sar. 2009; Sakalidis i sar. 2011; Slippers i sar. 2013; Phillips i sar. 2013). Geni koji kodiraju proteine se koriste jer njihovi introni evoluiraju brže od introna ITS regiona. Dodatni lokusi koji se koriste u multigenskim filogenetskim analizama jesu mtSSU, LSU, aktin, calmodulin, hitin, gliceraldehid-6-fosfat dehidrogenaza, histon-3 i "heat shock" protein (Zhou i Stanosz 2001; de Wet i sar. 2003; Inderbitzin i sar. 2010). Upotreba većeg broja lokusa pri identifikaciji *Botryosphaeriaceae* vrsta danas se smatra neophodnom i rutinskom procedurom.

Iako je primena većeg broja genskih regiona standardna procedura za identifikaciju *Botryosphaeriaceae* vrsta, često se koriste i drugi metodi. Na primer, isoenzimi, slučajno amplifikovani polimorfni DNA markeri (RAPD) i markeri internih jednostavnih ponavljajućih sekvenci (ISSR) koristili su se za istraživanja morfotipova *D. sapinea* i pri identifikaciji *Botryosphaeria* vrsta (Stanosz i sar. 1999; Smith i Stanosz 2001; Zhou i sar. 2001). De Wet i sar. (2003) koristili su markere jednostavnih ponavljajućih sekvenci (SSR) (u kombinaciji sa šest gena koji kodiraju proteine) da bi izdvojili novu vrstu iz roda *Diplodia*. Microsatelitski markeri takođe su se često pokazali korisnim pri razdvajanju kriptičnih vrsta iz *N. parvum-N. ribis* kompleksa (Pavlic i sar. 2009). Tehnike kakve su npr. lančana reakcija polimerazom (PCR), polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata (RFLP) često su korišćene pri identifikaciji *Botryosphaeriaceae* vrsta. Na primer, Slippers i sar. (2004b) koristili su *CfoI* digestiju SSR lokusa (BotF15) da razdvoje kriptične vrste unutar *N. parvum-N. ribis* kompleksa. Alves i sar. (2005) koristili su metodu amplifikovane ribozomalne DNA restrikcione analize (ARDRA) da bi identifikovali dvanaest *Botryosphaeriaceae* vrsta. Alves i sar. (2007) osmislili su mikrosatelitsku reakciju polimerazom (MSP-PCR) i koristili metode lančane reakcije polimerazom ponavljajućih sekvenci (rep-PCR) za brzu identifikaciju *Botryosphaeriaceae* vrsta. Ridgway i sar. (2011) koristili su jednolančani konformacioni polimorfizam (PCR-SSCP) za identifikaciju *Botryosphaeriaceae* vrsta prisutnih u zamkama sa vodom koje su bile postavljene u vinogradu na Novom Zelandu. Ni i sar. (2012) koristili su ugnježdeni multipleks PCR za vrsta-specifičnu identifikaciju i detekciju *Botryosphaeriaceae* vrsta koje se javljaju na *Magnifera indica*. Martin i sar. (2013) koristili su markere amplifikovanog polimorfizma dužine fragmenata (AFLP) za identifikaciju *Diplodia seriata* De Not., *Phaeomoniella chlamydospora* (W.Gams, Crous, M.J. Wingf. & Mugnai) Crous & W. Gams i *Phaeoacremonium aleophilum* W.Gams, Crous, M.J. Wingf. & Mugnai, tri glavne *Botryosphaeriaceae* vrste uključene u proces sušenja vinove loze u Španiji. Baskarathevan i sar. (2013) koristili su lančanu reakciju polimerazom sa univerzalnim prajmerima (UP-PCR) da razdvoje *N. parvum* i *Neofusicoccum luteum* vrste (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips. Varga i sar. (2014) koristili su direktni PCR (diPCR) pristup da amplificiraju ITS rRNA gen direktno iz malih količina uzoraka gljive bez prethodne DNA ekstrakcije. Ovaj pristup omogućio je, na primer brzu identifikaciju *Sphaeropsis visci* (Alb. & Schwein.) Sacc., patogena koji izaziva bolest lišća evropske imele (*Viscum album*). Abdollahzadeh i Zolfaghari (2014) pokazali su da rep-PCR može biti efikasan metod za detekciju i izdvajanje

*Botryosphaeriaceae* vrsta, naročito kriptičnih vrsta sa istim ITS sekvencama i sličnim morfološkim karakteristikama.

## **1.2. *Botryosphaeriaceae* kao endofiti i patogeni drveća**

### **1.2.1. *Botryosphaeriaceae* kao endofiti i latentni patogeni**

Vrste iz familije *Botryosphaeriaceae* mogu biti primarni patogeni, endofiti i saprofiti na mrtvom drvetu i drugom biljnom materijalu (Slippers i Wingfield 2007; Mehl i sar. 2013). Kriptični i važni aspekt njihovog životnog ciklusa jeste njihova sposobnost da egzistiraju kao endofiti i latentni patogeni u tkivu domaćina. Endofit je organizam koji može živeti u domaćinu, a da mu ne nanosi štetu, a endofitne gljive su one koje se mogu izolovati iz tkiva zdrave biljke (Slippers i Wingfield 2007; Mehl i sar. 2013). *Botryosphaeriaceae* vrste su po prvi put prepoznate kao endofiti kada su Petrini i Fisher (1988) izolovali *D. sapinea* iz zdravih stabala *Pinus sylvestris*. Prema Rodriguez i sar. (2009), *Botryosphaeriaceae* predstavljaju endofite koji pripadaju klasi III. Ovi endofiti mogu se definisati kao: “non-clavicipitaceous” endofiti koji imaju širok krug domaćina, javljaju se u izbojcima biljaka, imaju ograničenu *in planta* kolonizaciju, veliki *in planta* biodiverzitet, rastu intercelularno i prenose se horizontalno. Endofiti klase III kakve su npr. *Botryosphaeriaceae* vrste postaju patogeni kada domaćin dospe u stanje stresa (Slippers i Wingfield 2007).

### **1.2.2. Infekciona biologija**

*Botryosphaeriaceae* mogu inficirati stablo kroz prirodne otvore (npr. stome na lišću i izbojcima, lenticele na plodovima ili stablu, cvasti, peteljke voćkarica) ili kroz rane. Rane mogu biti one koje su rezultat ljudskih aktivnosti (npr. orezivanje, ručno branje voća, kalemljenje), oštećenja od vetra, mraza ili grada ili se mogu javiti kada pupoljci, peteljke i voće sazrevaju (Michaillides 1991; Swart i Wingfield 1991; Slippers i Wingfield 2007; Mehl i sar. 2013). Nakon što *Botryosphaeriaceae* prodru u tkivo domaćina ove gljive egzistiraju kao endofiti unutar asimptomatične biljke. Iako neke *Botryosphaeriaceae* vrste mogu biti primarni patogeni, simptomi bolesti tipično se javljaju nakon što su stabla izložena stresu (npr. poplave, visoke temperature, suša) (Slippers i Wingfield 2007; Bihon i sar. 2011b; Mehl i sar. 2013). Na primer, stres od vlage uzrokuje stres od nedostatka hranljivih materija, jer je biljkama potrebna voda kako bi transportovale hranljive materije do svih delova biljke. Stres od vlage ometa i mehanizam odbrane biljke od patogena npr. onemogućavajući formiranje periderma rane,

inhibiciju proizvodnje odbrambenih jedinjenja dovodeći do nedostatka turgiteta i redukcije vodnog potencijala ksilema koji predisponira stablo pojavi bolesti (Paoletti i sar. 2001; Mehl i sar. 2013).

Infekcija tkiva domaćina od strane *Botryosphaeriaceae* vrsta generalno zahteva prisustvo slobodne vode. Infekcioni proces počinje klijanjem konidija, a inicijalne hife se mogu pojaviti sa jedne ili obe strane konidija. Nakon što su inicijalne hife prodrle u tkivo domaćina, *Botryosphaeriaceae* mogu da rastu intercelularno, a process infekcije ovih gljiva odstupa od njihove striktno klasifikacije kao endofita klase III. Nakon što *Botryosphaeriaceae* vrste prodru u tkivo domaćina kroz stome, one proizvode apresorijumu-slične mase hifa u otvoru stome i micelija koja je poreklom iz ove mase raste pravo u mezofil. U listovima, micelija kolonizuje uljane ćelije. Kao posledica toga, dolazi do formiranja piknida i oni zatim izbijaju na površinu epidermisa (Brookhouser i Peterson 1970; Mehl i sar. 2013).

Odgovor biljke domaćina na infekciju *Botryosphaeriaceae* vrsta ogleda se u formiranju brojnih barijera. Na primer, parenhimatične ćelije formiraju novi periderm koga čini tri do pet sloja odrvenelih parenhimatičnih ćelija. Uloga ovog periderma jeste da spreči prodor *Botryosphaeriaceae* vrsta u dublje slojeve biljnog tkiva. Ipak, zbog enzimatične aktivnosti *Botryosphaeriaceae* koja im omogućava da razgrade ćelije epidermisa, hife često uspevaju da prodru u primarni floem i vaskularni kambijum. Kao posledica toga, ova tkiva postaju nekrotična i urušavaju se stvarajući šupljine, a i parenhimatične ćelije se urušavaju i proizvode velike šupljine ispunjene micelijom. Korteks se takođe urušava i postaje ispunjen vodenom substancom, periderm se širi a ubrzo zatim i puca, stvarajući rak ranu (Brown i Hendrix 1981; Mehl i sar. 2013). Nakon što je micelija *Botryosphaeriaceae* vrsta dospela u korteks, ona prodire u ksilem kroz zrake ksilema. Sprovodni sudovi ksilema postaju ispunjeni micelijom i tilozama koje delimično ili potpuno blokiraju sudove. Micelija zatim brzo raste kroz sprovodne sudove zbog obilja hranljivih materija (Milholland 1972; Ramos i sar. 1991; Mehl i sar. 2013).

### **1.2.3. Simptomi oboljenja**

Infekcija *Botryosphaeriaceae* vrstama dovodi do pojave brojnih simptoma oboljenja i oni uključuju rak rane i odumiranje izbojaka, grana i stabla sa vrha, nekrozu, žutilo i posmeđivanje lišća, hlорозу, obojavanje beljike, trulež korena i rak rane na korenu, plavetnilo, sušenje cvetova, trulež voća, onemogućavanje procesa formiranja semena, poleganje ponika i potpuno sušenje stabala (Slippers i Wingfield 2007; Mehl i sar. 2013).

#### 1.2.4. Epidemiologija

*Botryosphaeriaceae* vrste mogu prezimeti kao endofiti ili saprofiti na različitim supstratima i to na otpadcima od rezanja grana, izbojcima, pupoljcima, lisne peteljka, mumificiranom voću, cvetovima, cvastima (Michailides 1991). *Botryosphaeriaceae* obično sazrevaju i obrazuju plodnosna tela na mrtvom biljnom tkivu (Arx i Muller 1954; Sivanesan 1984). Konidije se proizvode u većem broju u odnosu na askospore i smatraju se primarnim izvorom unokuluma (Sutton 1981). One se tipično izbacuju iz piknida u vidu želatinozne smese oblika crvuljka u periodima velike relativne vlažnosti vazduha (Michailides i Morgan 1993; Urbez-Torres i sar. 2010). Želatinozna smesa sadrži glicide i proteine i veruje se da sprečava isušivanje konidija (Fitt i McCartney 1986). Rasejavanje konidija povezano je sa kišnim padavinama, preteranim zalivanjem, kišom praćenom vetrom, inficiranim alatom za orezivanje i insektima (Swart i sar. 1987a; Urbez-Torres i sar. 2010; Mehl i sar. 2013). Generalno, smatra se da je voda neophodna za rasejanje konidija na kraće distance na jednom stablu ili u okviru plantaže. Smatra se da je vetar najvažniji faktor u rasejanju askospora na velike distance i širenju bolesti (Sutton 1981). Ipak, seksualni oblici *Botryosphaeriaceae* vrsta retko se mogu naći u prirodi i askospore se generalno proizvode u mnogo manjem broju nego konidije (Michailides i sar. 2001; Mehl i sar. 2013). Oslobođanje spora, klijanje i njihova sposobnost da inficiraju biljku domaćina u mnogome zavise od temperature. Slično rasejanju spora, infektivni proces veoma zavisi od temperature i vlage. Generalno, topli, vlažni uslovi povoljni su za proces infekcije i razvoj bolesti *Botryosphaeriaceae* gljiva. Primarne infekcije javljaju se u rano proleće i leto, a sekundarne infekcije u kasno leto i jesen (Michailides i Morgan 1993).

#### 1.2.5. Biljke domaćini

*Botryosphaeriaceae* generalno mogu kolonizovati i inficirati veliki broj domaćina uključujući i golosemenice i skrivenosemenice. Ove gljive se mogu naći u različitim sredinama širom sveta (Slippers i Wingfield 2007; Phillips i sar. 2013). Prema filogenetskim analizama može se zaključiti da su *Botryosphaeriaceae* vrste najpre evoluirale na golosemenicama i tek nakon toga kolonizovale skrivenosemenice (de Wet i sar. 2008; Slippers i sar. 2013). Većina pripadnika ove familije, npr. *B. dothidea* i *N. parvum* imaju širok areal rasprostranjenja i krug domaćina (Phillips i sar. 2013).

### 1.2.6. Kontrola

Postupci koji minimiziraju ili sprečavaju infekciju *Botryosphaeriaceae* vrsta najvažniji su način kontrole ovih gljiva. Oni uključuju minimalno izlaganje biljke stresu kroz npr. podudarnost staništa i vrste, odgovarajuću gustinu sadnje, dezinfekciju oruđa za orezivanje, eliminaciju susjednih biljaka koje su potencijalni izvor inokuluma, tretiranje zemljišta radi uklanjanja inokuluma u vidu inficiranih biljnih otpadaka i zatvaranje rana fungicidnom pastom. Fungicidi su se pokazali kao neefikasno sredstvo u kontroli *Botryosphaeriaceae* vrsta. Eksperimentalna istraživanja su pokazala da su različiti fungicidi bili efikasni *in vitro*, ali su bili neefikasni *in vivo* zbog prisustva gljivičnih hifa u sprovodnim sudovima (Peterson 1977; Palmer i sar. 1986; Hartman i sar. 2009; Mehl i sar. 2013). Njihova primena je takođe i nepraktična jer su se brojne *Botryosphaeriaceae* vrste i genotipovi mogli naći kako ko-egzistiraju unutar istog stabla (npr. Bihon i sar. 2011a). Ipak, preventivni fungicidi mogu se koristiti za zaštitu mladih biljaka u rasadnicima (Swart i Wingfield 1991).

Od naročite važnosti za šumarstvo jeste činjenica da endofiti, uključujući i one koji pripadaju klasi III, kakve su *Botryosphaeriaceae* vrste, generalno nisu na spisku “karantinskih” patogeno. Biljni material (uključujući sadnice rasadničkog materijala, seme i reznice) može biti asimptomatičan, a opet kolonizovan *Botryosphaeriaceae* vrstama i “zdravi” material na taj način može dospeti u različite države i kontinente. Sposobnost *Botryosphaeriaceae* vrsta da kolonizuju različite domaćine i izazovu bolest, naglašava neophodnost njihovog uključivanja na spisak karantinskih vrsta (Slippers i Wingfield 2007; Wingfield i sar. 2015).

### 1.3. Biološka invazija *Botryosphaeriaceae* gljivama

Invazivni šumski patogeni širom sveta ugrožavaju zdravlje šume i biodiverzitet. Sa porastom globalizacije, introdukcija šumskih patogeno u područja izvan njihovog prirodnog areala porasla je eksponencijalno (Brasier 2008; Santini i sar. 2013). *Botryosphaeriaceae* vrste su patogeni generalisti, široko su rasprostranjene i smatra se da su porast međunarodne trgovine sadnicama i drvetom omogućile ovim gljivama da “putuju” sa njihovim domaćinima u latentnoj fazi (Burgess i sar. 2004; Slippers i Wingfield 2007; Bihon i sar. 2012a; Sakalidis i sar. 2013; Wingfield i sar. 2015). Invazivni šumski patogeni mogu dovesti do niza štetnih, propratnih efekata i to kroz npr. izlaganje stabala infekciji od strane drugih patogeno oportunisto i štetočina, kakvi su npr. potkornjaci ili kroz uticaj na hidrologiju, rekreaciju, cikluse ugljenika i azota (Brasier 2008; Stenlid i sar. 2011; Mitchell i sar. 2014).



### 1.3.1. Populaciona biologija invazivnih vrsta

Proces invazije koji rezultuje unošenjem alohtonog patogena u novu sredinu po pravilu prati niz događaja. Oni uključuju introdukciju ili dospeće u novu sredinu, početnu kolonizaciju, naseljavanje i zatim širenje patogena na nova područja (Stenlid i sar. 2011). Veliki genetički diverzitet populacije patogena obično ukazuje na populaciju sa seksualnom reprodukcijom, autohtonu populaciju ili populaciju “starosedelaca” (McDonald i Linde 2002; Dean i Ballard 2004). Nasuprot, novo formirane invazivne populacije i populacije na frontu epidemije obično karakteriše mali genetički diverzitet (Dlugosch i Parker 2007; Gladieux i sar. 2015). Gubitak genetičkog diverziteta povezan je sa naseljavanjem ograničenog broja individua (“efekat osnivača”), “uskim grlom” populacije i genetičkim driftom (Nei 1975; Dlugosch i Parker 2007). Na primer, autohtone populacije *C. parasitica* u Aziji su velikog genetičkog diverziteta u poređenju sa invazivnim populacijama u Severnoj Americi i Evropi (Liu i Milgroom 2007). Očekivanje da osnivačka populacija evoluirala i naglo se adaptira na novu sredinu uprkos malom genetičkom diverzitetu naziva se “genetički paradoks invazija” (Sakai i sar. 2001; Gladieux i sar. 2015). Razlozi za upeh nastanjivanja uprkos malom genetičkom diverzitetu su kompleksni i uključuju prisustvo velikog broja propagula, genetičkog materijala poreklom iz različitih osnivačkih populacija, dostupnost potencijalnih biljaka domaćina i pre-adaptaciju. Pre-adaptacija doprinosi uspehu nastanjivanja populacije kroz, na primer, široku ekološku nišu, u pogledu temperature i spektra domaćina (Desprez-Loustau i sar. 2007; Gladieux i sar. 2015). Tipični primer jesu *Botryosphaeriaceae* vrste koje, nakon što su prvi put unete u neko područje, “skaču” sa alohtonih na autohtone drvenaste vrste koje mogu biti evoluciono udaljene od prvobitnog domaćina i obratno (npr. Burgess i sar. 2006; Perez i sar. 2009; Sakalidis i sar. 2013).

## 2. Opšti ciljevi istraživanja

Gljive iz familije *Botryosphaeriaceae* uključuju vrste koje su važni patogeni šumskog drveća. Ipak, malo se zna o diverzitetu i ekologiji *Botryosphaeriaceae* vrsta na drveću u urbanim sredinama. Projekat na kom se bazira ova disertacija pokrenut je, pre svega, da unapredi naše razumevanje o ulozi *Botryosphaeriaceae* vrsta u procesu odumiranja stabala i žbunja u Srbiji. Simptomatični biljni material je sakupljan u periodu od 2009-2014 u Srbiji, ali isto tako i u susednim zemljama Zapadnog Balkana u kojima je sušenje primećeno i to u Crnoj Gori i Bosni i Hercegovini. Izolacije gljiva većinom su dale *Botryosphaeriaceae*-slične izolate i ciljevi ovog istraživanja bili su da se:

1. Utvrdi identitet *Botryosphaeriaceae* vrsta izolovanih iz ukrasnog drveća sa simptomima sušenja sa vrha, rak ranama i obilnim izlivom smole na području Zapadnog Balkana. Simptomatični material sakupljan je sa velikog broja domaćina širom regiona i gljive su izolovane iz simptomatičnih delova i plodonosnih tela. *Botryosphaeriaceae*-slični izolati karakterisani su i identifikovani poređenjem DNA sekvenci internog transkribovanog prostora (ITS) rDNA, translacionog elongacionog faktora (TEF 1- $\alpha$ ),  $\beta$ -tubulin-2 (BT2) i velike pod jedinice (LSU) rRNA dela gena. Izolati svake vrste su zatim korišćeni za morfološku karakterizaciju i porast na različitim temperaturama (Poglavlje 3).

2. Utvrdi spektar domaćina i distribucija *Botryosphaeriaceae* vrsta na području Zapadnog Balkana. To je postignuto sakupljanjem uzoraka sa obolelih stabala u urbanim sredinama, plantažama, rasadnicima i šumskim sastojinama širom regiona, obuhvativši pri tom i Mediteranski i Kontinentalni region. Određeni broj *Botryosphaeriaceae* izolata korišćen je za recipročne inokulacije na vrstama drveća iz kojih su *Botryosphaeriaceae* vrste izolovane kao i na *Eucalyptus globulus* i *Pinus patula*. Razmotrena je i istovremena pojava pojedinih *Botryosphaeriaceae* vrsta na različitim golosemenicama i skrivenosemenicama, kao i u CR i MR regionu. Takođe, utvrđen je i diverzitet *Botryosphaeriaceae* vrsta unutar jednog stabla ili dela stabla (Poglavlja 4, 5 and 6).

3. Utvrde putevi unošenja i širenja *Neofusicoccum parvum* i *Diplodia sapinea* u Srbiji i Crnoj Gori. Konkretno, cilj ovog istraživanja bio je da se utvrdi genetički diverzitet i diferencijacija između različitih populacija ovih patogena. Ovo je postignuto uz pomoć DNA sekvenci ITS rDNA regiona, TEF 1- $\alpha$ , BT2 gena i mikrosatelitskih markera. Izolati *D. sapinea*

poreklom sa različitih domaćina proučavani su na nivou populacija sa *Cedrus* spp. i *Pinus* spp. Izolati *D. sapinea* i *N. parvum* proučavani su i na nivou populacija iz Kontinentalnog i Mediteranskog regiona, kao i populacija iz urbanih sredina, plantaža, rasadnika i šumskih sastojina (Poglavlje 7).

### 3. *Botryosphaeriaceae* na bolesnom drveću u urbanim sredinama Zapadnog Balkana

#### 3.1. Uvod

Tokom prethodne decenije, zapaženo je intenzivno sušenje i mortalitet raznog drveća i žbunja u urbanim sredinama Srbije, Crne Gore i Bosne i Hercegovine. Najčešći spoljašnji simptomi bili su nekrotične lezije, rak rane i obilno lučenje smole, a ovi simptomi su često bili praćeni i sušenjem stabala sa vrha ili sušenjem celog stabla. Unutrašnji simptomi bili su kružno ili neravnomerno posmeđivanje ili crvenilo vaskularnih tkiva, kao i braon obojene vaskularne pruge vidljive kao tačkice na poprečnim presecima (Fig. 1, 2).



**Figura 1.** Simptomi bolesti uočeni na ukrasnom drveću na području Zapadnog Balkana. **a.** Sušenje sa vrha *Chamaecyparis lawsoniana*; **b.** Rak rana na stablu *Abies concolor*; **c.** Obilno lučenje smole na grani *Cedrus atlantica*; **d.** Diskoloracija drveta džinovske sekvoje *Sequoiadendron giganteum*.



**Figura 2.** Simptomi bolesti uočeni na ukrasnom drveću i žbunju u Srbiji. **a-b.** Posmeđivanje i sušenje četina *Sequoiadendron giganteum* i razvoj bolesti u periodu 2010 (a)–2011 (b); **c.** Sušenje lišća *Prunus laurocerasus*; **d.** Kovrdžanje i sušenje četina *Pseudotsuga menziesii*; **e.** Nekrotirane četine *Thuja occidentalis*; **f.** Odumiranje izbojaka s vrha *Forsythia europaea*.

Uzrok iznenadnog i intenzivnog sušenja drveća nije poznat, ali čini se da je u vezi sa nedavnim ekstremnim vremenskim uslovima i *Botryosphaeriaceae* infekcijama. Tokom poslednjih petnaest godina, na Evropskom kontinentu došlo je do globalnog povećanja temperature koje je bilo praćeno određenim brojem dana sa ekstremno visokim temperaturama- “Topli talasi”, a česta pojava bili su i “Hladni talasi”, jake suše, oluje i poplave (Allen i sar. 2010; IPCC 2014). Prema Hidrometeorološkom Savezu Srbije (Juli 2015), leto 2012 bilo je najtoplije otkako su merenja počela 1887 i najviša temperatura ikada izmerena u Srbiji (44.9°C) bila je zabeležena u leto 2007. Druge ekstremne klimatske prilike tokom ovog perioda uključuju ekstremnu hladnoću, intenzivne snežne padavine i poplave na velikim površinama (www.mod.gov.rs). Pored toga što su odnele ljudske živote i nanele veliku ekonomsku štetu, ekstremne vremenske prilike su izložile biljke celog regiona stresu.

Simptomi zapaženi na ukrasnom drveću na području Zapadnog Balkana bili su slični onima koje izazivaju oportunistički patogeni iz familije *Botryosphaeriaceae* koji infekcije vrše kroz rane. “*Botryosphaeria*-slični” simptomi uključuju sušenje lišća i izbojaka, lučenje gumoznih materija, plavetnilo drveta, rak rane i u izuzetnim slučajevima sušenje celih stabala (Slippers i Wingfield 2007b; Urbez-Torres 2011). Bolesti izazvane *Botryosphaeriaceae* vrstama tipično nastaju nakon što su biljke domaćini bile izložene stresu izazvanim faktorima spoljašnje sredine kakvi su suša, poplave ili visoke temperature (Slippers i Wingfield 2007b; Mehl i sar. 2013). Tokom poslednje decenije, u Evropi je učestalost pojave bolesti izazvanih *Botryosphaeriaceae* vrstama porasla i smatra se da je promena klime uzrok povećanja ove učestalosti (Desprez-Loustau i sar. 2006; Fabre i sar. 2011; Piškur i sar. 2011).

*Botryosphaeriaceae* vrste su važni patogeni voćaka i stabala u šumi (npr. Sánchez i sar. 2003; Slippers i sar. 2009; Chen i sar. 2014), ali diverzitet i uloga ovih gljiva na ukrasnom drveću nije dobro istražena. Stabla koja se sade u urbanim sredinama često su male ekonomske vrednosti ali pružaju mnoštvo ekosistemskih usluga. One uključuju redukciju tzv. “efekta toplog ostrva” i vazdušnih zagađivača, kontrolu poplava, popravljjanje raspoloženja kod ljudi, skladištenje ugljenika i njegovu sekvencijaciju (Tubby i Webber 2010). Stoga, kada se bolesti drveća pojave, one postaju od izuzetne važnosti i “javno dobro” (Perrings i sar. 2002) a to je posebno prisutno u gradovima gde su stable često izložena stresu i bolestima uzrokovanim *Botryosphaeriaceae* vrstama (Begoude i sar. 2010; Heath i sar. 2011).

Nekoliko vrsta iz familije *Botryosphaeriaceae*, uključujući *Botryosphaeria dothidea* (Moug.: Fr.) Ces. & De Not., *Neofusicoccum parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips, *Neofusicoccum luteum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips, *Neofusicoccum batangarum* Begoude, J. Roux & Slippers, *Neofusicoccum magniferae* (Syd. & P.Syd.) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips, *Neofusicoccum mediterraneum* Crous, M.J. Wingf. & A.J.L. Phillips, *Neodeightonia palmicola* J.K. Liu, Phookamsak & K.D. Hyde, *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl., *Lasiodiplodia pseudotheobromae* A.J.L. Phillips, A. Alves & Crous, *Lasiodiplodia mahajangana* Begoude, J. Roux & Slippers i *Diplodia cupressi* A.J.L. Phillips & A. Alves utvrđeno je da izazivaju bolesti na ukrasnom drveću širom sveta (npr. Begoude i sar. 2010; Heath i sar. 2011; Varela i sar. 2011; Mayorquin i sar. 2012; Ligoxigakis i sar. 2013; Deng i sar. 2015; Stanosz i sar. 2015).

Sa izuzetkom Grčke, ne zna se puno o *Botryosphaeriaceae* vrstama koje se javljaju na Balkanu. U Grčkoj, sedam *Botryosphaeriaceae* vrsta nađeno je na različitim drvenastim vrstama, uključujući *B. dothidea*, *Diplodia corticola* A.J.L. Phillips, A. Alves & J. Luque, *D. cupressi*, *N. palmicola*, *N. parvum*, *N. mediterraneum* i *Neofusicoccum helenicum* SF Chen, GQ Li & TJ Michailides (Alves i sar. 2006; Crous i sar. 2007; Inderbitzin i sar. 2010; Tsopeles i sar. 2010; Ligoxigakis i sar. 2013; Chen i sar. 2015). *B. dothidea*, *Dothiorella iberica* A.J.L. Phillips, J. Luque & A. Alves i *Dothiorella parva* Abdollahz., Zare & A.J.L. Phillips nađene su na obolelom drveću *Ostrya carpinifolia*, *Cotinus coggygria* i *Juniperus communis* u Sloveniji (Piškur i sar. 2011; Pavlic-Zupanc i sar. 2015). *Botryosphaeriaceae* su izolovane i iz voćkarica na području Zapadnog Balkana, uključujući *Diplodia bulgarica* A.J.L. Phillips, J. Lopes & S.G. Bobev koja je nađena na jabuci u Bugarskoj (Phillips i sar. 2012), *B. dothidea* na jabuci u Srbiji i maslini u Crnoj Gori (Latinović i sar. 2013; Vasić i sar. 2013), *N. parvum* na vinovoj lozi u Hrvatskoj i *Diplodia seriata* De Not. na žbunovima *Cotoneaster salicifolius* u Bugarskoj i na maslini u Hrvatskoj (Bobev i sar. 2008; Kaliterna i sar. 2012, 2013). Na šumskom i ukrasnom drveću na području Zapadnog Balkana, *B. dothidea*, *D. sapinea* i *S. visci* su identifikovane, ali na osnovu morfoloških karakteristika (Karadžić i sar. 2000; Karadžić i sar. 2004; Karadžić i Milijašević 2008).

Gljive iz familije *Botryosphaeriaceae* je teško identifikovati i taksonomija ovih gljiva bila je godinama konfuzna (Phillips i sar. 2013). Ove gljive su nedavno taksonomski redefinisane kombinacijom morfologije i sekvenci većeg broja gena. Familiju trenutno čini 21 rod (Phillips i sar. 2013; Slippers i sar. 2013; Crous i sar. 2015). *Botryosphaeriaceae* čini veliki broj filogenetski

bliskih i morfološki sličnih kriptičnih vrsta, što morfološku identifikaciju ovih gljiva čini teškom i nepouzdanom (Pavlic i sar. 2009; Phillips i sar. 2013). Dok se tradicionalni morfološki opisi još uvek široko koriste za karakterizaciju i opis novih vrsta, diferencijacija se uglavnom zasniva na molekularnim filogenetskim analizama više delova gena (Phillips i sar. 2013; Slippers i sar. 2014).

### **3.2. Ciljevi istraživanja**

Ovim istraživanjem želeli smo da otkrijemo identitet *Botryosphaeriaceae* vrsta koje se javljaju na ukrasnim stablima sa simptomima sušenja, rak ranama i masovnim izlivom smole na području Zapadnog Balkana. Simptomatični material sakupljan je sa velikog broja drvenastih vrsta širom regiona i gljive su izolovane iz simptoma i plodonosnih tela. *Botryosphaeriaceae*-slični izolati karakterisani su i identifikovani koristeći komparacije DNA sekvenci internog transkribovanog spejsera (ITS), translacionog elongacionog faktora (TEF 1- $\alpha$ ),  $\beta$ -tubulin-2 (BT2) i velike pod jedinice (LSU) rRNA dela gena.

### **3.3. Materijal i metode**

#### **3.3.1. Sakupljanje uzoraka i izolacija *Botryosphaeriaceae* gljiva**

Uzorci su sakupljeni u periodu od Februara 2009 do Decembra 2014 u Srbiji, Crnoj Gori i Bosni i Hercegovini. Sakupljeni su u urbanim šumama, javnom zelenilu, parkovima i privatnim vrtovima u 15 gradova i tri seoska naselja širom regiona. Ukupno, uzorkovano je 145 stabala/žbunova. To je činilo sto osamnaest ukrasnih stabala (35 vrsta), devet ukrasnih žbunova (četiri vrste) a druga stabla/žbunovi uzorkovani su u šumama, plantažama i rasadnicima ukrasnog bilja (Tabele 1, S1). Sva stabla i žbunovi pokazivali su znake bolesti u trenutku uzorkovanja.

Uzorci simptomatičnih tkiva odneti su u laboratoriju. Uzdužni i poprečni rezovi su napravljeni na simptomatičnim stablima i granama kako bi se uočili unutrašnji simptomi bolesti. Izolacije su vršene iz rubova nekrotiranih lezija, smolom impregniranih delova ksilema, diskolorisanog drveta, smolavih izbojaka, četina i peteljki šišarica. U određenim slučajevima, izolacije su vršene iz asimptomatičnih delova pupoljaka, četina i šišarica koji okružuju obolele delove. Mali (3-4 mm) delovi tkiva su isprani u tekućoj vodi, površinski sterilisani (1 min u 70 % etanolu), isprani u sterilnoj destilovanoj vodi, osušeni na sterilnim papirnim ubrusima, kratko plamenom sterilisani i postavljeni na 2 % malt ekstrakt agar



(MEA) (Merck KGaA, Darmstadt, Nemačka) kome je dodata mlečna kiselina (2.5 ml/l, NRK Beograd, Srbija, AMEA). Kada su plodonosna tela bila prisutna u inficiranom tkivu, plodonosno telo je uklanjano sterilnom iglom i stavljano u Petri šolje koje su sadržale AMEA. Petri šolje su zatvarane Parafilmom i inkubirane na sobnoj temperaturi u mraku tokom dve nedelje. *Botryosphaeriaceae*-slični izolati (micelija zelenkasto-siva, brzo rastuća) su aseptično prebacivani u nove Petri šolje koje sadrže MEA. Izolati su očišćeni metodom vrhova hifa i čuvani na 1% MEA vertikalama na 4°C. Reprezentativni izolati sa svakog domaćina čuvaju se u kulturi tkiva (CMW) Instituta za Šumarstvo, Poljoprivredu i Biotehnologiju (FABI), a dve kulture *Dothiorella* sp. 1 poslate su u Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Holandija (CBS) i u Nacionalnu Kolekciju Gljiva, Pretorija, Južna Afrika (PREM).

**Tabela 1.** Izolati korišćeni u filogenetskim analizama.

| Izolat <sup>a, b</sup> | Identitet                    | Domaćin                       | Lokacija <sup>c, d, e</sup>         | Kolektor                  | GenBank Pristupni br. |               |                  |          |
|------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|---------------------------|-----------------------|---------------|------------------|----------|
|                        |                              |                               |                                     |                           | ITS                   | EF1- $\alpha$ | $\beta$ -tubulin | LSU      |
| CBS 112555             | <i>Diplodia seriata</i>      | <i>Vitis vinifera</i>         | Portugal                            | A. J. L. Phillips         | AY259094              | AY573220      | DQ458856         | AY928050 |
| CMW 39385              | <i>D. seriata</i>            | <i>Rubus fruticosus</i>       | Bosnia and Herzegovina <sup>c</sup> | D. Karadžić               | KF574991              | KF575023      | KF575087         | KF575055 |
| CMW 39384              | <i>D. seriata</i>            | <i>Thuja occidentalis</i>     | Belgrade, Serbia                    | M. Zlatković              | KF574992              | KF575024      | KF575088         | KF575056 |
| CMW 39377              | <i>D. seriata</i>            | <i>T. occidentalis</i>        | Crvena reka, Serbia                 | M. Zlatković              | KF574993              | KF575025      | KF575089         | KF575057 |
| CMW 39378              | <i>D. seriata</i>            | <i>Cedrus atlantica</i>       | Belgrade, Serbia                    | M. Zlatković              | KF574994              | KF575031      | KF575090         | KF575061 |
| CMW 39374              | <i>D. seriata</i>            | <i>Fraxinus excelsior</i>     | Bosnia and Herzegovina              | D. Karadžić               | KF574995              | KF575026      | KF575091         | KF575058 |
| CMW 39376              | <i>D. seriata</i>            | <i>Chamaecyparis pisifera</i> | Belgrade, Serbia <sup>d</sup>       | M. Zlatković              | KF574996              | KF575027      | KF575092         | KF575059 |
| CMW 39379              | <i>D. seriata</i>            | <i>Ligustrum vulgare</i>      | Belgrade, Serbia                    | M. Zlatković              | KF574997              | KF575032      | KF575093         | KF575060 |
| CBS 119049             | <i>D. seriata</i>            | <i>Vitis sp.</i>              | Italy                               | L. Mugnai                 | DQ458889              | DQ458874      | DQ458857         | EU673266 |
| CBS 393.84             | <i>Diplodia sapinea</i>      | <i>Pinus nigra</i>            | Netherlands                         | H. A. van der Aa          | DQ458895              | DQ458880      | DQ458863         | EU754157 |
| CMW 39341              | <i>D. sapinea</i>            | <i>Cedrus deodara</i>         | Podgorica, Montenegro               | M. Zlatković              | KF574998              | KF575028      | KF575094         | KF575062 |
| CMW 39338              | <i>D. sapinea</i>            | <i>C. atlantica</i>           | Belgrade, Serbia                    | M. Zlatković              | KF574999              | KF575029      | KF575095         | KF575063 |
| CMW 39346              | <i>D. sapinea</i>            | <i>Picea omorika</i>          | Belgrade, Serbia                    | M. Zlatković              | KF575000              | KF575030      | KF575096         | KF575064 |
| CMW 44981              | <i>D. sapinea</i>            | <i>P. omorika</i>             | Mt Tara <sup>c</sup> , Serbia       | D. Karadžić               | KF729198              | KF729432      | KT253569         | KT253573 |
| CBS 109725             | <i>D. sapinea</i>            | <i>Pinus patula</i>           | South Africa                        | M. J. Wingfield           | DQ458896              | DQ458881      | DQ458864         | EU673270 |
| CBS 112556             | <i>Diplodia intermedia</i>   | <i>Malus domestica</i>        | Aveiro, Portugal                    | A. Alves                  | GQ923857              | GQ923850      | -                | -        |
| CBS 124462             | <i>D. intermedia</i>         | <i>Malus sylvestris</i>       | Portugal                            | A. J. L. Phillips         | GQ923858              | GQ923826      | -                | -        |
| CBS 118110             | <i>Diplodia scrobiculata</i> | <i>Pinus banksiana</i>        | USA                                 | M. A. Palmer              | KF766160              | AY624258      | AY624258         | KF766326 |
| CBS 113423             | <i>D. scrobiculata</i>       | <i>Pinus greggii</i>          | Mexico                              | M. J. Wingfield           | DQ458900              | DQ458885      | DQ458868         | EU673267 |
| CBS 136014             | <i>Diplodia mutila</i>       | <i>Populus alba</i>           | Portugal                            | A. Alves                  | KJ361837              | KJ361829      | -                | -        |
| CMW 39356              | <i>D. mutila</i>             | <i>Aesculus hippocastanum</i> | Obrenovac, Serbia                   | D. Karadžić               | KF575001              | KF575033      | KF575097         | KF575066 |
| CMW 39354              | <i>D. mutila</i>             | <i>P. halepensis</i>          | Herceg Novi, Montenegro             | M. Zlatković              | KF575002              | KF575034      | KF575098         | KF575067 |
| CMW 39353              | <i>D. mutila</i>             | <i>Cupressus arizonica</i>    | Herceg Novi, Montenegro             | M. Zlatković              | KF575003              | KF575035      | KF575099         | KF575068 |
| CBS 112553             | <i>D. mutila</i>             | <i>V. vinifera</i>            | Portugal                            | A. J. L. Phillips         | AY259093              | AY573219      | DQ458850         | AY928049 |
| CBS 124133             | <i>Diplodia subglobosa</i>   | <i>Lonicera nigra</i>         | Spain                               | J. Luque                  | GQ923856              | GQ923824      | -                | -        |
| CBS 124132             | <i>D. subglobosa</i>         | <i>F. excelsior</i>           | Spain                               | J. Luque                  | DQ458887              | DQ458871      | -                | -        |
| CBS 116472             | <i>Diplodia rosulata</i>     | <i>Prunus africana</i>        | Ethiopia, Gambo                     | A. Gure                   | EU430266              | EU430268      | EU673131         | DQ377897 |
| CBS 116470             | <i>D. rosulata</i>           | <i>P. africana</i>            | Ethiopia, Gambo                     | A. Gure                   | EU430265              | EU430267      | EU673132         | DQ377896 |
| CBS 122527             | <i>Sphaeropsis visci</i>     | <i>Viscum album</i>           | Ukraine                             | Á. Akulov                 | EU673327              | -             | -                | -        |
| CMW 39386              | <i>S. visci</i>              | <i>V. album</i>               | Mt Goč <sup>c</sup> , Serbia        | N. Keča                   | KF575004              | KF575036      | KF575100         | KF575065 |
| CBS 100163             | <i>S. visci</i>              | <i>V. album</i>               | Luxemburg                           | H.A. van der Aa           | EU673324              | EU673292      | EU673127         | DQ377870 |
| CBS 110496             | <i>Sphaeropsis porosa</i>    | <i>V. vinifera</i>            | South Africa                        | J. M. van Niekerk         | AY343378              | AY343339      | EU673130         | DQ377894 |
| CBS 110574             | <i>S. porosa</i>             | <i>V. vinifera</i>            | South Africa                        | J. M. van Niekerk         | AY343378              | AY343339      | -                | -        |
| IRAN 1458c             | <i>Phaeobotryon cupressi</i> | <i>Cupressus sempervirens</i> | Gorgan, Iran                        | M. A. Aghajani            | FJ919671              | FJ919660      | -                | -        |
| CMW 39387              | <i>P. cupressi</i>           | <i>C. sempervirens</i>        | Podgorica, Montenegro               | M. Zlatković/J. Lazarević | KF575005              | KF575037      | KF575101         | KF575086 |
| CBS 124700             | <i>P. cupressi</i>           | <i>C. sempervirens</i>        | Gorgan, Iran                        | M. A. Aghajani            | FJ919672              | FJ919661      | -                | -        |

**Tabela 1.** Hastavak.

| Izolat <sup>a, b</sup> | Identitet                        | Domaćin                         | Lokacija <sup>c, d, e</sup> | Kolektor                     | GenBank Pristupni br. |               |                  |          |
|------------------------|----------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------|---------------|------------------|----------|
|                        |                                  |                                 |                             |                              | ITS                   | EF1- $\alpha$ | $\beta$ -tubulin | LSU      |
| CBS 122980             | <i>Phaeobotryon mamane</i>       | <i>Sophora chrysophylla</i>     | Hawaii                      | W. Gams                      | EU673332              | EU673298      | EU673121         | EU673248 |
| CPC 12445              | <i>P. mamane</i>                 | <i>S. chrysophylla</i>          | Hawaii                      | W. Gams                      | EU673336              | EU673302      | EU673122         | EU673250 |
| CMW 8000               | <i>Botryosphaeria dothidea</i>   | <i>Prunus sp.</i>               | Switzerland                 | B. Slippers                  | AY236949              | AY236898      | AY236927         | AY928047 |
| <b>CMW 39302</b>       | <b><i>B. dothidea</i></b>        | <i>Pseudotsuga menziesii</i>    | Belgrade, Serbia            | M. Zlatković                 | KF575006              | KF575038      | KF575102         | KF575077 |
| <b>CMW 39304</b>       | <b><i>B. dothidea</i></b>        | <i>Sequoia sempervirens</i>     | Belgrade, Serbia            | M. Zlatković                 | KF575007              | KF575039      | KF575103         | KF575078 |
| <b>CMW 39308</b>       | <b><i>B. dothidea</i></b>        | <i>Sequoiadendron giganteum</i> | Valjevo, Serbia             | N. Keča                      | KF575008              | KF575040      | KF575104         | KF575079 |
| <b>CMW 44982</b>       | <b><i>B. dothidea</i></b>        | <i>S. giganteum</i>             | Valjevo, Serbia             | N. Keča                      | KF729110              | KT253575      | KT253571         | KT253572 |
| MUCC 501               | <i>B. dothidea</i>               | <i>Eucalyptus marginata</i>     | Yalgorup, Australia         | K. M. Taylor                 | EF591916              | EF591969      | EF591952         | EF591935 |
| CBS 135219             | <i>Botryosphaeria kuwatsukai</i> | <i>M. domestica</i>             | Shaanxi, China <sup>e</sup> | C. S. Wang                   | KJ433388              | KJ433410      | -                | -        |
| PG 55                  | <i>B. kuwatsukai</i>             | <i>M. domestica</i>             | Shaanxi, China <sup>e</sup> | C. S. Wang                   | KJ433389              | KJ433411      | -                | -        |
| CBS 121769             | <i>Botryosphaeria</i>            | <i>Acacia mellifera</i>         | Namibia                     | F. J. J van der Walt/J. Roux | EU101303              | EU101348      | -                | -        |
| ATCC 22927             | <i>Botryosphaeria corticis</i>   | <i>Vaccinium sp.</i>            | USA                         | R. D. Millholland            | DQ299247              | EU673291      | EU673108         | EU673245 |
| CBS 119047             | <i>B. corticis</i>               | <i>Vaccinium corymbosum</i>     | New Jersey, USA             | P. V. Oudemans               | DQ299245              | EU017539      | EU673107         | EU673244 |
| IMI 63581b             | <i>Dothiorella sarmentorum</i>   | <i>Ulmus sp.</i>                | England                     | E. A. Ellis                  | AY573212              | AY573235      | EU673102         | AY928052 |
| <b>CMW 39366</b>       | <b><i>Do. sarmentorum</i></b>    | <i>A. hippocastanum</i>         | Belgrade, Serbia            | I. Milenković                | KF575009              | KF575047      | KF575105         | KF575069 |
| <b>CMW 39364</b>       | <b><i>Do. sarmentorum</i></b>    | <i>Chamaecyparis</i>            | Belgrade, Serbia            | M. Zlatković                 | KF575010              | KF575048      | KF575106         | KF575070 |
| <b>CMW 39370</b>       | <b><i>Do. sarmentorum</i></b>    | <i>C. atlantica</i>             | Belgrade, Serbia            | M. Zlatković                 | KF575011              | KF575049      | KF575107         | KF575071 |
| CBS 115038             | <i>Do. sarmentorum</i>           | <i>Malus pumila</i>             | The Netherlands             | A. J. L. Phillips            | AY573206              | AY573223      | EU673101         | DQ377860 |
| CBS 128309             | <i>Dothiorella americana</i>     | <i>V. vinifera</i>              | Missouri, USA               | K. Striegler/G. M. Leavitt   | HQ288218              | HQ288262      | HQ288297         | -        |
| CBS 128310             | <i>Do. americana</i>             | <i>V. vinifera</i>              | Missouri, USA               | K. Striegler/G. M. Leavitt   | HQ288219              | HQ288263      | HQ288298         | -        |
| CBS 124716             | <i>Dothiorella sp.</i>           | <i>Juglans regia</i>            | Iran                        | J. Abdollahzadeh/A. Javadi   | KC898232              | KC898215      | -                | -        |
| CBS 124717             | <i>Dothiorella sp.</i>           | <i>J. regia</i>                 | Iran                        | J. Abdollahzadeh/A. Javadi   | KC898233              | KC898216      | -                | -        |
| <b>CMW 39360</b>       | <b><i>Dothiorella sp. 2</i></b>  | <i>Fraxinus excelsior</i>       | Bosnia and Herzegovina      | D. Karadžić                  | KF575012              | KF575052      | KF575108         | KF575072 |
| <b>CMW 39361</b>       | <b><i>Dothiorella sp. 2</i></b>  | <i>C. sempervirens</i>          | Podgorica, Montenegro       | M. Zlatković                 | KF729083              | KT253576      | KT253570         | KT253574 |
| <b>CMW 39362</b>       | <b><i>Dothiorella sp. 2</i></b>  | <i>Thuja occidentalis</i>       | Belgrade, Serbia            | M. Zlatković                 | KF575013              | KF575053      | KF575109         | KF575073 |
| <b>CMW 39363</b>       | <b><i>Dothiorella sp. 2</i></b>  | <i>C. lawsoniana</i>            | Belgrade, Serbia            | M. Zlatković                 | KF575014              | KF575054      | KF575110         | KF575074 |
| <b>CMW 39123</b>       | <b><i>Dothiorella sp. 1</i></b>  | <i>Thuja plicata</i>            | Belgrade, Serbia            | M. Zlatković                 | KF040058              | KF261728      | KF261730         | KF261726 |
| <b>CBS 135623</b>      |                                  |                                 |                             |                              |                       |               |                  |          |
| <b>CMW 39372</b>       | <b><i>Dothiorella sp. 1</i></b>  | <i>C. atlantica</i>             | Belgrade, Serbia            | M. Zlatković                 | KF575015              | KF575050      | KF575111         | KF575075 |
| <b>CMW 39371</b>       | <b><i>Dothiorella sp. 1</i></b>  | <i>C. atlantica</i>             | Belgrade, Serbia            | M. Zlatković/I. Milenković   | KF575016              | KF575051      | KF575112         | KF575076 |
| <b>CMW 39122</b>       | <b><i>Dothiorella sp. 1</i></b>  | <i>C. atlantica</i>             | Belgrade, Serbia            | M. Zlatković                 | KF261725              | KF261729      | KF261731         | KF261727 |
| <b>CBS 135622</b>      |                                  |                                 |                             |                              |                       |               |                  |          |
| <b>CMW 39373</b>       | <b><i>Dothiorella sp. 1</i></b>  | <i>C. atlantica</i>             | Belgrade, Serbia            | M. Zlatković                 | KF729085              | KF767530      | KF767531         | KF767532 |
| MFLUCC 13-0497         | <i>Do. symphoricarposicola</i>   | <i>Symphoricarpos sp.</i>       | Italy                       | Erio Camporesi               | KJ742378              | KJ742381      | -                | -        |
| MFLUCC 13-0498         | <i>Do. symphoricarposicola</i>   | <i>Symphoricarpos sp.</i>       | Italy                       | Erio Camporesi               | KJ742379              | KJ742382      | -                | -        |

**Tabela 1.** Hastavak.

| Izolati <sup>a, b</sup> | Identitet                         | Domaćin                         | Lokacija <sup>c, d, e</sup> | Kolektor                | GenBank Pristupni br. |               |                  |          |
|-------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|-------------------------|-----------------------|---------------|------------------|----------|
|                         |                                   |                                 |                             |                         | ITS                   | EF1- $\alpha$ | $\beta$ -tubulin | LSU      |
| BL 167                  | <i>Do. symphoricarposicola</i>    | <i>Corylus avellana</i>         | Italy                       | B. L. Linaldeddu        | KP205496              | KP205469      | -                | -        |
| BL 174                  | <i>Do. symphoricarposicola</i>    | <i>Corylus avellana</i>         | Italy                       | B. L. Linaldeddu        | KP205495              | KP205468      | -                | -        |
| BL 158                  | <i>Do. symphoricarposicola</i>    | <i>Corylus avellana</i>         | Italy                       | B. L. Linaldeddu        | KP205493              | KP205466      | -                | -        |
| BL 53                   | <i>Do. symphoricarposicola</i>    | <i>Corylus avellana</i>         | Italy                       | B. L. Linaldeddu        | KP205492              | KP205465      | -                | -        |
| DAR 78992               | <i>Dothiorella vidmadera</i>      | <i>V. vinifera</i>              | Eden Valley, Australia      | W. M. Pitt/A. Loschiavo | EU768874              | EU768881      | HM800522         | -        |
| DAR 78993               | <i>Do. vidmadera</i>              | <i>V. vinifera</i>              | Loxton, Australia           | W. M. Pitt/A. Loschiavo | EU768876              | EU768882      | HM800523         | -        |
| CBS 115041              | <i>Dothiorella iberica</i>        | <i>Quercus ilex</i>             | Aragón, Spain               | J. Luque                | AY573202              | AY573222      | EU673096         | DQ377853 |
| CBS 113188              | <i>Do. iberica</i>                | <i>Quercus suber</i>            | Andalucia, Spain            | M. E. Sánchez           | AY573198              | EU673278      | EU673097         | EU673230 |
| JL 599                  | <i>Dothiorella parva</i>          | <i>Corylus avelana</i>          | Spain                       | J. Luque                | EU673314              | EU673281      | EU673099         | EU673233 |
| CBS 124720              | <i>Do. parva</i>                  | <i>C. avelana</i>               | Iran, Ardabil               | J. Abdollahzadeh/A.     | KC898234              | KC898217      | -                | -        |
| CBS 124723              | <i>Dothiorella prunicola</i>      | <i>Prunus dulcis</i>            | Portugal                    | A. J. L. Phillips       | EU673313              | EU673280      | EU673100         | EU673232 |
| CBS 124722              | <i>Dothiorella iranica</i>        | <i>Olea europaea</i>            | Iran, Golestan              | A. Javadi               | KC898231              | KC898214      | -                | -        |
| CBS 124719              | <i>Dothiorella sempervirentis</i> | <i>C. sempervirens</i>          | Iran, Golestan              | M. A. Aghajani          | KC898237              | KC898220      | -                | -        |
| CBS 124718              | <i>Do. sempervirentis</i>         | <i>C. sempervirens</i>          | Iran, Golestan              | M. A. Aghajani          | KC898236              | KC898219      | -                | -        |
| MUCC 507                | <i>Dothiorella moneti</i>         | <i>Acacia rostellifera</i>      | Yalgorup, Australia         | K. M. Taylor            | EF591922              | EF591973      | EF591956         | EF591939 |
| MUCC 505                | <i>Do. moneti</i>                 | <i>A. rostellifera</i>          | Yalgorup, Australia         | K. M. Taylor            | EF591920              | EF591971      | EF591954         | EF591937 |
| MUCC 509                | <i>Dothiorella santali</i>        | <i>Santalum acuminatum</i>      | Yalgorup, Australia         | K. M. Taylor            | EF591924              | EF591975      | EF591958         | EF591941 |
| MUCC 508                | <i>Do. santali</i>                | <i>S. acuminatum</i>            | Yalgorup, Australia         | K. M. Taylor            | EF591923              | EF591974      | EF591957         | EF591940 |
| CMW 36463               | <i>Dothiorella brevicollis</i>    | <i>Acacia karoo</i>             | South Africa                | F. Jami/M. Gryzenhout   | JQ239403              | JQ239390      | JQ239371         | JQ239416 |
| CMW 36464               | <i>Do. brevicollis</i>            | <i>A. karoo</i>                 | South Africa                | F. Jami/M. Gryzenhout   | JQ239404              | JQ239391      | JQ239372         | JQ239417 |
| CBS 122068              | <i>Dothiorella longicollis</i>    | <i>Lysiphyllum cunninghamii</i> | Western Australia           | T. I. Burgess           | EU144054              | EU144069      | -                | -        |
| CBS 122067              | <i>Do. longicollis</i>            | <i>L. cunninghamii</i>          | Western Australia           | T. I. Burgess           | EU144053              | EU144068      | -                | -        |
| CMW 9081                | <i>Neofusicoccum parvum</i>       | <i>Populus nigra</i>            | New Zealand                 | G. J. Samuels           | AY236943              | AY236888      | AY236917         | AY928045 |
| <b>CMW 39328</b>        | <b><i>N. parvum</i></b>           | <i>Pittosporum tobira</i>       | Herceg Novi, Montenegro     | M. Zlatković            | KF575017              | KF575041      | KF575113         | KF575080 |
| <b>CMW 39321</b>        | <b><i>N. parvum</i></b>           | <i>Prunus laurocerasus</i>      | Budva, Montenegro           | M. Zlatković            | KF575018              | KF575042      | KF575114         | KF575081 |
| <b>CMW 39326</b>        | <b><i>N. parvum</i></b>           | <i>Eucalyptus globulus</i>      | Herceg Novi, Montenegro     | M. Zlatković            | KF575019              | KF575043      | KF575115         | KF575082 |
| <b>CMW 39317</b>        | <b><i>N. parvum</i></b>           | <i>E. globulus</i>              | Bar, Montenegro             | M. Zlatković            | KF575020              | KF575044      | KF575116         | KF575083 |
| <b>CMW 39325</b>        | <b><i>N. parvum</i></b>           | <i>A. hippocastanum</i>         | Belgrade, Serbia            | I. Milenković           | KF575021              | KF575045      | KF575117         | KF575084 |
| <b>CMW 39318</b>        | <b><i>N. parvum</i></b>           | <i>C. lawsoniana</i>            | Belgrade, Serbia            | N. Keča/M. Zlatković    | KF575022              | KF575046      | KF575118         | KF575085 |
| CMW 9071                | <i>N. parvum</i>                  | <i>Ribes sp.</i>                | Australia                   | M. J. Wingfield         | EU339552              | AY236880      | AY236909         | -        |
| CMW 7772                | <i>Neofusicoccum ribis</i>        | <i>Ribes sp.</i>                | New York, USA               | B. Slippers/G. Hudler   | AY236935              | AY236877      | AY236906         | AY928044 |
| CMW 7773                | <i>N. ribis</i>                   | <i>Ribes sp.</i>                | New York, USA               | B. Slippers/G. Hudler   | AY236936              | DQ235142      | AY236907         | DQ246263 |
| CMW 14058               | <i>Neofusicoccum umdonicola</i>   | <i>Syzygium cordatum</i>        | Kosi Bay, South Africa      | D. Pavlic               | EU821904              | EU821874      | EU821844         | -        |
| CMW 14127               | <i>N. umdonicola</i>              | <i>S. cordatum</i>              | South Africa                | D. Pavlic               | EU821926              | EU821896      | EU821866         | -        |
| CMW 28315               | <i>Neofusicoccum batangarum</i>   | <i>Terminalia catappa</i>       | Cameroon                    | D. Begoude/J. Roux      | FJ900606              | FJ900652      | FJ900633         | -        |

**Tabela 1.** Hastavak.

| Izolat <sup>a, b</sup> | Identitet                           | Domaćin                  | Lokacija <sup>c, d, e</sup> | Kolektor           | GenBank Pristupni br. |               |                  |          |
|------------------------|-------------------------------------|--------------------------|-----------------------------|--------------------|-----------------------|---------------|------------------|----------|
|                        |                                     |                          |                             |                    | ITS                   | EF1- $\alpha$ | $\beta$ -tubulin | LSU      |
| CMW 28363              | <i>N. batangarum</i>                | <i>T. catappa</i>        | Cameroon                    | D. Begoude/J. Roux | FJ900607              | FJ900653      | FJ900634         | -        |
| CBS 123639             | <i>Neofusicoccum</i>                | <i>S. cordatum</i>       | South Africa                | D. Pavlic          | EU821900              | EU821870      | EU821840         | -        |
| CBS 123641             | <i>N. kwambonambiense</i>           | <i>S. cordatum</i>       | South Africa                | D. Pavlic          | EU821919              | EU821889      | EU821859         | -        |
| CMW 14054              | <i>Neofusicoccum cordaticola</i>    | <i>S. cordatum</i>       | South Africa                | D. Pavlic          | EU821906              | EU821876      | EU821846         | -        |
| CMW 13992              | <i>N. cordaticola</i>               | <i>S. cordatum</i>       | South Africa                | D. Pavlic          | EU821898              | EU821868      | EU821838         | -        |
| CBS 117448             | <i>Pseudofusicoccum stromaticum</i> | <i>Eucalyptus</i> hybrid | Venezuela                   | S. Mohali          | AY693974              | AY693975      | EU673094         | DQ377931 |
| CBS 117449             | <i>P. stromaticum</i>               | <i>Eucalyptus</i> hybrid | Venezuela                   | S. Mohali          | DQ436935              | DQ436936      | EU673093         | DQ377932 |

Kolekcije gljiva: CMW: FABI, Univerzitet u Pretoriji, Južna Afrika; CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Holandija; CPC: Kolekcija Pedro Crous, CBS; IRAN: Iranian Fungal Culture Collection, Iranski Institut za Zaštitu Bilja, Iran; ATCC, American Type Culture Collection; MUCC: Murdoch University Culture Collection; DAR: Plant Pathology Herbarium, Orange Poljoprivredni Institut, DPI, Orange, NSW, Australia; IMI: CABI Genetic Resource Collection Bioscience, Egham, Surrey, Velika Britanija; JL: J. Luque, IRTA, Barcelona, Španija; MFLUCC: Mae Fah Luang University Culture Collection, Chiang Rai, Tajland. <sup>a</sup> Izolati sekvencirani u ovom istraživanju su boldovani. Ostali su uzeti iz Banke Gena. <sup>b</sup> Pristupni brojevi izolata koji su napisani kosim (italic) brojevima odnose se na kulture koje su morfološki vezane za tipski materijal. <sup>c</sup> Šumska sastojina. <sup>d</sup> Rasadnik. <sup>e</sup> Xu i sar. (2015).

### 3.3.2. DNA ekstrakcija, PCR i sekvenciranje

DNA je ekstrahovana uz pomoć PrepMan Ultra reagent (Applied Biosystems, Foster City, California) prema uputstvima proizvođača. DNA koncentracije odedene su uz pomoć NanoDropH ND-1000 i pratećeg programa (NanoDrop Technologies, DuPont Agricultural Genomics Laboratories, Delaware). Originalni DNA ekstrakti rastvoreni su u 50  $\mu$ l destilovane Sabax vode i čuvani na temperaturi od -20 °C pre nego što su korišćeni u reakcijama amplifikacije. ITS region rDNA operona amplifikovan je uz pomoć prajmera ITS-1 i ITS-4 (White i sar. 1990), deo TEF-1- $\alpha$  gena uz pomoć prajmera EF1-728F i EF1-986R (Carbone i Kohn 1999), deo  $\beta$ -tubulin gena uz pomoć prajmera Bt2a i Bt2b (Glass i Donaldson 1995) i deo LSU gena uz pomoć prajmera LR0 i LR5 (Vilgalys i Hester 1990). 25  $\mu$ l PCR reakcione smeše sadržalo je 2.5  $\mu$ l 10 mM PCR bufera (PCR bufer sa  $MgCl_2$ ), 1  $\mu$ l 100 mM svake dNTPs, 0.5  $\mu$ l 10 mM svakog prajmera, 2-2.5  $\mu$ l razređene genomičke DNA, 0.5 U Taq polimeraze (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis) i 18  $\mu$ l sterilne destilovane Sabax vode (Adcock Ingram Ltd., Johannesburg, South Africa). Uz svaku reakciju korišćena je i kontrolna reakcija sa sterilnom vodom. Uslovi amplifikacije bili su sledeći: početna denaturacija 5 min na 95°C, zatim 35-40 ciklusa 30 s na 95°C, 30 s vezivanje prajmera (eng. annealing) na 55°C, 1 min izduživanje (eng. elongation) na 72°C, i konačni korak izduživanje od 8 min na 72°C.

U nekim slučajevima predhodno spomenute kombinacije prajmera nisu mogle da amplifiraju odedene izolate i tada su urađene određene modifikacije: Micelija je ekstrahovana uz pomoć CTAB protokla napisanog od strane Möller i sar. (1992) i 1  $\mu$ l nerazređenih DNA ekstrakata korišćeno je u PCR reakcijama. PCR reakciona smeša sadržala je dodatnih 1  $\mu$ l 25 mM  $MgCl_2$  ili dodatnih 0.5  $\mu$ l Taq polimeraze. ITS region je amplifikovan uz pomoć prajmera ITS1F (Gardes i Bruns 1993) i ITS-4 (White i sar. 1990) i TEF-1- $\alpha$  gen koristeći prajmere EF1-F i EF2-R (Jacobs i sar. 2004) i “annealing” temperaturu of 60°C or 62°C.

Tri  $\mu$ l svakog PCR produkta podvrgnuto je elektroforezi na 1.5 % (w/v) agaroznom gelu u 0.5 x TAE buferu, obojeno sa GelRed (Biotium, Hayward, California, USA) i vizualizovano pod UV svetlom. Veličina produkata procenjena je uz pomoć DNA molekularnog markera (Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder, Fermentas). Amplifikovani PCR gragmenti su očišćeni uz pomoć Sephadex G-50 kolona (Sigma, Steinheim, Germany) prateći uputstva proizvođača. 12  $\mu$ l PCR

reakcione smeše za sekvenciranje sadržalo je 1 µl Big Dye Terminator v. 3.1 (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, California, USA), 2 µl bufera za sekvenciranje (koji je dobijen uz BigDye), 1 µl (10 mM) prajmera, 3 µl čistog PCR produkta i 5 µl sterilne Sabax vode. Sekvenciranje je urađeno u oba smera, sa istim prajmerima koji su korišćeni u PCR reakcijama. Sekvenciranje je urađeno pod sledećim uslovima: 28 ciklusa 10 s na 96°C, 5 s na 56°C i 4 min na 60°C. Produkti su razdvojeni na ABI PRISM 3500 genetičkom analizeru (Applied Biosystems).

### 3.3.3. Poravnavanje sekvenci i filogenetske analize

Nukleotidne sekvence su pregledane i sekvence levog i desnog smera su udružene uz pomoć CLC Main Workbench 6.6.1 (CLC Bio, Aarhus, Denmark). Sekvence su upoređene sa ostalim sekvencama *Botryosphaeriaceae* vrsta koje su deponovane u GenBank uz pomoć BLAST metode. Odgovarajuće sekvence su daunloudovane i uključene u dalje analize. Poravnavanja su urađena “online” uz pomoć MAFFT verzija br. 7 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>). Poravnavanja sekvenci prekontrolisana su uz pomoć programa MEGA v. 6 (Tamura i sar. 2013) i određena podešavanja i prepravke rađene su po potrebi.

Najbolji nukleotidni substitucionni model kod metode maksimalne verovatnoće (“maximum likelihood (ML)”) određen je uz pomoć JModeltest v.0.1 (Posada 2008). ML stablo je napravljeno uz pomoć online verzije softvera PhyML 3.0 (Guindon i sar. 2010). Pouzdanost svakog čvora (eng. node) proverena je uz pomoć 1000 replikacija (eng. bootstrap) (Felsenstein 1985). Analize maksimalne štedljivosti (“maximum parsimony (MP)”) urađene su uz pomoć softvera PAUP verzija 4.0b10 (Swofford 2003). Izabrana je heuristična funkcija sa 1000 slučajnih replikacija isto kao i bisekcija stabla i rekonstrukcija kao algoritmi za konstrukciju grana stabla. Praznine su tretirane kao peti karakter i svi karakteri su bili neredosledni i jednake težine. Grane koje su bile nulte težine bile su kolapsirane i sva rezultujuća stabla iste parsimonosti su sačuvana. Evidentirani su indeks konzistentnosti i indeks retencije. Kongruentnost između različitih setova podataka testirana je uz pomoć testa homogenosti particija (eng. partition homogeneity test) (Farris et al. 1995) u programu PAUP v. 4 sa neinformativnim karakterima koji su uklonjeni pre analiza. Filogenetska stabla su vizualizovana u programu MEGA v. 6. Sve sekvence dobijene u ovom istraživanju nalaze se u Banci Gena, a

poravnane sekvence (eng. alignment) četiri dela gena i MP stablo u bazi stabala TreeBASE (Pristupni br. S18025). Pristupni brojevi reprezentativnih izolata uključenih u multigenске analize prikazani su u Tabeli 1.

### **3.3.4. Morfološka karakterizacija i porast micelije na različitim temperaturama**

Izolati svake vrste uključeni u multigenске filogenetske analize korišćeni su i u istraživanjima morfologije. Kako bi se podstakla proizvodnja spora, kulture su stavljene na vodeni agar (WA) (2 % agar; Biolab, Johannesburg, South Africa) na koji su bile stavljene i tripud sterilizovane četine crnog bora ili izbojci Lavsonovog pačempresa i inkubirane pod UV svetlom na 25°C tokom 3-7 nedelja. Morfološke karakteristike kultura utvrđene su uz pomoć Carl Zeiss svetlosnog disekcionog mikroskopa opremljenog sa HRc AxioCam digitalnom kamerom i Axiovision 3.1 programom za obradu slika (Carl Zeiss Ltd., Munich, Germany). Plodnosna tela su sečena uz pomoć Jung tissue freezing medijuma i Leica CM1100 kriotoma ili mrvljena ručno i zatim stavljana u destilovanu vodu. Napravljeno je najmanje pedeset merenja dužine i širine konidija i ukoliko su bile prisutne, spermatija. Dimenzije drugih gljivičnih struktura date su kao prosek od najmanje 20 merenja. Zabeleženi su oblik, boja konidija, prisustvo ili odsustvo septi i tip konidiogeneze.

Izolati su zatim korišćeni za istraživanje morfologije kolonija i optimalne temperature za porast micelije. Za svaki izolat, uzimani su micelijski diskovi prečnika šest mm sa krajeva kolonija starih nedelju dana i prebacivani u centar 90 mm diam. Petri solja ispunjenih sa 2 % MEA. Šolje su inkubirane na devet temperatura (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 37 i 40°C) tokom dve nedelje u mraku. Po pet replikata Petri šolja korišćeno je za svaki izolat. Prečnici kolonija mereni su jednom dnevno u određeno vreme pod pravim uglovima sve dok micelija najbržeg izolata ne bi dospela do ivica Petri šolje. Izračunate su prosečne vrednosti prečnika kolonija i optimalna temperatura za rast definisana je kao temperatura pri kojoj je došlo do maksimalnog porasta micelije. Celi eksperiment je ponovljen jednom. Boje kolonija poređene su sa bojama prikazanim u radu Rayner (1970).



### 3.3.5. Statističke analize porasta micelije na različitim temperaturama

Analize su urađene u programima Statistica 8.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) i IBM SPSS Statistics 20.0 (New York, USA). Najpre je proverena normalnost podataka uz pomoć Kolmogorov-Smirnov testa, a homogenost varijansi uz pomoć Levenovog testa. Analize porasta micelije na različitim temperaturama nastavljene su uz pomoć jednosmernog ANOVA testa praćenog sa post-hock LSD testom i vrednosti  $p < 0.05$  su smatrane značajnim. Zbog toga što preduslovi parametričnih testova kod analiza optimalne temperature za rast nisu ispunjeni, a transformacija podataka nije doprinela normalnosti varijabli, analize su dalje nastavljene uz pomoć ne-parametričnog Kruskal-Wallis jednosmernog ANOVA testa koji je zatim bio praćen višestrukim Mann-Whitney U testovima za komparacije medijana.

## 3.4. Rezultati

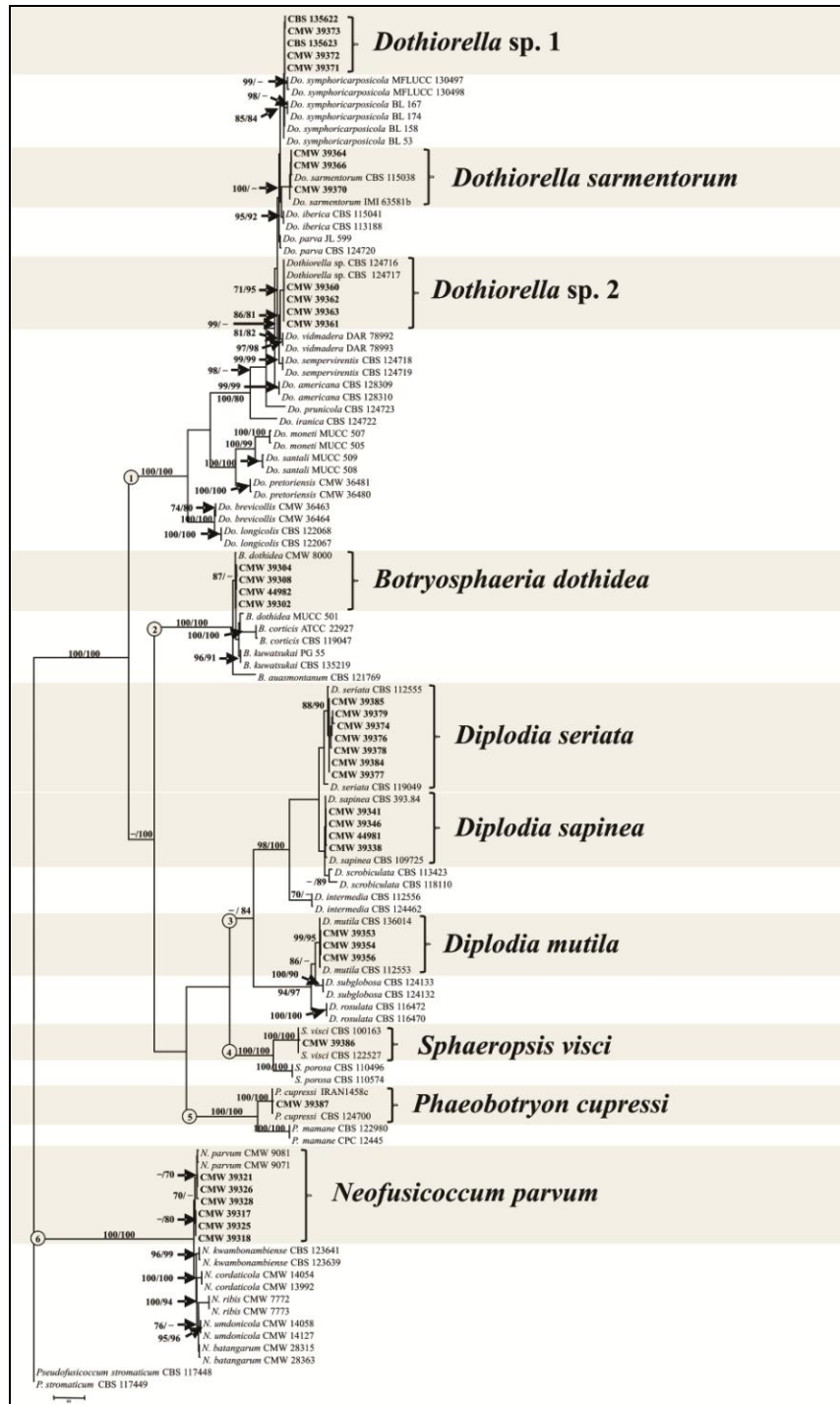
### 3.4.1. *Botryosphaeriaceae* izolacija i molekularna filogenetska identifikacija

Ukupno je 306 *Botryosphaeriaceae*-sličnih izolata dobijeno u ovom istraživanju. Od njih, 285 izolata je poreklom sa ukrasnog drveća, 14 izolata je poreklom iz šumskih sastojina, tri izolata je poreklom iz plantaža i četiri izolata je dobijeno iz sadnica iz rasadnika ukrasnog bilja (Tabele 1, S1). Na osnovu preliminarne identifikacije pomoću ITS sekvenci, trideset i osam reprezentativnih izolata koji pripadaju rodovima *Dothiorella*, *Neofusicoccum*, *Diplodia*, *Phaeobotryon*, *Sphaeropsis* i *Botryosphaeria* podvrgnuto je daljim analizama više delova gena i morfološkoj karakterizaciji (Tabela 1).

MP analize ITS, TEF-1- $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin i LSU dela gena urađene su za svaki genski region zasebno ali i za kombinovani set podataka četiri lokusa, dok su ML analize urađene samo za kombinovani set podataka. Kombinovani set podataka sadržao je 113 sekvenci uključujući 37 sekvenci dobijenih u ovom istraživanju i 76 sekvenci preuzetih iz Banke Gena sa *Pseudofusicoccum stromaticum* kao spoljnom grupom. Set podataka sadržao je 527 karaktera za ITS region (167 parsimoni informativnih, 360 parsimoni neinformativnih, CI=0.6, RI=0.9 i TL=400), 386 za TEF-1- $\alpha$  (302 parsimoni informativnih, 84 parsimoni neinformativnih, CI=0.6, RI=0.9 i TL=871), 440 za  $\beta$ -tub (148 parsimoni informativnih, 292 parsimoni neinformativnih, CI=0.7, RI=0.9 i TL=312), 559 za LSU (56 parsimoni informativnih, 503 parsimoni

neinformativnih, CI=0.7, RI=0.9 i TL=78) i 1912 za kombinovani set podataka (673 parsimoni informativnih, 1239 parsimoni neinformativnih, CI=0.6, RI=0.9, TL=1714). Rezultati PHT testa nisu bili značajni i pokazali su da se četiri lokusa mogu kombinovati (P=0.7). Model TrN+G odabran je za ML analize kombinovanog seta podataka (G=0.2080). Konačne MP i ML analize proizvele su stabla sa sličnom tipologijom i samo malim razlikama u pogledu pozicija subklada, i stoga je prikazano samo MP stablo (Fig. 3). Ipak, filogenetske grupe koje predstavljaju individualne vrste i rodove (*Dothiorella* i *Diplodia* u LSU analizama) povremeno su kolapsirane u analizama pojedinačnih delova gena.

Filogenetske analize pokazale su da postoji šest glavnih i veoma podržanih klada, od kojih svaka predstavlja zasebni rod, i to: *Dothiorella*, *Neofusicoccum*, *Botryosphaeria*, *Phaeobotryon*, *Sphaeropsis* i *Diplodia*. U okviru ovih klada može se izvojiti deset *Botryosphaeriaceae* vrsta. Rodovi *Dothiorella* i *Diplodia* sadržali su svaki po tri vrste, dok je jedna vrsta bila prisutna u svakom od rodova *Neofusicoccum*, *Botryosphaeria*, *Phaeobotryon* i *Sphaeropsis*. Identifikovano je osam poznatih vrsta i to *Dothiorella sarmentorum* (Fr.) A.J.L. Phillips, Alves & Luque, *N. parvum*, *B. dothidea*, *Phaeobotryon cupressi* Abdollahzadeh, Zare & A.J.L. Phillips, *S. visci*, *D. seriata*, *D. sapinea* i *Diplodia mutila* (Fr.: Fr.) Fr. i dve dodatne vrste su bile prepoznate u rodu *Dothiorella*.



**Fig. 3.** Prvo od 1000 podjednako parsimoni stabala nastalih kao rezultat parsimoni analiza kombinovanog ITS, TEF 1- $\alpha$ ,  $\beta$ -tub i LSU poravnavanja. Vrednosti bootstrap podrške (MP/ML  $\leq 70$  %) date su na čvorovima a razmera predstavlja broj promena. Stablo je ukorenjeno sa *P. stromaticum* CBS 117448 i CBS 117449. Klade koje predstavljaju rodove identifikovane u ovom istraživanju označene su kružićima na čvorovima a klade koje predstavljaju vrste su osenčene.

### 3.4.2. Morfološka karakterizacija

Svi izolati su sporulisali i proizveli su zrele piknide na WA sa sterilisanim četinama ili izbojcima Lavsonovog pačempresa. Seksualne structure nisu uočene tako da je morfološka karakterizacija vrsta bazirana na morfologiji aseksualnog izgleda ovih gljiva. Svi izolati su proizveli spermacije i najveći broj izolata je proizveo hlamidospore, hlamidosporama-slične hife i piknidijske hife sa površinskim ukrasima (Fig. 4, 5, 6, 7; Tabela S2). *Dichomera* sin-aseksualni izgled je uočen kod nekih izolata *B. dothidea*, *D. sapinea* i *Dothiorella* sp. 2 i njihova morfologija je opisana u tekstu koji sledi.

#### 3.4.2.1. Taksonomija

Sledeći odeljak čini opis *Dothiorella* sp. 1 i opis morfoloških karakteristika nauci poznatih gljiva ukoliko te karakteristike do sada nisu bile uočene.

***Dothiorella* sp. 1**, Fig. 3, 4, 8, 9. Tabela 1.

*Plodonosna tela* su piknidi koji mogu biti uronjeni u agar ili površinski, pojedinačni ili se javljaju u grupama, loptasti ili delimično loptasti, ili sa dugim vratom, prečnika 200  $\mu\text{m}$ –1000  $\mu\text{m}$ , visine 250  $\mu\text{m}$ –3000  $\mu\text{m}$ , glatki ili prekriveni hifama, čini ih 2–3 spoljašnja sloja tamno braon debelo zidnih ćelija tipa *textura angularis* i 5–6 unutrašnja sloja hijalinskih ćelija. Piknidi su na domaćinu *Cedrus atlantica* pojedinačni ili grupi, okrugli, crni, uronjeni u tkivo domaćina, sa sazrevanjem postaju površinski, do 2 mm široki. *Konidiofori* su redukovani do konidiogenih ćelija. *Konidiogene ćelije* se formiraju od ćelija koje oblažu unutrašnji zid piknidijske šupljine, holoblastične su, cilindrične ili sub-cilindrične, hijalinske, predominantno proliferišu perkurentno i tom prilikom obrazuju 1–3 ožiljaka-anelacija, povremeno proliferišu na istom nivou proizvodeći periklinalna zadebljanja-kragne, 8–15  $\times$  3–6  $\mu\text{m}$  (pros. 11.5  $\times$  4.5, l/w 2.6)  $\mu\text{m}$ . *Konidije* na MEA podlozi su ovalne ili ovoidne, (17.1–) 19–21 (–23.1)  $\times$  (7–) 8–10 (–12)  $\mu\text{m}$  (pros. 20.3  $\times$  9, l/w 2.3)  $\mu\text{m}$ , na WA podlozi sa sterilisanim izbojcima Lavsonovog pačempresa ili *P. nigra* četinama, nešto duže i šire, (18.2–) 20–22 (–23.9)  $\times$  (8.6–) 9–11 (–13.6)  $\mu\text{m}$  (pros. 21  $\times$  10.1, l/w 2.1)  $\mu\text{m}$ , zaobljenog vrha i trunkatne baze, sužene u septi, prvobitno hijalinske i granulozne, postaju tamno braon sa hrapavim spoljašnjim zidom i 1-septirane dok su još uvek vezane za konidiogene ćelije. *Spermatofori* su hijalinski, glatki, cilindrični, povremeno

se granaju. *Spermatogene ćelije* su hijalinske, glatke, cilindrične, fjalidične. *Spermacije* su hijalinske, glatke, aseptirane, prut-izgleda sa zaobljenim krajevima, povremeno neznatno zaobljene,  $2-4 \times 1.5-2$  (pros.  $3 \times 1.8$ , l/w 1.7)  $\mu\text{m}$  i sličnog oblika, ali manje,  $1.5-2.1 \times 0.4-0.8$  (pros.  $1.8 \times 0.6$ , l/w 3)  $\mu\text{m}$ . *Hlamidospore* su loptaste ili delimično loptaste, elipsoidne, ovalne ili subcilindrične, hijalinske ili zlatno braon boje, debelo-zidne, glatke sa zrnastim sadržajem ili hrapave, terminalne na bočnim hifama ili se javljaju bočno ili interkalarno, ostajući pri tom u nizu od 2–30 hlamidospora, retko su pojedinačne,  $(12-)$   $15-21$   $(-27) \times (11-)$   $13-17$   $(-22)$   $\mu\text{m}$ .

*Karakteristike kultura:* Kolonije su prvobitno bele boje, krajevi ostaju beli, centar postaje maslinasto-sive boje (21<sup>””b</sup>) do dimno-sive boje (21<sup>””f</sup>) na površini u roku od nedelju dana, a zatim postaje dimno sive boje na površini i tamno maslinasto-sive boje na poledini za 2 nedelje. Micelija je sa valovitim krajevima koji kulturi daju karnerasti izgled. Loptasti piknidi su uronjeni u supstrat (vide se kao okrugle crne strukture na zaleđini Petri sudova) masovno se formiraju od sredine kolonije za 7-14 dana na 5-25°C u mraku. Površinski, soliterni piknidi formiraju se 3-4 nedelje nakon inkubacije, prekrivajući celu površinu kolonije. Kada se kulture prebace na WA sa sterilnim četinama Lavsonovog pačempresa ili *P. nigra* četinama one formiraju brojne piknide na površini agara, uronjene u medijum ili se oni formiraju na površini izbojaka/četina.

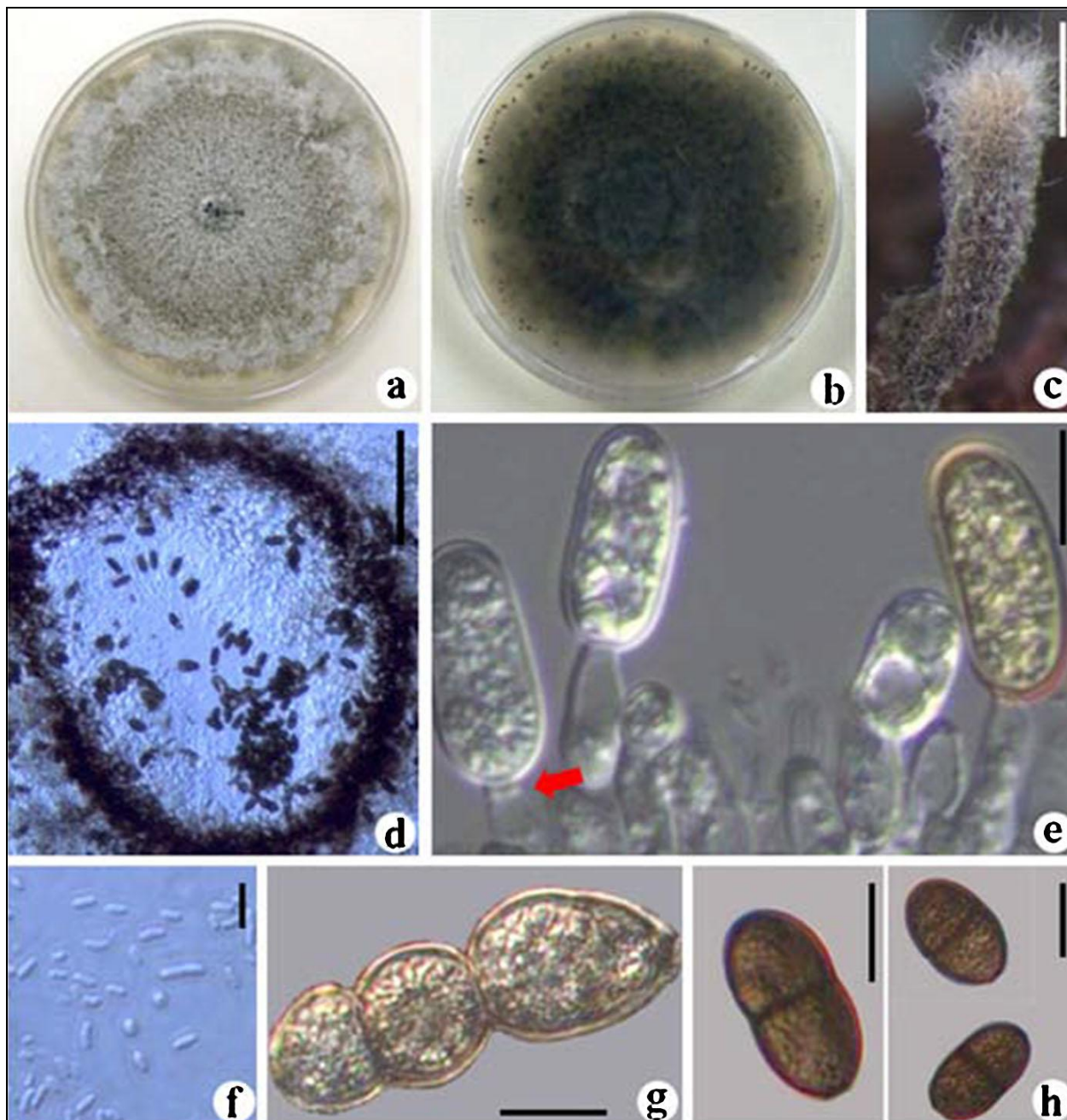
*Kardinalne temperature za razvoj:* Min. 5°C i max. 35°C. Optimalni porast na 25°C. Porast od 10.7 mm dnevno na optimalnoj temperaturi, kolonije prekrivaju 90 mm diam. Petri sudove nakon 6 dana u mraku.

*Seksualni izgled:* Nije viđen.

*Poznati domaćini:* *Thuja plicata*, *Cedrus atlantica*.

*Poznata distribucija:* Srbija (Beograd).

*Pregledani izolati:* Srbija, Beograd, smolava lezija na grani *T. plicata*, Jun 2011, M. Zlatković (PREM 60884, žive kulture CMW 39123 = CBS 135623). Srbija, Beograd, smolave, suve četine *C. atlantica*, Jun 2011, M. Zlatković (žive kulture CMW 39122=CBS 135622). Srbija, Beograd, nekrotična smolava lezija na *C. atlantica*, Jun 2011, M. Zlatković/I. Milenković (živa kultura CMW 39371). Srbija, Beograd, suve, smolave četine *C. atlantica*, Jun 2011, M. Zlatković (živa kultura CMW 39372). Srbija, Beograd, plodonosna tela na suvoj grani *C. atlantica*, Jun 2011, M. Zlatković (živa kultura CMW 39373).



**Fig. 4.** Morfološke karakteristike *Dothiorella* sp. 1 (CMW 39123 = CBS 135623). **a.** 14 dana stara kultura koja raste na MEA na 25°C (prednja površina); **b.** 14 dana stara kultura koja raste na MEA na 25°C (zadnja površina) sa loptastim piknidima uronjenim u kulturu; **c.** Površinski, pojedinačni piknidi sa izduženim vratom koji se formiraju na izbojcima Lavsonovog pačempresa nakon 6 nedelja pod UV svetlom; **d.** Vertikalni presek kroz piknid koji pokazuje višestruke slojeve hijalinskih ćelija koje oblažu piknidijsku šupljinu; **e.** Konidija u razvoju i konidiogene ćelije sa ožiljcima (annulations) (strelica); **f.** Spermacije; **g.** Hlamidospore; **h.** Jedno-septirane tamne konidije sa hrapavim spoljnim zidom. Razmera c = 1 cm, e, g, h = 10  $\mu$ m, f = 3  $\mu$ m.

*Beleške:* Izolati *Dothiorella* sp. 1 i *Dothiorella symphoricarposicola* W.J. Li, J.K. Liu & K.D. Hyde formirali su sub-kladu (bootstrap podrška BS=97 % MP) među *Dothiorella* vrstama u filogenetskim analizama. Razdvajanje *Do. symphoricarposicola* od njenog sestrinskog taksona bilo je snažno podržano u analizama kombinacije četiri dela gena (BS = 99 % MP), kao i u pojedinačnim MP analizama TEF-1-a (BS = 98 %). *Do. symphoricarposicola* se takođe razlikuje morfološki od *Dothiorella* sp. 1 po njenim mnogo manjim piknidima (200–250 µm preč., 250–300 µm visina) u poređenju sa *Dothiorella* sp. 1 (200 µm–1000 µm preč., 250 µm–3000 µm vis.), manjim konidiogenim ćelijama (4–12 × 1.5–6) µm u poređenju sa *Dothiorella* sp. 1 (8–15 × 3–6) µm, tipom nastanka konidija (phialidični) u poređenju sa *Dothiorella* sp. 1 (anelidični ili fijalidični) i manjim konidijama sa glatkim zidovima (pros. 17 × 8) µm u poređenju sa većim konidijama sa hrapavim spoljnim zidom *Dothiorella* sp. 1 (20.3 × 9 i 21 × 10.1) µm. Morfološki, konidije *Dothiorella* sp. 1 slične su konidijama *Dothiorella sempervirentis* Abdollahz., Zare & A.J.L. Phillips i *Dothiorella longicollis* Pavlic, T.I. Burgess & M.J. Wingf. i piknidi podsećaju na piknide *Do. longicollis* i *Dothiorella moneti* K. Taylor, Barber, G.E. Hardy & T. I. Burgess. Ipak, *Dothiorella* sp. 1 se može izdvojiti u odnosu na ove vrste po hrapavom spoljašnjem zidu konidija i širim piknidima sa dužim vratovima.

***Dothiorella sarmentorum*** (Fr.) A.J.L. Phillips, J. Luque & A. Alves, Mycologia 97: 522. 2005.  
Fig. 3, 5, 8, 9. Tabele 1, S2

= *Botryosphaeria sarmentorum* A.J.L. Phillips, J. Luque & A. Alves, Mycologia 97: 522. 2005.

*Pregledani izolati:* Srbija, Beograd, nekrotična lezija u pridanku stabla *Aesculus hippocastanum*, I. Milenković (živa kultura CMW 39366). Srbija, Beograd, smolava lezija na grani *Chamaecyparis lawsoniana*, M. Zlatković (živa kultura CMW 39364). Srbija, Beograd, smolava rak rana na *C. atlantica*, M. Zlatković (živa kultura CMW 39370).

*Beleške:* Phillips i sar. (2005) pokazali su da se *Dothiorella* vrste razlikuju od *Diplodia* vrsta po tome što imaju konidije koje su tamne i 1-septirane dok su još u piknidijskoj šupljini, često dok se još nalaze na konidiogenim ćelijama, dok kod *Diplodia* vrsta konidije postaju tamne i septirane tek nakon njihovog oslobađanja iz piknida. U ovom istraživanju, konidije su većinom ostale hijalinske dugo nakon oslobađanja i postale 1–3 septirane i često sa hrapavom površinom sa starenjem.

## ***Dothiorella* sp. 2**

*Sin-aseksualni izgled: Dichomera-slični, Fig. 3, 5, 8, 9. Tabele 1, S2*

Konidije *Dichomera sin-aseksualnog* izgleda gljive ovalne, ovoidne ili elipsoidne, doliformne, muriformne  $11-14 \times 6-8$  (pros.  $13 \times 6.6$ , l/w 2)  $\mu\text{m}$ , zlatno braon boje sa 2 do 4 transferzalnih septi, 0 do 2 longitudinalne septe i 0 do 1 oblik septe. Konidije sa intermedijarnom morfologijom između *Dothiorella* i *Dichomera* zlatno braon do tamno braon boje, sa 1–3 transferzalne septe, snažno sužene kod srednje septe,  $20-32 \times 7-12$  (pros.  $21.5 \times 8.2$ , l/w 2.6)  $\mu\text{m}$ .

*Pregledani izolati:* Crna Gora, Podgorica, plodonosna tela na suvoj grani *C. sempervirens*, Februar 2010, M. Zlatković/J. Lazarević (živa kultura CMW 39361, proizvodi muriformne konidije i konidije sa morfologijom između *Dothiorella* spp. and *Dichomera* spp.). Srbija, Beograd, deo na prelazu između mrtvog i živog tkiva *Thuja occidentalis*, Novembar 2010, M. Zlatković (živa kultura CMW 39362). Srbija, Beograd, plavetnilo mrtvog drveta grane *C. lawsoniana*, Novembar 2010, M. Zlatković (živa kultura CMW 39363). Bosna i Hercegovina, nekrotirana lezija na grani *Fraxinus excelsior*, April 2012, D. Karadžić (živa kultura CMW 39360).

*Beleške:* Ovu vrstu su u rod *Dothiorella* svrstali Phillips i sar. (2008), a zatim su je izolovali Piškur i sar. (2011), ali je gljiva ostala neimenovana jer su izolati dobijeni u ovim istraživanjima bili sterilni, te je smatrano da nisu autentični. *Dothiorella* sp. 2 od nedavno proučavaju drugi autori (Abdollahzadeh i sar. 2014) te vrsta ovde nije opisana. U ovom istraživanju, konidije aseksualnog oblika gljive, *Dichomera*-slične konidije sin-aseksualnog oblika i konidije koje su po svojoj morfologiji između *Dichomera* i *Dothiorella* uočene su u istom piknidu. Intermedijarne konidije su morfološki bile slične sporama sa kombinacijom morfologije *Dichomera* i *Fusicoccum* opisanih od strane Butin (1993). Način konidiogeneze koja daje muriformne konidije nije mogao biti uočen.



*Botryosphaeria dothidea* (Moug. ex Fr.) Ces. & De Not., Comm. Soc. Crittog. Ital. 1: 212 (1863). Fig. 3, 5, 6, 7, 8, 9. Tabele 1, S2

= *Fusicoccum aesculi* Corda, in Sturm Deutschl. Fl. 3: 111 (1829).

*Sin-aseksualni izgled: Dichomera-slični*

*Piknidi Dichomera sin-aseksualnog izgleda* gljive sa dugim vratom,  $200\text{--}250 \times 350\text{--}400 \mu\text{m}$ , prekriveni sivom micelijom. *Konidiofori* redukovani do konidiogenih ćelija. *Konidiogene ćelije* hijalinske, glatke, cilindrične, proliferišu perkurentno i tom prilikom daju 1–2 ožiljka,  $16\text{--}19 \times 3\text{--}4 \mu\text{m}$ . *Konidije* okrugle ili ovalne, piriformne ili limoniformne, sa zaravnjenom bazom, zaobljenim ili tupim vrhom, debelozidne, sa starenjem postaju tamne i sa hrapavim zidom,  $8.4\text{--}15 \times 5\text{--}7.8$  (pros.  $12.5 \times 6.4$ , l/w 1.9)  $\mu\text{m}$  ili su ovoidne ili elipsoidne, doliformne, muriformne,  $8.6\text{--}12.7 \times 4.7\text{--}6$  (pros.  $10.6 \times 5.4$ , l/w 2)  $\mu\text{m}$ , zlatno braon boje sa 1 do 4 transferzalne septe i 0 do 1 oblik septe.

*Pregledani izolati:* Srbija, Valjevo, smolava kora *Sequoiadendron giganteum*, April 2011, M. Zlatković (isolat CMW 44982, proizvodi muriformne konidije). Srbija, Beograd, granica zdravog i ubijenog tkiva *Pseudotsuga menziesii*, Jun 2011, M. Zlatković (živa kultura CMW 39302). Srbija, Beograd, granica između zdravog i ubijenog tkiva izbojka *Sequoia sempervirens*, Septembar 2011, M. Zlatković/A. Knezević (živa kultura CMW 39304, proizvodi tamne piriformne konidije). Srbija, Valjevo, suve smolave četine *S. giganteum* još uvek na stablu, April 2011, N. Keča (živa kultura CMW 39308).

*Beleške:* Hijalinske fuziformne konidije tipične za *Botryosphaeria* u ovom istraživanju formirale su 1–3 septe pre klijanja ili sa starošću u poređenju sa konidijama opisanim od strane Phillips i sar. (2013) koje su bile hijalinske, aseptirane i retko kada su formirale najviše jednu septu. Prema Phillips i sar. (2013), *Botryosphaeria* vrste imaju hijalinske spore koje mogu povremeno postati tamne sa starenjem. Mi smo povremeno zapazili spore tamnih zidova čak i u ranoj fazi njihovog razvoja i često dok se još uvek nalaze na konidiogenim ćelijama.

*Dichomera-slični sin-aseksualni izgled* gljive iz ovog istraživanja bio je morfološki različit od onih koji su predhodno opisani (Barber i sar. 2005; Inderbitzin i sar. 2010; Slippers i sar. 2014). Izolat CMW 39304 je proizveo hijalinske fuziformne konidije, tamne fuziformne konidije i tamne *Dichomera-slične* piriformne ili limoniformne konidije u istom piknidu. Piriformne konidije bile su hrapavih zidova i aseptirane u poređenju sa konidijama opisanim od strane

Slippers i sar. (2014). Ovaj izolat proizveo je i neobične piknide dugog vrata. Piknidi izolata CMW 44982 sadržali su hijalinske fuziformne konidije tipične za *Botryosphaeria* ili ovoidne ili elipsoidne muriformne konidije tipične za *Dichomera* spp., ali jedinstvene u pogledu veličine i oblika u poređenju sa predhodno opisanim konidijama.

*Neofusicoccum parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips, Stud. Mycol. 55: 248. 2006. Fig. 3, 5, 7, 8, 9. Tabele 1, S2

= *Botryosphaeria parva* Pennycook & Samuels, Mycotaxon 24: 455. 1985.

*Pregledani izolati:* Crna Gora, Bar, rak rana na stablu *Eucalyptus globulus*, Jun 2011, M. Zlatković (živa kultura CMW 39317). Srbija, Beograd, margina između zdravog i suvog dela grane *C. lawsoniana*, April 2010, N. Keča/M. Zlatković (živa kultura CMW 39318). Crna Gora, Budva, diskolorisano drvo grane *Prunus laurocerasus*, July 2011, M. Zlatković (živa kultura CMW 39321). Crna Gora, Herceg Novi, margina između zdravog i suvog izbojka *Pittosporum tobira*, Jun 2011, M. Zlatković (živa kultura CMW 39328). Srbija, Beograd, nekrotična lezija na stablu *A. hippocastanum*, Mart 2011, I. Milenković (živa kultura CMW 39325). Crna Gora, Herceg Novi, rak rana sa curenjem tamnog eksudata *E. globulus*, Jun 2011, M. Zlatković (živa kultura CMW 39326).

*Beleške:* Konidije *N. parvum* iz ovog istraživanja postajale su 1–3 septirane sa starenjem, a ne 2-septirane kako je bilo opisano u predhodnim istraživanjima (Phillips i sar. 2013). Takođe, izolat CMW 39318 obrazovao je hijalinske, fuziformne konidije tipične za *Neofusicoccum* i manje, tamno braon, elipsoidne konidije u istom piknidu, dimenzija 6.8–12.4 × 3.7–13.4 (pros. 10.3 × 8.4, l/w 1.2) µm. Tamne elipsoidne, *Dichomera*-slične konidije uočene u ovom istraživanju bile su različite po veličini i obliku od muriformnih delimično okruglih ili obpiriformnih konidija aseksualnog izgleda gljive opisanog u predhodnim istraživanjima (Barber i sar. 2005; Crous i sar. 2006; Phillips i sar. 2013).

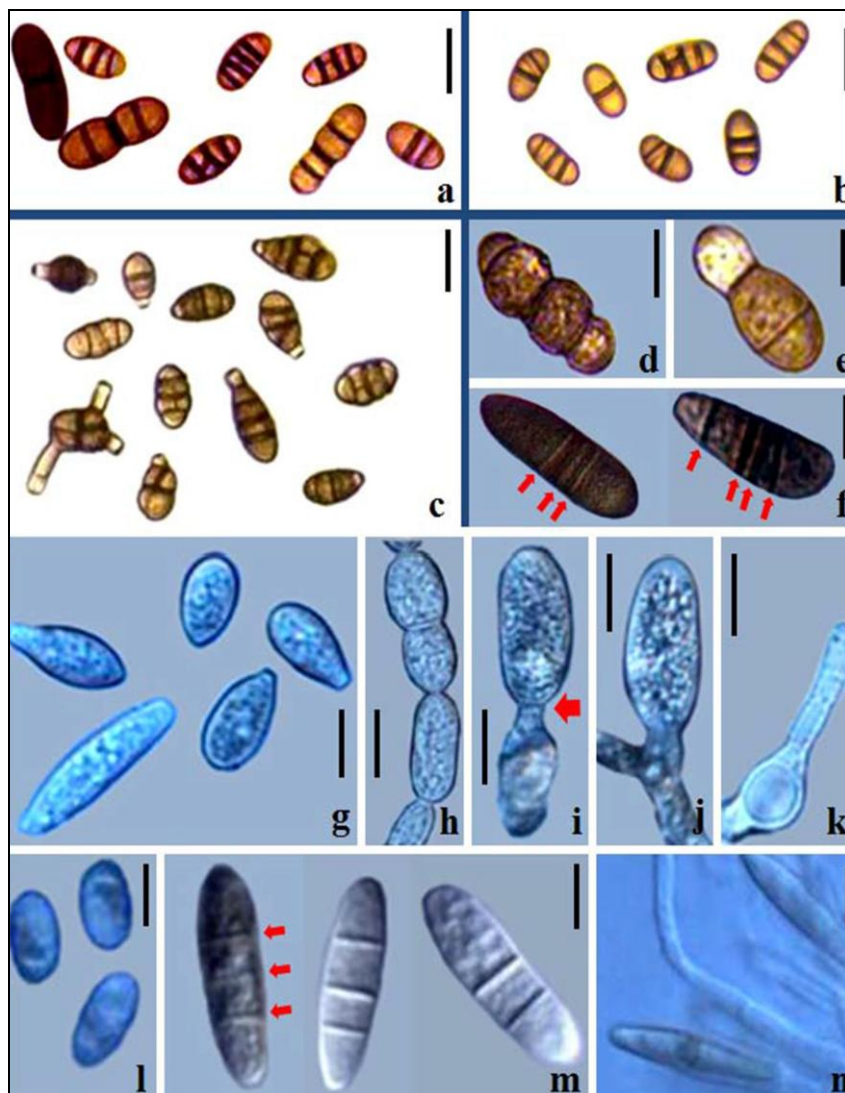
*Diplodia sapinea* (Fr.) Fuckel, Jb. Nassau. Ver. Naturk. 23–24: 393. 1870. Fig. 3, 5, 6, 8, 9.  
Tabele 1, S2

*Sin-aseksualni izgled: Dichomera-slični*

Konidije *Dichomera sin-aseksualnog* izgleda gljive varijabilnog i nepravilnog oblika, uglavnom obpiriformne, batinaste, elipsoidne, muriformne, sa 0 do 4 transverzalne, 0 to 2 longitudinalne i 0 do 2 oblik septe,  $10.1\text{--}19.7 \times 5.6\text{--}10.1$  (pros.  $15.1 \times 7.8$ , l/w 1.9)  $\mu\text{m}$ , povremeno sa 1 do 3 repa,  $3\text{--}17 \times 3\text{--}5 \mu\text{m}$ .

*Pregledani izolati:* Srbija, planina Tara, smolava peteljka šišarice *Picea omorika*, April 2012, D. Karadžić (izolat CMW 44981, proizvodi muriformne konidije). Srbija, Beograd, smolave rane na grani *P. omorika*, Septembar 2011, M. Zlatković/A. Knežević (živa kultura CMW 39346). Srbija, Beograd, smolavo drvo *C. atlantica*, May 2011, M. Zlatković (živa kultura CMW 39338). Crna Gora, Podgorica, smolavo drvo *Cedrus deodara*, Septembar 2011, M. Zlatković (živa kultura CMW 39341).

*Beleške:* U ovom istraživanju, konidije su bile retko kada aseptirane i uglavnom su bile 1–4 septirane i ponekad isto tako sa 3 horizontalne i jednom oblik septom, u poređenju sa predominantno aseptiranim i samo ponekad najviše 1-septiranim konidijama opisanim od strane Phillips i sar. (2013). Izolat CMW 44981 formirao je *Dichomera*-slične konidije i tamne, ovalne, 0–2 septirane *Diplodia*-slične konidije u istom piknidu. *Diplodia sapinea* kolonije tipično imaju sivu, pufnastu miceliju (Palmer i sar. 1987). Ipak, izolat CMW 39338 obrazovao je kolonije sa ravnim, gustim micelijским pokrivačem.



**Fig. 5.** Jedinствене морфолошке карактеристике Botryosphaeriaceae врста идентификованих у овом истраживању; **a.** *Dothiorella* konidije, *Dichomera* konidije i konidije sa morfoloģijom između *Dothiorella* i *Dichomera* gljive *Dothiorella* sp. 2 CMW 39361; **b.** *Dichomera* konidije *Botryosphaeria dothidea* CMW 44982; **c.** *Dichomera* konidije *Diplodia sapinea* CMW 44981; **d.** Konidijalne hlamidospore *D. sapinea* CMW39338; **e.** Cilindrična konidija *D. mutila* CMW 39354; **f.** Tri-septirane i četiri-septirane konidije (strelice) *D. sapinea* CMW 39338; **g.** *Dichomera*-slične piriformne konidije sa tamnim zidovima *B. dothidea* CMW 39304; **h.** Hlamidospore *Phaeobotryon cupressi* CMW 39387; **i.** Konidiogene ćelije sa ožiljcima (strelica) i konidija u razvoju *P. cupressi* CMW 39387; **j.** Razgranati konidiofor sa konidijom u razvoju *P. cupressi*; **k.** Široko ampuliformne konidiogene ćelije *P. cupressi* koje se sužavaju tako da formiraju dugi vrat; **l.** Elipsoidne konidije tamnih zidova *Neofusicoccum parvum* CMW 39325; **m.** Hijalinske i tamne konidije (strelice) *B. dothidea* CMW 39302 sa dve ili tri septe; **n.** Fuziformne konidije tamnih zidova u fazi nastanka i jedno-septirane parafize *B. dothidea* CMW 39302. Razmera a–f, h–k = 10 μm, g, l–n = 5 μm.

***Diplodia mutila*** (Fr.) Mont., Ann. Sci. nat., sér. 2, 1: 302. 1834.

Fig. 3, 5, 6, 7, 8, 9. Tabele 1, S2

= *Botryosphaeria stevensii* Shoemaker, Canad. J. Bot. 42: 1299. 1964.

*Pregledani izolati:* Srbija, Obrenovac, nekrotična lezija na stablu *A. hippocastanum*, Jun 2011, D. Karadžić (živa kultura CMW 39356). Crna Gora, Herceg Novi, plodonosna tela na šišarici *Cupressus arizonica*, Septembar 2011, M. Zlatković (živa kultura CMW 39353). Crna Gora, Herceg Novi, rak rana na grani *Pinus halepensis*, Jul 2011, M. Zlatković (živa kultura CMW 39354).

*Beleške:* Izolati pregledani u ovom istraživanju povremeno su proizvodili kako tipične hijalinske ovalne ili ovoidne konidije, tako i cilindrične konidije snažno sužene u septi sa jednom belom ćelijom i 1–2 tamno braon ćelije, dimenzija 25–29 × 8.5–9.4 μm. Hijalinske konidije iz ovog istraživanja bile su često 1–2 septirane i postajale su tamne 0–2 septirane sa starenjem.

***Diplodia seriata*** De Not., Micr. Ital. Dec. 4: 6. 1942.

Fig. 3, 6, 7, 8, 9. Tabele 1, S2

= *Botryosphaeria obtusa* (Schwein.) Shoemaker, Canad. J. Bot. 42: 1298. 1964.

*Pregledani izolati:* Srbija, Beograd, smolava lezija na grani *T. occidentalis*, Maj 2011, M. Zlatković (živa kultura CMW 39384). Bosna i Hercegovina, margina između zdravog i suvog dela stabljike *Rubus fruticosus*, Maj 2010, D. Karadžić (živa kultura CMW 39385). Srbija, Crvena reka, smolava suva grana *T. occidentalis*, Maj 2011, M. Zlatković (živa kultura CMW 39377). Srbija, Beograd, suve, smolom natopljene četine na stablu *C. atlantica*, Jun 2011, M. Zlatković (živa kultura CMW 39378). Beograd, Srbija, nekrotične četine sadnica *Chamaecyparis pisifera*, April 2011, M. Zlatković (živa kultura CMW 39376). Bosna i Hercegovina, nekrotična lezija na stablu *F. excelsior*, Jun 2012, D. Karadžić (živa kultura CMW 39374). Srbija, Beograd, rak rana na *Ligustrum vulgare*, October 2011, M. Zlatković (živa kultura CMW 39379).

*Beleške:* U ovom istraživanju konidije su često sa starenjem postajale tamne 1–3 septirane i sa grubom spoljašnjom površinom. Takođe, neke konidije postajale su septirane, a nisu postajale tamne.

*Sphaeropsis visci* (Alb. & Schwein.) Sacc., Michelia 2: 105. 1880.

Fig. 3, 6, 7, 8, 9. Tabele 1, S2

= *Phaeobotryosphaeria visci* (Kalchbr.) A.J.L. Phillips & Crous, Persoonia 21: 47. 2008.

*Pregledani izolati*: Srbija, planina Goč, plodonosna tela na listovima *V. album*, N. Keča (živa kultura CMW 39386).

*Beleške*: Piknidi prouzvedeni u ovom istraživanju bili su delimično uronjeni u tkivo četina/izbojaka i nikada površinski kako je predhodno opisano (Phillips i sar. 2013). Takođe, konidije su bile veće od onih koje su predhodno opisane, bile su često sferične ili elipsoidne [(27–56 × 17–36 (pros. 42.6 × 25)] μm, postajući sa starenjem zlatno braon a kasnije tamno braon i 1–2 septirane.



**Fig. 6.** Morfološke karakteristike Botryosphaeriaceae vrsta identifikovanih u ovom istraživanju. **a.** Aseptirane i 1-septirane konidije *Sphaeropsis visci* CMW 39386; **b.** Hijalinske aseptirane i tamne 1-septirane konidije *Diplodia mutila* CMW 39348; **c.** Aseptirane i 1-3 septirane konidije hrapavog zida *D. sapinea* CMW 39338 i hijalinske spermacije prut-izgleda; **d.** 1-2 septirane konidije hrapavog zida *D. seriata* CMW 39374; **e.** Hlamidospore *Phaeobotryon cupressi* CMW 39387; **f.** Konidije i spermacije *Botryosphaeria dothidea* CMW 39304; **g.** Ukrasi hifa. Razmera: a-g=10μm.

*Phaeobotryon cupressi* Abdollahz., Zare & A.J.L. Phillips, Persoonia 23: 6. 2009.

Fig. 3, 5, 6, 8, 9. Tabele 1, S2

*Pregledani izolati:* Crna Gora, Podgorica, smolava lezija na grani *Cupressus sempervirens*. M. Zlatković/J. Lazarević (živa kultura CMW 39387).

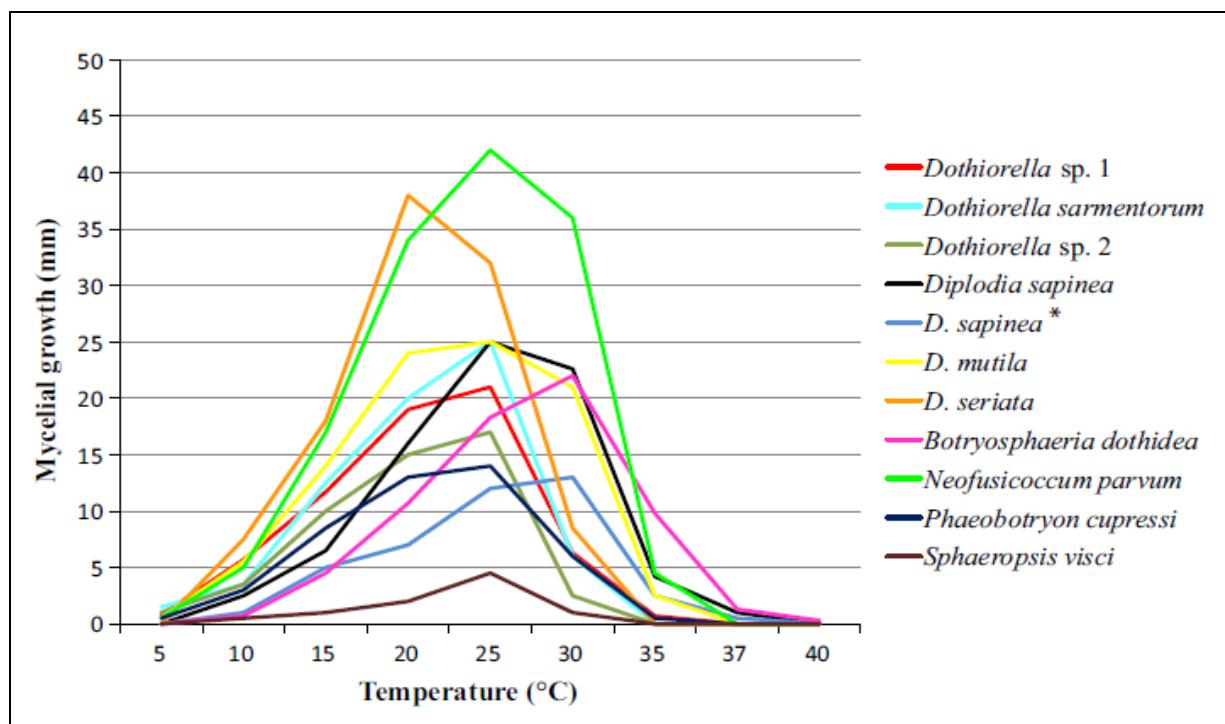
*Beleške:* Izolat dobijen u ovom istraživanju povremeno je proizvodio konidiofore koji nisu bili zapaženi u predhodnim kolekcijama. Konidiofori su bili hijalinski, cilindrični, povremeno razgranati, dimenzija,  $14-18 \times 4-5 \mu\text{m}$ . Konidiogene ćelije uočene u ovom istraživanju bile su povremeno široko ampuliformne, često se sužavajući u  $20 \mu\text{m}$  duge vratove, sa unutrašnjom proliferacijom, ali i sa perkurentnom proliferacijom koja stvara ožiljke. Konidije su u ovom istraživanju obrazovale do 2 septe pre klijanja.



**Fig. 7.** Piknidi Botryosphaeriaceae vrsta identifikovanih u ovom istraživanju. **a.** Botriozne agregacije *Botryosphaeria dothidea* (CMW 39304) piknida sa belim unutrašnjim sadržajem; **b.** Multilokularni piknid *B. dothidea* (CMW 39310) kroz čije pore izlaze spore u masi; **c.** Piknid sa dugim vratom *B. dothidea* (CMW 44982); **d-e.** Piknid *Neofusicoccum parvum* (CMW 39318) koji oslobađa spore u vidu kremastog crvuljka; **f.** Delimično erumpivan piknid *Spaheropsis visci* (CMW 39386); **g.** Erumpitivni piknidi *Diplodia mutila* (CMW 39349); **h.** Piknidi *D. seriata* (CMW 39380) proizvedeni na površini voda agar podloge. Razmera: a, f-h= 200 $\mu\text{m}$ ; c-e= 50 $\mu\text{m}$ .

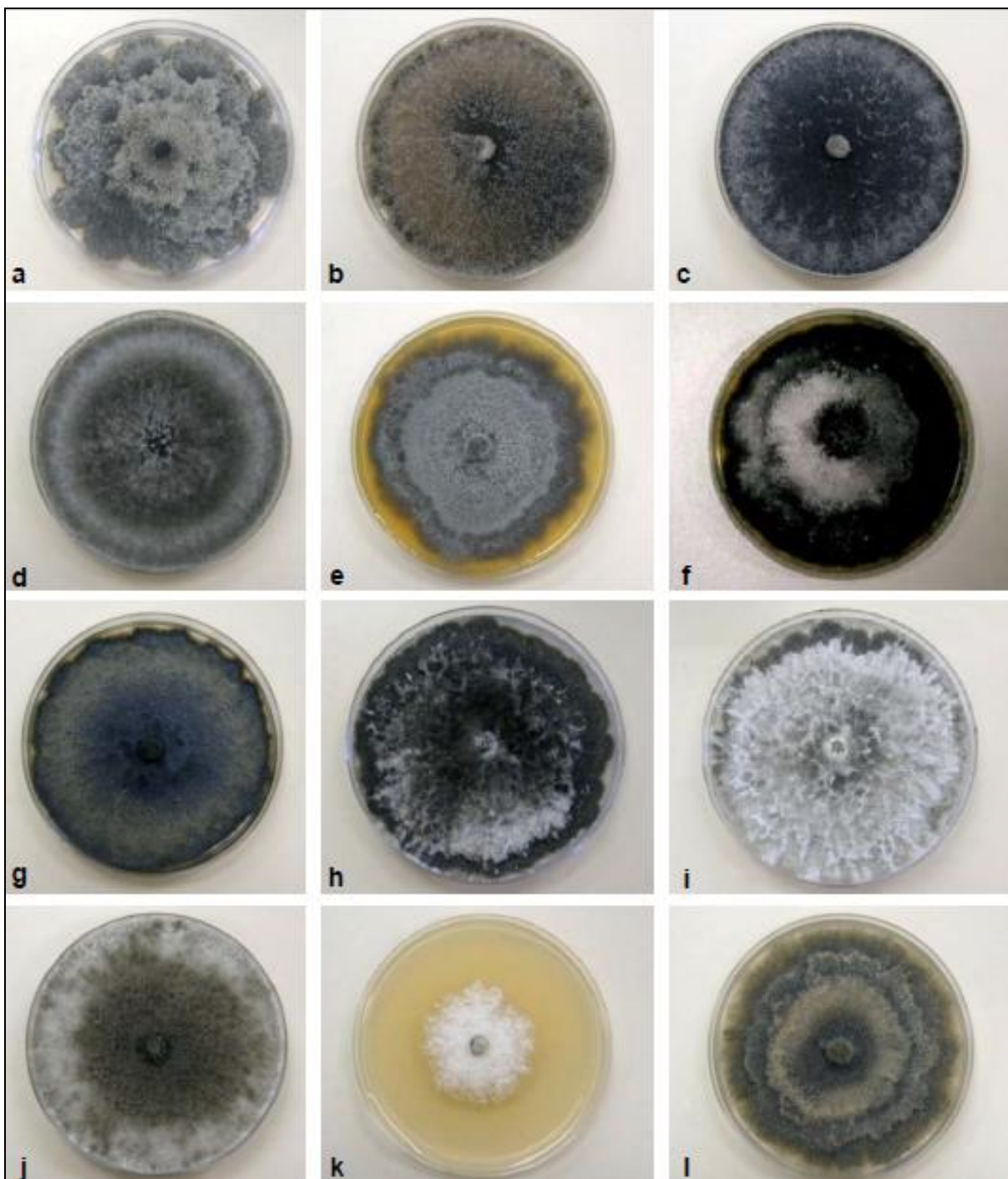
### 3.4.3. Porast micelije na različitim temperaturama

*Botryosphaeriaceae* vrste rasle su na različitim temperaturama od 5°C to 40°C. Jedino je *B. dothidea* rasla na 40°C. *D. sapinea*, *D. seriata*, *B. dothidea* and *S. visci* nisu rasle na 5°C, dok *Do. sarmentorum*, *Dothiorella. sp. 2*, *D. seriata* i *S. visci* nisu rasle na 35°C. Postojale su statistički značajne razlike u optimalnoj temperaturi za porast micelije i porasta micelije ( $p < 0.05$ ) na optimalnoj temperaturi kod različitih vrsta. Optimalna temperatura iznosila je 20-25°C (*D. mutila*, *P. cupressi*) do 30°C (*D. sapinea* CMW 39388, *B. dothidea*) i optimalna temperatura većine vrsta bila je 25°C. Pri njihovim optimalnim temperaturama, *N. parvum* imao je najbrži porast od 21 mm/dan, dok je porast *S. visci* bio najsporiji i iznosio je 2.3 mm/dan (Fig. 8, 9).



**Fig. 8.** Porast micelije *Botryosphaeriaceae* vrsta nakon 3 dana u mraku. \*Ukazuje na *D. sapinea* CMW 39388. Vrednosti porasta su date kao srednje vrednosti osim u slučaju *D. sapinea*\*.





**Fig. 9.** 14-dana stare kulture *Botryosphaeriaceae* vrsta koje rastu na MEA podlozi na 25°C u mraku. **a.** *Dothiorella* sp. 2 (CMW 39362); **b.** *Do. sarmentorum* (CMW 39364); **c.** *Diplodia seriata* (CMW 39374); **d-f.** *D. sapinea* (CMW 39346, CMW 39338, CMW 44981); **g.** *D. mutila* (CMW 39354); **h-i.** *Botryosphaeria dothidea* (CMW 39300, CMW 39304); **j.** *Neofusicoccum parvum* (CMW 39318); **k.** *Sphaeropsis visci* (CMW 39386); **l.** *Phaeobotryon cupressi* (CMW 39387).

### 3.5. Diskusija

Ovo istraživanje predstavlja prvi pokušaj utvrđivanja prisustva i identiteta *Botryosphaeriaceae* vrsta izolovanih iz obolelog ukrasnog drveća na području Zapadnog Balkana. To je isto tako i prvo istraživanje o *Botryosphaeriaceae* gljivama na velikom broju domaćina koji rastu na ovom području. Identifikovano je deset *Botryosphaeriaceae* vrsta iz šest rodova u Srbiji, Crnoj Gori i Bosni i Hercegovini. Identifikovano je osam poznatih vrsta (*B. dothidea*, *N. parvum*, *D. sapinea*, *D. mutila*, *D. seriata*, *Do. sarmentorum*, *P. cupressi* i *S. visci*) i dve predhodno neimenovane vrste iz roda *Dothiorella*. Sa izuzetkom *P. cupressi* i *S. visci*, spektar domaćina predhodno poznatih *Botryosphaeriaceae* vrsta znatno je proširen. Najčešće izolovane vrste bile su *B. dothidea*, *D. sapinea* i *N. parvum* dok su ostale vrste izolovane samo povremeno.

*Botryosphaeria dothidea* je bila jedna od najčešće izolovanih vrsta, što nije tako iznenađujuće ako se uzme u obzir činjenica da je ova gljiva zabeležena na velikom broju drvenastih vrsta širom sveta (Phillips i sar. 2013). Na području Balkana, predhodno je bilo zabeleženo da *B. dothidea* izaziva bolest na *O. carpinifolia* u Sloveniji (Piškur i sar. 2011), belu trulež plodova jabuke u Srbiji (Vasić i sar. 2013) i trulež masline u Crnoj Gori (Latinović i sar. 2013). Ova vrsta izolovana je i iz oraha, pistaća i plodova kivija u Grčkoj (Inderbitzin i sar. 2010; Thomidis i Exadactylou 2010; Chen i sar. 2014b) i (na osnovu morfološke identifikacije) iz *S. giganteum*, *Quercus petraea*, *Quercus cerris*, *Fagus sylvatica*, *Populus x euramericana* cl. I-214, *C. sempervirens* i *P. halepensis* iz Srbije i Balkana (Karadžić i sar. 2000). Iako je *B. dothidea* generalist, gljiva je samo povremeno izolovana iz golosemenica (eng. gymnosperms). Zbog toga je interesantno što je u ovom istraživanju gljiva po prvi put izolovana iz dve četinarske vrste, *P. menziesii* i *S. sempervirens*.

Poznati patogen *Pinus* spp., *D. sapinea* (Swart i Wingfield 1991, Phillips i sar. 2013) izolovan je iz tri četinara u ovom istraživanju i to iz *C. atlantica*, *C. deodara* i *P. omorika*, a *P. omorika* je pri tom i novi domaćin ove gljive. Predhoni podaci o ovoj gljivi sa područja Balkana odnosili su se samo na identifikaciju gljive uz pomoć morfoloških karakteristika konidija i kultura (Karadžić i Milijašević 2008). *D. sapinea* je samo povremeno izolovana iz četinara koji ne pripadaju rodu *Pinus* spp. (Gibson 1979), dok je poznato da se sestrinska vrsta *D. scrobiculata* javlja na većem broju domaćina (Phillips i sar. 2013). Ova veza je od posebne važnosti za Pančičevu omoriku (*P. omorika*), vrstu koja je endemična i javlja se samo na

krečnjačkim planinama u Srbiji i Bosni i Hercegovini. Ova vrsta je u opasnosti od izumiranja zbog svoje ograničene geografske distribucije, promene klime i gubitka genetičkog diverziteta (Alberto i sar. 2013), i vrsta se zbog toga nalazi na IUCN crvenoj listi ugroženih vrsta (<http://www.iucnredlist.org/>, Juli 2015). Nije poznato ja da li je gljiva *D. sapinea* patogena prema *P. omorika* i to je potrebno utvrditi u budućnosti.

Vrsta generalist *N. parvum* često je izolovana u ovom istraživanju. Ova gljiva izolovana je iz brojnih drvenastih vrsta u šumi, plantažama i urbanim sredinama, uključujući *Quercus suber*, *Eucalyptus* spp., *Populus* spp., *Salix* spp., *T. plicata*, *Rhododendron* spp. i *S. giganteum* (Phillips i sar. 2013). Česta izolacija ove gljive iz ukrasnog drveća u ovom istraživanju nije iznenađujuća. Gljiva je po prvi put zabeležena na *C. lawsoniana* i tri lišćarske ukrasne vrste i to *A. hippocastanum*, *P. laurocerasus* i *P. tobira*. *N. parvum* je široko rasprostranjena vrsta, nađena na šest kontinenata (Phillips i sar. 2013), ali je na Balkanu zabeležena samo na stablima pistaća i plodovima kivija u Grčkoj (Rumbos i Phillips 2005) i na vinovoj lozi u Hrvatskoj (Kaliterna i sar. 2013). Ovo istraživanje predstavlja prvi nalaz *N. parvum* u Srbiji i Crnoj Gori.

*Diplodia seriata* je u ovom istraživanju izolovana iz šumskog i ukrasnog drveća, što je u skladu sa predhodnim nalazima (Alves i sar. 2013; Luchi i sar. 2014). Ova gljiva je takođe bila i jedina *Botryosphaeriaceae* vrsta izolovana iz *R. fruticosus*, što je u skladu sa predhodnim nalazima ove gljive na voćkaricama (Damm i sar. 2007; Slippers i sar. 2007a; Cloete i sar. 2011). Spektar domaćina gljive *D. seriata* uključuje mnoge lišćarske vrste i samo mali broj četinarskih (Phillips i sar. 2013). U ovom istraživanju, gljiva je po prvi put izolovana iz tri skrivenosemenice i tri golosemenice (Tabela 1). Iako je *D. seriata* široko rasprostranjena vrsta, gljiva je na Balkanu izolovana samo iz maslina u Hrvatskoj (Kaliterna i sar. 2012) i ovo istraživanje predstavlja prvi nalaz ove vrste u Srbiji i Bosni i Hercegovini.

*Diplodia mutila*, *Do. sarmentorum* i *Dothiorella* sp. 2 su samo povremeno izolovane u ovom istraživanju. *D. mutila* je nađena na velikom broju domaćina uključujući ukrasne drvenaste vrste, (Phillips i sar. 2013), ali je u ovom istraživanju po prvi put zabeležena na *A. hippocastanum*, *P. halepensis* i *C. arizonica*. Iako je vrsta široko rasprostranjena (Phillips i sar. 2013), u ovom istraživanju gljiva je po prvi put nađena u Srbiji i Crnoj Gori. Ovo je takođe i prvi nalaz ove gljive na Balkanu. *Do. sarmentorum* je gljiva generalist (Phillips i sar. 2013), ali je samo jednom izolovana iz golosemenica (*Cupressus lusitanica*) od strane Alves i sar. (2013). U

ovom istraživanju, *Do. sarmentorum* je po prvi put izolovana iz četinara *C. lawsoniana* i *C. atlantica* i lišćara *A. hippocastanum*. *Do. sarmentorum* je vrsta sa velikom geografskom distribucijom (Phillips i sar. 2013), ali je u ovom istraživanju po prvi put zabeležena u Srbiji i na Balkanu. Neimenovana *Dothiorella* sp. 2 (CMW 39363, CMW 39362, CMW 39360) izolovana je iz četiri lišćarske vrste u predhodnim istraživanjima u Francuskoj, Italiji i Iranu (Phillips i sar. 2008; Piškur i sar. 2011; Abdollahzadeh i sar. 2014; Pitt i sar. 2015). U ovom istraživanju, gljiva je po prvi put zabeležena u Srbiji, Bosni i Hercegovini, Crnoj Gori i na Balkanu i izolovana po prvi put iz tri ukrasna četinara (*C. sempervirens*, *T. occidentalis* i *C. lawsoniana*) i jednog lišćara i to *F. excelsior*.

*Dothiorella* sp. 1 je povremeno izolovana u ovom istraživanju. Interesantno je da se spektar domaćina i geografska distribucija ovog taksona na izled ne poklapaju sa spektrom i distribucijom filogenetski bliske gljive *Do. symphoricarposicola*. *Dothiorella* sp. 1 izolovana je iz *Pinaceae* i *Cupressaceae* uključujući *C. atlantica* i *T. plicata* u Srbiji. *Do. symphoricarposicola* izolovana je jedino iz *Symphoricarpos* sp., lišćarskog žbuna u Italiji (Li i sar. 2014).

Po jedan izolat *S. visci* i *P. cupressi* dobijen u ovom istraživanju uključen je u filogenetske analize. *S. visci* se javlja samo na *V. album* u Evropi i to u krunama velikog broja drvenastih vrsta (Varga i sar. 2012; Phillips i sar. 2013). Ova veza patogen-domaćin potvrđena je i u ovom istraživanju. Vrsta je nađena u Mađarskoj (Varga i sar. 2012), Luksemburgu, Nemačkoj (Phillips i sar. 2008) i (na osnovu morfološke identifikacije) u Srbiji (Karadžić i sar. 2004). *P. cupressi* je vrsta nađena na *C. sempervirens* i *Juniperus scopulorum* u Iranu i u SAD (Phillips i sar. 2013) te nije iznenađujući podatak o izolaciji ove gljive iz *C. sempervirens* u Crnoj Gori.

Rezultati ovog istraživanja potvrđuju činjenicu da su morfološke karakteristike *Botryosphaeriaceae* vrsta slične u okviru različitih rodova i vrsta i stoga su od ograničene taksonomske vrednosti (Pavlic i sar. 2009; Slippers i sar. 2013, 2014; Phillips i sar. 2013). Muriformne spore *B. dothidea*, *Dothiorella* sp. 2 i *D. sapinea* bile su veoma slične i stoga nisu bile od značaja za identifikaciju vrsta. Slippers i sar. (2013) pokazali su da morfološke karakteristike *Botryosphaeriaceae* vrsta nisu konstantne pod različitim uslovima i kod različitih rodova. To bi objasnilo pojavu neobično malih, elipsoidnih konidija sa tamnim zidovima kod izolata *N. parvum*, konidija čiji zidovi postaju tamni dok se one još uvek nalaze na konidiogenim

ćelijama izolata *B. dothidea* ili *Dichomera*-sličnim sporama primećenih kod nekih izolata *B. dothidea*, *Dothiorella* sp. 2 i *D. sapinea*.

Bolesti koje deluju kao da su rezultat infekcije *Botryosphaeriaceae* vrsta u ovom istraživanju mogle bi biti uzrokovane klimatskim ekstermima. Stabla koja se sade u gradovima teže da budu posebno podložna negativnom efektu visokih letnjih temperatura usled tzv. “efekta toplog ostrva” i dodatnog stresa od zagađenog vazduha, ograničenog prostora za rast korenovog sistema i teške opreme i vozila koja se kreću i sabijaju zemljište, time redukujući nivo kiseonika dostupnog korenovom sistemu (Tubby i Webber 2010; Alameda i sar. 2012). Ovi uslovi bi doveli stabla u stanje stresa, čineći ih podložnim infekcijama. Ovo je u skladu sa činjenicom da su ove gljive poznate kao endofiti oportunisti koji uzrokuju bolest na stablima koja su izložena stresu (Slippers i Wingfield 2007b; Mehl i sar. 2013). Slično, Piškur i sar. (2011) zabeležili su neobičnu pojavu odumiranja *Ostrya carpinifolia* uzrokovanu *Botryosphaeriaceae* vrstama (pogotovu *B. dothidea*) u Sloveniji i Italiji nakon ekstremnih suša.

### **3.6. Zaključci**

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da se veliki diverzitet *Botryosphaeriaceae* vrsta javlja na ukrasnom drveću u zemljama Zapadnog Balkana, na geografski malom području. Distribucija ovih gljiva u istraživanom području i njihova česta izolacija iz rak rana i drugih simptomatičnih tkiva ukazuje na to da ove gljive verovatno doprinose odumiranju drveća uzorkovanog u ovom istraživanju. Činjenica da su *Botryosphaeriaceae* poznate kao gljive koje doprinose odumiranju stabala u uslovima stresa (Slippers i Wingfield 2007b; Mehl i sar. 2013) i prognozirani ekstremni uslovi temperature i suše (Tebaldi i sar. 2006; IPCC 2014) ukazuju na to da ove gljive zaslužuju dodatnu pažnju.

## 4. Novi i neočekivani domaćini gljive *Diplodia sapinea* na području Zapadnog Balkana

### 4.1. Uvod

*Diplodia sapinea* (Fr.) Fuckel (sin. *Diplodia pinea* (Desm.) Kickx., *Sphaeropsis sapinea* (Fr.: Fr.) Dyko & Sutton) je važan patogen borova (*Pinus* spp.) u različitim zemljama širom sveta (Punithalingam i Waterston 1970; Phillips i sar. 2013). Ova gljiva uzrokuje *Diplodia* sušenje (*Sphaeropsis* sušenje) i to sušenje četina i izbojaka, rak rane na granama i stablu, sušenje stabala sa vrha (eng. die-back), trulež pridanka, plavetnilo drveta i u ekstremnim slučajevima sušenje celog stabla (Sinclair i sar. 1987; Phillips i sar. 2013). Do šteta najčešće dolazi u rasadnicima, plantažama i to prvenstveno alohtonih vrsta i na borovima različite starosti u gradu (Gibson 1979; Swart i Wingfield 1991).

*Diplodia sapinea* izolovana je iz 33 vrste bora (npr. *Pinus nigra*, *Pinus sylvestris*, *Pinus radiata*) i samo je povremeno izolovana iz drugih četinara iz rodova *Abies*, *Picea*, *Pseudotsuga*, *Cedrus*, *Juniperus*, *Chamaecyparis*, *Araucaria*, *Thuja*, *Cupressus* i *Larix* (Punithalingam i Waterston 1970; Gibson 1979; Phillips i sar. 2013). Patogen je povremeno izolovan i iz skrivenosemenica i to iz *Malus domestica*, *Olea europaea*, *Eucalyptus* spp., *Blepharocalyx salicifolius* i *Prunus persica* (Bettucci i sar. 1999, 2004; Damm i sar. 2007; Lazzizzera i sar. 2008; Inderbitzin i sar. 2010). Ipak, *D. sapinea* se ne smatra važnim patogenom vrsta koje nisu borovi (Gibson 1979). *D. sapinea* se javlja i na autohtonim i na alohtonim vrstama drveća širom sveta. Ali najveća šteta zabeležena je na introdukovanim vrstama borova u Južnoj hemisferi i na autohtonim *P. sylvestris* i *P. nigra* u Evropi (Swart i Wingfield 1991; Jankovský i Palovčíková 2003; Blaschke i Cech 2007; Karadžić i Milijašević 2008). Ova gljiva je uzrokovala velike ekonomske gubitke u plantažama borova egzota u Južnoj Africi, Australiji, Novom Zelandu i SAD (Chou 1976; Swart i Wingfield 1991).

*Diplodia sapinea* je gljiva poznata kao endofit i latentni patogen koji živi u inficiranom tkivu domaćina bez pojave simptoma bolesti (Swart i Wingfield 1991; Stanosz i sar. 2007; Bihon i sar. 2011). Gljiva formira piknide na predhodno ubijenim izbojcima i zrelim šišaricama, koje zbog toga imaju važnu ulogu u preživljavanju gljive i služe kao izvor inokuluma (Palmer i sar.

1988). Konidije se rasejavaju vetrom i kišnim kapima tokom vegetacionog perioda, pogotovo tokom leta (Swart i sar. 1987a; Palmer i sar. 1988). Epidemije uzrokovane sa *D. sapinea* se generalno javljaju nakon što su biljke domaćini izložene stresu od visokih temperatura, suše, grada ili ukoliko su sadene na neodgovarajućem staništu (Swart i sar. 1987b; Stanosz i sar. 2001; Zwolinski i sar. 1990; Swart i Wingfield 1991). Predpostavlja se da je “topli talas” u leto 2003 izložio *P. sylvestris* i *P. nigra* infekciji od strane patogena oportuniste *D. sapinea* u Češkoj i Nemačkoj (Jankovský i Palovčíková 2003; Blaschke i Cech 2007). Fabre i sar. (2011) su zaključili da toplija klima i biljka domaćin utiču na povećanu patogenu aktivnost *D. sapinea* u Francuskoj. Jake suše zabeležene 2002 i 2006 i toplije zime u Estoniji, Letoniji i Severno-Zapadnoj Rusiji najverovatnije su doprinele proširenju areala *D. sapinea* i naseljavanju gljive u Severno Baltičkom području (Drenkhan i Hanso 2009; Adamson i sar. 2015).

U Evropi, *D. sapinea* je zabeležena kao opasni pathogen *P. nigra* i *P. sylvestris* u Holandiji 1982 (Dam i de Kam 1984). Patogen izaziva sušenje stabala sa vrha kod pretežno autohtonih borova u zemljama Južne i Jugoistočne Evrope (Carpeti i sar. 1987; Rossnev i Petkov 1994; Karadžić i Milijašević 2008), Centralne Evrope (Piou i sar. 1991; Cech i Carpetti 1995; Jankovský i Palovčíková 2003; Blaschke i Cech 2007) a nedavno je zabeležen i u zemljama Severne Evrope (Drenkhan i Hanso 2009; Adamson i sar. 2015).

U zemljama Balkana, *D. sapinea* je po prvi put zabeležena na *P. nigra* sadnicama u Hrvatskoj 1957 (Böhm 1959) a kasnije i na *P. nigra* sadnicama u Srbiji (Karadžić 1987). Ubrzo zatim, *Diplodia* sušenje zabeleženo je na stablima borova na određenom broju lokaliteta u Bugarskoj, Hrvatskoj, Crnoj Gori, Sloveniji i Srbiji (Rossnev i Petkov 1994; Diminić i Jurc 1999; Karadžić i Milijašević 2008). U Srbiji i Crnoj Gori, *D. sapinea* je postala najčešći uzročnik sušenja borova u plantažama i borova u gradskim sredinama (Karadžić i Vujanović 1992; Karadžić i Milijašević 2008). U Srbiji, gljiva je povremeno izolovana i iz *Abies concolor*, *Cedrus atlantica*, *Chamaecyparis lawsoniana*, *Thuja occidentalis*, *Cupressus sempervirens*, *Juniperus virginiana* i *Sequoiadendron giganteum* (Karadžić i Stojadinović 1988; Milijašević 2003, 2009). Ali simptomi bolesti i mortalitet nisu zabeleženi samo na boru, već i na drugim ukrasnim vrstama drveća i žbunja u regionu. Izolacije iz rak rana i drugih simptoma u istraživanju Zlatković i sar. (2016) dale su izolate deset *Botryosphaeriaceae* vrsta, uključujući *D. sapinea*, koja je izolovana iz obolelih stabala *C. atlantica*, *Cedrus deodara* i *Picea omorika*. U Srbiji i Crnoj Gori

vrsta je okarakterisana uz pomoć filogenije većeg broja genskih regiona i morfologije; opisan je *Dichomera*-slični sin-aseksualni izgled gljive, kao i neke jedinstvene morfološke karakteristike vrste i patogen je zabeležen po prvi put na *P. omorika* (Zlatković i sar. 2016).

## **4.2. Ciljevi istraživanja**

Cilj ovog istraživanja bio je da utvrdi spektar domaćina gljive *D. sapinea* u Srbiji i Crnoj Gori. To je postignuto identifikacijom izolata *D. sapinea* iz šire kolekcije *Botryosphaeriaceae* izolata sakupljenih u regionu Zapadnog Balkana, koristeći DNA sekvence internog transkribovanog spejsera (ITS) rDNA dela gena i gena translacionog elongacionog faktora (TEF 1-  $\alpha$ ). Deo ovih izolata zatim je korišćen za recipročne inokulacije domaćina iz kojih je gljiva *D. sapinea* izolovana, kao i za inokulacije sadnica *Picea abies*, *T. occidentalis*, *Prunus laurocerasus*, *Eucalyptus grandis* i *Pinus patula*.

## **4.3. Materijal i metode**

### **4.3.1. Sakupljanje uzoraka i izolacija gljive *Diplodia sapinea***

Uzorci su sakupljeni sa obolelih stabala i žbunja u periodu od 2009 do 2014 širom Srbije i Crne Gore kako je opisano u Poglavlju 3. Takođe, uzorci su uzimani i sa dva simptomatična *Pinus radiata* stabla u plantaži borova u severnom delu Grčke, na planini Atos i izolati *D. sapinea* su uključeni u istraživanje (Tabela 2). *Diplodia sapinea* je izolovana iz simptomatičnih tkiva i direktno iz piknida na 2 % malt ekstrakt agar (MEA) podlozi zakišeljenoj mlečnom kiselinom (AMEA), kako što je opisano u Poglavlju 3. Kulture su pročišćene metodom prebacivanja vrhova hifa i izolati sa *D. sapinea*-sličnom morfologijom kultura (Poglavlje 3) prebacivani su u nove Petri šolje. Reprezentativni izolati sa svakog domaćina čuvaju se u Kolekciji Kultura (CMW) Instituta za Šumarstvo, Poljoprivredu i Biotehnologiju (FABI), Univerziteta u Pretoriji, Južna Afrika.

### **4.3.2. Filogenetske analize**

DNA je ekstrahovana iz kultura starih nedelju dana uz pomoć PrepMan Ultra reagent (Applied Biosystems, Foster City, California) ili CTAB protokola napisanog od strane Möller i sar.



(1992). ITS region rDNA operona amplifikovan je uz pomoć prajmera ITS-1 i ITS-4 (White i sar. 1990) ili ITS1F (Gardes i Bruns 1993) i ITS-4 (White i sar. 1990) i deo TEF-1- $\alpha$  gena uz pomoć prajmera EF1-728F i EF1-986R (Carbone i Kohn 1999) ili EF1-F i EF2-R (Jacobs i sar. 2004). PCR amplifikacija, sekvenciranje i poravnavanje sekvenci urađeni su kako je opisano u Poglavlju 3.

Filogenetske analize urađene su uz pomoć metoda Maksimalne štedljivosti-Maximum parsimony (MP), Maksimalne verovatnoće-Maximum likelihood (ML) i Bajesovih analiza-Bayesian analyses (BI). MP analize urađene su uz pomoć softvera PAUP verzija 4.0b10 (Swofford 2003) a ML analize urađene su uz pomoć online verzije programa PhyML 3.0 (Guindon i sar. 2010). Verodostojnost svakog čvora utvrđena je uz pomoć 1000 bootstrap replikata (Felsenstein 1985). BI analize urađene su uz pomoć MrBayes v.3.0b4 (Ronquist i Huelsenback 2003). Za potrebe ML i BI analiza, najbolji model substitucije nukleotida utvrđen je uz pomoć programa Jmodeltest v.0.1 (Posada 2008). Markov Chain Monte Carlo (MCMC) analize od 4 lanca počele su od slučajne topologije stabala i trajale tri miliona generacija. Stabla su uzorkovana svake 100<sup>th</sup> generacije što je rezultovalo sa 30 000 stabala. Prvih 3000 bilo je odbačeno kao izgarajuća-“burn-in” faza i posteriorne verovatnoće- posterior probabilities (PP) utvrđene su na osnovu preostalih stabala. Filogenetska stabla vizualizovana su uz pomoć softvera MEGA v.6. Sekvence dobijene u ovom istraživanju nalaze se u Banci Gena (Tabela 2).

**Tabela 2.** Izolati korišćeni u filogenetskim analizama.

| Izolat <sup>*,a, b</sup> | Identitet               | Domaćin                       | Lokacija <sup>c, d</sup>             | Kolektor          | GenBank Pristupni br. |               |                  |          |
|--------------------------|-------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|-------------------|-----------------------|---------------|------------------|----------|
|                          |                         |                               |                                      |                   | ITS                   | EF1- $\alpha$ | $\beta$ -tubulin | LSU      |
| CBS 112555               | <i>Diplodia seriata</i> | <i>Vitis vinifera</i>         | Portugal                             | A. J. L. Phillips | AY259094              | AY573220      | DQ458856         | AY928050 |
| CBS 119049               | <i>D. seriata</i>       | <i>Vitis sp.</i>              | Italy                                | L. Mugnai         | DQ458889              | DQ458874      | DQ458857         | EU673266 |
| CBS 393.84               | <i>Diplodia sapinea</i> | <i>Pinus nigra</i>            | Netherlands                          | H. A. van der Aa  | DQ458895              | DQ458880      | DQ458863         | EU754157 |
| CMW 39341*               | <i>D. sapinea</i>       | <i>Cedrus deodara</i>         | Podgorica, Montenegro                | M. Zlatković      | KF574998              | KF575028      | KF575094         | KF575062 |
| CMW 39338*               | <i>D. sapinea</i>       | <i>C. atlantica</i>           | Belgrade, Serbia                     | M. Zlatković      | KF574999              | KF575029      | KF575095         | KF575063 |
| CMW 39346*               | <i>D. sapinea</i>       | <i>Picea omorika</i>          | Belgrade, Serbia                     | M. Zlatković      | KF575000              | KF575030      | KF575096         | KF575064 |
| CMW 44981*               | <i>D. sapinea</i>       | <i>P. omorika</i>             | Mt Tara <sup>e</sup> , Serbia        | D. Karadžić       | KF729198              | KF729432      | KT253569         | KT253573 |
| <b>CMW39335</b>          | <i>D. sapinea</i>       | <i>Pinus halepensis</i>       | Belgrade, Serbia                     | M. Zlatković      | KF729170              | KF729404      | -                | -        |
| <b>BOT229</b>            | <i>D. sapinea</i>       | <i>Picea pungens</i>          | Belgrade, Serbia                     | M. Zlatković      | KF729171              | KF729405      | -                | -        |
| <b>BOT33</b>             | <i>D. sapinea</i>       | <i>C. atlantica</i>           | Belgrade, Serbia                     | M. Zlatković      | KF729172              | KF729406      | -                | -        |
| <b>CMW39330</b>          | <i>D. sapinea</i>       | <i>Juniperus horizontalis</i> | Belgrade, Serbia                     | M. Zlatković      | KF729173              | KF729407      | -                | -        |
| <b>BOT204</b>            | <i>D. sapinea</i>       | <i>C. atlantica</i>           | Belgrade, Serbia                     | M. Zlatković      | KF729174              | KF729408      | -                | -        |
| <b>BOT157</b>            | <i>D. sapinea</i>       | <i>C. atlantica</i>           | Belgrade, Serbia                     | M. Zlatković      | KF729175              | KF729409      | -                | -        |
| <b>BOT60</b>             | <i>D. sapinea</i>       | <i>C. atlantica</i>           | Belgrade, Serbia                     | M. Zlatković      | KF729176              | KF729410      | -                | -        |
| <b>CMW39329</b>          | <i>D. sapinea</i>       | <i>C. atlantica</i>           | Belgrade, Serbia                     | M. Zlatković      | KF729177              | KF729411      | -                | -        |
| <b>BOT63</b>             | <i>D. sapinea</i>       | <i>J. horizontalis</i>        | Belgrade, Serbia                     | M. Zlatković      | KF729178              | KF729412      | -                | -        |
| <b>BOT169</b>            | <i>D. sapinea</i>       | <i>C. atlantica</i>           | Belgrade, Serbia                     | M. Zlatković      | KF729179              | KF729413      | -                | -        |
| <b>BOT248</b>            | <i>D. sapinea</i>       | <i>P. pungens</i>             | Belgrade, Serbia                     | M. Zlatković      | KF729180              | KF729414      | -                | -        |
| <b>BOT242</b>            | <i>D. sapinea</i>       | <i>C. atlantica</i>           | Niš, Serbia                          | M. Zlatković      | KF729181              | KF729415      | -                | -        |
| <b>BOT220</b>            | <i>D. sapinea</i>       | <i>C. atlantica</i>           | Belgrade, Serbia                     | M. Zlatković      | KF729182              | KF729416      | -                | -        |
| <b>BOT253</b>            | <i>D. sapinea</i>       | <i>C. atlantica</i>           | Nikšić, Montenegro                   | M. Zlatković      | KF729183              | KF729417      | -                | -        |
| <b>BOT147</b>            | <i>D. sapinea</i>       | <i>P. nigra</i>               | Deliblato sands, <sup>d</sup> Serbia | D. Karadžić       | KF729184              | KF729418      | -                | -        |
| <b>BOT277</b>            | <i>D. sapinea</i>       | <i>Pinus sylvestris</i>       | Belgrade, Serbia                     | M. Zlatković      | KF729185              | KF729419      | -                | -        |
| <b>BOT268</b>            | <i>D. sapinea</i>       | <i>P. sylvestris</i>          | Bar, Montenegro                      | M. Zlatković      | KF729186              | KF729420      | -                | -        |
| <b>BOT100</b>            | <i>D. sapinea</i>       | <i>P. nigra</i>               | Belgrade, Serbia                     | M. Zlatković      | KF729187              | KF729421      | -                | -        |
| <b>CMW39345</b>          | <i>D. sapinea</i>       | <i>Pinus pinea</i>            | Budva, Montenegro                    | M. Zlatković      | KF729188              | KF729422      | -                | -        |
| <b>BOT 212</b>           | <i>D. sapinea</i>       | <i>Abies concolor</i>         | Belgrade, Serbia                     | M. Zlatković      | KF729189              | KF729423      | -                | -        |
| <b>CMW39344</b>          | <i>D. sapinea</i>       | <i>P. pungens</i>             | Niš, Serbia                          | M. Zlatković      | KF729190              | KF729424      | -                | -        |
| <b>BOT251</b>            | <i>D. sapinea</i>       | <i>C. atlantica</i>           | Nikšić, Montenegro                   | M. Zlatković      | KF729191              | KF729425      | -                | -        |
| <b>BOT285</b>            | <i>D. sapinea</i>       | <i>C. atlantica</i>           | Belgrade, Serbia                     | M. Zlatković      | KF729192              | KF729426      | -                | -        |
| <b>BOT196</b>            | <i>D. sapinea</i>       | <i>C. atlantica</i>           | Niš, Serbia                          | M. Zlatković      | KF729193              | KF729427      | -                | -        |
| <b>BOT266</b>            | <i>D. sapinea</i>       | <i>P. nigra</i>               | Belgrade, Serbia                     | M. Zlatković      | KF729194              | KF729428      | -                | -        |
| <b>CMW39343</b>          | <i>D. sapinea</i>       | <i>P. sylvestris</i>          | Niš, Serbia                          | M. Zlatković      | KF729195              | KF729429      | -                | -        |
| <b>BOT222</b>            | <i>D. sapinea</i>       | <i>C. atlantica</i>           | Bar, Montenegro                      | M. Zlatković      | KF729196              | KF729430      | -                | -        |
| <b>BOT115</b>            | <i>D. sapinea</i>       | <i>P. sylvestris</i>          | Niš, Serbia                          | M. Zlatković      | KF729197              | KF729431      | -                | -        |
| <b>CMW39342</b>          | <i>D. sapinea</i>       | <i>A. concolor</i>            | Belgrade, Serbia                     | M. Zlatković      | KF729199              | KF729433      | -                | -        |

Tabela 2. Nastavak.

| Izolat <sup>a, b</sup> | Identitet         | Domaćin               | Lokacija <sup>c, d</sup>       | Kolektor     | GenBank Pristupni br. |               |                  |     |
|------------------------|-------------------|-----------------------|--------------------------------|--------------|-----------------------|---------------|------------------|-----|
|                        |                   |                       |                                |              | ITS                   | EF1- $\alpha$ | $\beta$ -tubulin | LSU |
| CMW39340               | <i>D. sapinea</i> | <i>P. omorika</i>     | Mt. Tara., <sup>c</sup> Serbia | D. Karadžić  | KF729200              | KF729434      | -                | -   |
| BOT228                 | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>   | Belgrade, Serbia               | M. Zlatković | KF729201              | KF729435      | -                | -   |
| BOT10                  | <i>D. sapinea</i> | <i>P. nigra</i>       | Goč Mt., <sup>c</sup> Serbia   | D. Karadžić  | KF729202              | KF729436      | -                | -   |
| BOT101                 | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>   | Belgrade, Serbia               | M. Zlatković | KF729203              | KF729437      | -                | -   |
| BOT153                 | <i>D. sapinea</i> | <i>P. nigra</i>       | Goč Mt., <sup>c</sup> Serbia   | D. Karadžić  | KF729204              | KF729438      | -                | -   |
| CMW39339               | <i>D. sapinea</i> | <i>Pinus pinaster</i> | Miločer, Montenegro            | M. Zlatković | KF729205              | KF729439      | -                | -   |
| BOT104                 | <i>D. sapinea</i> | <i>P. nigra</i>       | Niš, Serbia                    | M. Zlatković | KF729206              | KF729440      | -                | -   |
| BOT97                  | <i>D. sapinea</i> | <i>P. sylvestris</i>  | Belgrade, Serbia               | M. Zlatković | KF729207              | KF729441      | -                | -   |
| BOT119                 | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>   | Belgrade, Serbia               | M. Zlatković | KF729208              | KF729442      | -                | -   |
| BOT137                 | <i>D. sapinea</i> | <i>P. nigra</i>       | Goč Mt., <sup>c</sup> Serbia   | D. Karadžić  | KF729209              | KF729443      | -                | -   |
| BOT133                 | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>   | Belgrade, Serbia               | M. Zlatković | KF729210              | KF729444      | -                | -   |
| BOT201                 | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>   | Bar, Montenegro                | M. Zlatković | KF729211              | KF729445      | -                | -   |
| BOT130                 | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>   | Bar, Montenegro                | M. Zlatković | KF729212              | KF729446      | -                | -   |
| BOT184                 | <i>D. sapinea</i> | <i>P. sylvestris</i>  | Bar, Montenegro                | M. Zlatković | KF729213              | KF729447      | -                | -   |
| BOT148                 | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>   | Belgrade, Serbia               | M. Zlatković | KF729214              | KF729448      | -                | -   |
| BOT241                 | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>   | Belgrade, Serbia               | M. Zlatković | KF729215              | KF729449      | -                | -   |
| BOT198                 | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>   | Belgrade, Serbia               | M. Zlatković | KF729216              | KF729450      | -                | -   |
| BOT207                 | <i>D. sapinea</i> | <i>P. halepensis</i>  | Herceg Novi, Montenegro        | M. Zlatković | KF729217              | KF729451      | -                | -   |
| BOT194                 | <i>D. sapinea</i> | <i>P. sylvestris</i>  | Bar, Montenegro                | M. Zlatković | KF729218              | KF729452      | -                | -   |
| BOT199                 | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>   | Belgrade, Serbia               | M. Zlatković | KF729219              | KF729453      | -                | -   |
| BOT183                 | <i>D. sapinea</i> | <i>P. nigra</i>       | Niš, Serbia                    | M. Zlatković | KF729220              | KF729454      | -                | -   |
| BOT230                 | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>   | Bar, Montenegro                | M. Zlatković | KF729221              | KF729455      | -                | -   |
| BOT162                 | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>   | Belgrade, Serbia               | M. Zlatković | KF729222              | KF729456      | -                | -   |
| BOT182                 | <i>D. sapinea</i> | <i>P. nigra</i>       | Goč Mt., <sup>c</sup> Serbia   | D. Karadžić  | KF729223              | KF729457      | -                | -   |
| BOT211                 | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>   | Belgrade, Serbia               | M. Zlatković | KF729224              | KF729458      | -                | -   |
| BOT138                 | <i>D. sapinea</i> | <i>P. pungens</i>     | Belgrade, Serbia               | M. Zlatković | KF729225              | KF729459      | -                | -   |
| BOT171                 | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>   | Podgorica, Montenegro          | M. Zlatković | KF729226              | KF729460      | -                | -   |
| BOT128                 | <i>D. sapinea</i> | <i>P. sylvestris</i>  | Belgrade, Serbia               | M. Zlatković | KF729227              | KF729461      | -                | -   |
| BOT126                 | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>   | Belgrade, Serbia               | M. Zlatković | KF729228              | KF729462      | -                | -   |
| BOT200                 | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>   | Niš, Serbia                    | M. Zlatković | KF729229              | KF729463      | -                | -   |
| BOT174                 | <i>D. sapinea</i> | <i>P. sylvestris</i>  | Budva, Montenegro              | M. Zlatković | KF729230              | KF729464      | -                | -   |
| BOT179                 | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>   | Belgrade, Serbia               | M. Zlatković | KF729231              | KF729465      | -                | -   |
| BOT203                 | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>   | Belgrade, Serbia               | M. Zlatković | KF729232              | KF729466      | -                | -   |
| CMW39334               | <i>D. sapinea</i> | <i>P. menziesii</i>   | Belgrade, Serbia               | M. Zlatković | KF729233              | KF729467      | -                | -   |
| BOT20                  | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>   | Belgrade, Serbia               | M. Zlatković | KF729234              | KF729468      | -                | -   |
| CMW39332               | <i>D. sapinea</i> | <i>P. nigra</i>       | Pirot, Serbia                  | M. Zlatković | KF729235              | KF729469      | -                | -   |

**Tabela 2.** Nastavak.

| Izolat <sup>a, b</sup> | Identitet                    | Domaćin                 | Lokacija <sup>c, d</sup>        | Kolektor          | GenBank Pristupni br. |               |                  |          |
|------------------------|------------------------------|-------------------------|---------------------------------|-------------------|-----------------------|---------------|------------------|----------|
|                        |                              |                         |                                 |                   | ITS                   | EF1- $\alpha$ | $\beta$ -tubulin | LSU      |
| CMW39331               | <i>D. sapinea</i>            | <i>Cedrus libani</i>    | Podgorica, Montenegro           | M. Zlatković      | KF729236              | KF729470      | -                | -        |
| BOT205                 | <i>D. sapinea</i>            | <i>C. atlantica</i>     | Bar, Montenegro                 | M. Zlatković      | KF729237              | KF729471      | -                | -        |
| BOT280                 | <i>D. sapinea</i>            | <i>C. lawsoniana</i>    | Herceg Novi, Montenegro         | M. Zlatković      | KF729238              | KF729472      | -                | -        |
| CMW39333               | <i>D. sapinea</i>            | <i>C. lawsoniana</i>    | Herceg Novi, Montenegro         | M. Zlatković      | KF729239              | KF729473      | -                | -        |
| BOT150                 | <i>D. sapinea</i>            | <i>C. atlantica</i>     | Belgrade, Serbia                | M. Zlatković      | KF729240              | KF729474      | -                | -        |
| BOT223                 | <i>D. sapinea</i>            | <i>C. atlantica</i>     | Bar, Montenegro                 | M. Zlatković      | KF729241              | KF729475      | -                | -        |
| BOT170                 | <i>D. sapinea</i>            | <i>P. omorika</i>       | Belgrade, Serbia                | M. Zlatković      | KF729242              | KF729476      | -                | -        |
| BOT152                 | <i>D. sapinea</i>            | <i>C. atlantica</i>     | Belgrade, Serbia                | M. Zlatković      | KF729243              | KF729477      | -                | -        |
| BOT237                 | <i>D. sapinea</i>            | <i>C. atlantica</i>     | Belgrade, Serbia                | M. Zlatković      | KF729244              | KF729478      | -                | -        |
| BOT227                 | <i>D. sapinea</i>            | <i>C. atlantica</i>     | Belgrade, Serbia                | M. Zlatković      | KF729245              | KF729479      | -                | -        |
| CMW39337               | <i>D. sapinea</i>            | <i>C. atlantica</i>     | Bar, Montenegro                 | M. Zlatković      | KF729246              | KF729480      | -                | -        |
| CMW39336               | <i>D. sapinea</i>            | <i>Fagus sylvatica</i>  | Mt. Rudnik, <sup>c</sup> Serbia | N. Keča           | KF729247              | KF729481      | -                | -        |
| BOT245                 | <i>D. sapinea</i>            | <i>C. atlantica</i>     | Nikšić, Montenegro              | M. Zlatković      | KF729248              | KF729482      | -                | -        |
| BOT246                 | <i>D. sapinea</i>            | <i>C. atlantica</i>     | Belgrade, Serbia                | M. Zlatković      | KF729249              | KF729483      | -                | -        |
| CMW 39347              | <i>D. sapinea</i>            | <i>P. radiata</i>       | Mt. Athos, Greece               | D. Karadžić       | KT749856              | KT749858      | -                | -        |
| BOT 239                | <i>D. sapinea</i>            | <i>P. radiata</i>       | Mt. Athos, Greece               | D. Karadžić       | KT749857              | KT749859      | -                | -        |
| BOT 294                | <i>D. sapinea</i>            | <i>P. menziesii</i>     | Prokuplje, Serbia <sup>d</sup>  | I. Milenković     | KT749860              | -             | -                | -        |
| BOT 295                | <i>D. sapinea</i>            | <i>P. menziesii</i>     | Prokuplje, Serbia <sup>d</sup>  | I. Milenković     | KT749861              | -             | -                | -        |
| CBS 109725             | <i>D. sapinea</i>            | <i>Pinus patula</i>     | South Africa                    | M. J. Wingfield   | DQ458896              | DQ458881      | DQ458864         | EU673270 |
| CBS 112556             | <i>Diplodia intermedia</i>   | <i>Malus domestica</i>  | Aveiro, Portugal                | A. Alves          | GQ923857              | GQ923850      | -                | -        |
| CBS 124462             | <i>D. intermedia</i>         | <i>Malus sylvestris</i> | Portugal                        | A. J. L. Phillips | GQ923858              | GQ923826      | -                | -        |
| CBS 118110             | <i>Diplodia scrobiculata</i> | <i>Pinus banksiana</i>  | USA                             | M. A. Palmer      | KF766160              | AY624258      | AY624258         | KF766326 |
| CBS 113423             | <i>D. scrobiculata</i>       | <i>Pinus greggii</i>    | Mexico                          | M. J. Wingfield   | DQ458900              | DQ458885      | DQ458868         | EU673267 |
| CBS 136014             | <i>Diplodia mutila</i>       | <i>Populus alba</i>     | Portugal                        | A. Alves          | KJ361837              | KJ361829      | -                | -        |
| CBS 112553             | <i>D. mutila</i>             | <i>V. vinifera</i>      | Portugal                        | A. J. L. Phillips | AY259093              | AY573219      | DQ458850         | AY928049 |
| CBS 116472             | <i>Diplodia rosulata</i>     | <i>Prunus africana</i>  | Ethiopia, Gambo                 | A. Gure           | EU430266              | EU430268      | EU673131         | DQ377897 |
| CBS 116470             | <i>D. rosulata</i>           | <i>P. africana</i>      | Ethiopia, Gambo                 | A. Gure           | EU430265              | EU430267      | EU673132         | DQ377896 |
| CBS 122527             | <i>Sphaeropsis visci</i>     | <i>Viscum album</i>     | Ukraine                         | Á. Akulov         | EU673327              | -             | -                | -        |
| CBS 100163             | <i>S. visci</i>              | <i>V. album</i>         | Luxemburg                       | H.A. van der Aa   | EU673324              | EU673292      | EU673127         | DQ377870 |

Kolekcije kultura: CMW: FABI, Univerzitet u Pretoriji, Južna Afrika; CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Holandija; <sup>a</sup>Izolati sekvencirani u ovom istraživanju su boldovani. Izolati sekvencirani u radu Zlatković i sar. (2015) su označeni zvezdicom. Ostale sekvence preuzete su iz Banke Gen. <sup>b</sup> Pristupni brojevi izolata napisani su kosim brojevima i označavaju kulture morfološki vezane za tipski materijal. <sup>c</sup> Šumska sastojina. <sup>d</sup> Plantaža.

### 4.3.3. Inokulacije sadnica u polju

*Diplodia sapinea* izolati korišćeni za inokulacije sadnica dobijeni su iz simptomatičnih stabala *C. atlantica* (CMW 39329, CMW 39337, CMW 39338), *P. nigra* (CMW 39332) i *P. sylvestris* (CMW 39343) iz Srbije i mediteranskog dela Crne Gore (CMW 39337). Među njima, izolat CMW 39338 dobijen iz *C. atlantica* odabran je zbog toga što ima neobičnu morfologiju kolonije u poređenju sa ostalim izolatima okarakterisanim u Poglavlju 3.

Testovi inokulacije rađeni su tokom vegetacione sezone (April-Oktobar i April-Juni) 2014 godine i 2015 godine u rasadniku Šumarskog fakulteta u Beogradu, Srbija. Inokulisani su neki od prirodnih domaćina gljive *D. sapinea* i to *C. atlantica*, *C. deodara*, *Picea pungens*, *P. omorika*, *A. concolor*, *P. menziesii*, *P. nigra*, *P. sylvestris*, *Juniperus horizontalis* i *C. lawsoniana*. Često sađene ukrasne vrste i to *P. abies*, *T. occidentalis* i *P. laurocerasus* takođe su inokulisane. Detalji inokulisanih vrsta i izolati korišćeni u inokulacijama dati su u Tabelama 3 i 4. Sve sadnice su bile dvo ili tro-godišnje ukorenjene biljke u saksijama kupljene u rasadniku ukrasnog bilja u Novom Sadu ili dobijene od rasadnika Šumarskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

**Tabela 3.** Vrste drveća i izolati korišćeni u testu patogenosti u polju. + Izolat je korišćen za inokulaciju. / Izolat nije korišćen za inokulaciju.

| Inokulisane vrste               | Izolati   |           |           |           |           |
|---------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|                                 | CMW 39329 | CMW 39337 | CMW 39338 | CMW 39332 | CMW 39343 |
| <i>Cedrus atlantica</i>         | +         | +         | /         | /         | /         |
| <i>C. deodara</i>               | +         | +         | /         | /         | /         |
| <i>Picea pungens</i>            | +         | +         | /         | /         | /         |
| <i>P. omorika</i>               | +         | +         | /         | +         | +         |
| <i>P. abies</i>                 | +         | +         | /         | /         | /         |
| <i>Abies concolor</i>           | +         | +         | /         | /         | /         |
| <i>Pseudotsuga menziesii</i>    | +         | +         | /         | /         | /         |
| <i>Pinus nigra</i>              | +         | +         | +         | /         | +         |
| <i>P. sylvestris</i>            | +         | +         | +         | /         | +         |
| <i>Juniperus horizontalis</i>   | +         | +         | /         | /         | /         |
| <i>Chamaecyparis lawsoniana</i> | +         | +         | /         | /         | /         |
| <i>Thuja occidentalis</i>       | +         | +         | /         | /         | /         |
| <i>Prunus laurocerasus</i>      | +         | +         | /         | /         | /         |

**Tabela 4.** Detalji vrsta inokulisanih tokom oglada u polju. <sup>1</sup> Sadnice su inokulisane 2014. <sup>2</sup> Sadnice su inokulisane 2015. <sup>3</sup> Srednji prečnik sadnice. <sup>4</sup> Srednja visina biljke.

| Vrsta                           | Starost (godine)                              | Prečnik sadnice (cm) <sup>3</sup> | Visina (cm) <sup>4</sup> |
|---------------------------------|---|-----------------------------------|--------------------------|
| <i>Cedrus atlantica</i>         | 2   | 0.9                               | 17                       |
| <i>C. deodara</i>               | 2   | 0.9                               | 17                       |
| <i>Picea pungens</i>            | 3   | 1.5                               | 24                       |
| <i>P. omorika</i>               | 3 (2014) <sup>1</sup> , 2 (2015) <sup>2</sup> | 1.4 (2014), 0.9 (2015)            | 18                       |
| <i>P. abies</i>                 | 3   | 1.4                               | 29                       |
| <i>Abies concolor</i>           | 2   | 1.2                               | 20                       |
| <i>Pseudotsuga menziesii</i>    | 2   | 0.9                               | 18                       |
| <i>Pinus nigra</i>              | 2   | 1.7                               | 36                       |
| <i>P. sylvestris</i>            | 2   | 1.6                               | 30                       |
| <i>Juniperus horizontalis</i>   | 2   | 0.9                               | 14                       |
| <i>Chamaecyparis lawsoniana</i> | 3   | 1.5                               | 36                       |
| <i>Thuja occidentalis</i>       | 3   | 1.5                               | 35                       |
| <i>Prunus laurocerasus</i>      | 2   | 1.3                               | 22                       |

Deset sadnica za svaku vrstu drveta po izolatu inokulisano je 3-9 cm iznad zemlje, u pridanku. Isti broj sadnica svake vrste služio je kao kontrola. Inokulum *D. sapinea* činili su delovi micelije 3-mm ili 6-mm u prečniku uzeti sa margina kultura starih 7 dana koje su rasle na MEA podlozi u mraku na sobnoj temperaturi (20-23°C). Biljka je površinski sterilisana, a zatim je kolonizovani deo agara postavljen micelijom naniže u ranu napravljenu zumbom predhodno sterilisanom plamenom (3 ili 6 mm prečnika). Inokulisane rane pokrivene su korom koja je predhodno bila uklonjena kako bi se napravila rana i komadom vate potopljenim u destilovanu vodu a zatim je rana zaštićena Parafilmom da bi se sprečilo njeno isušivanje i kontaminacija. Kontrolne sadnice tretirane su na isti način kao i sadnice inokulisane gljivom, ali su inokulisane sterilnim WA.

Inokulisane sadnice nalazile su se u otvorenom rasadniku u prirodnim uslovima karakterističnim za gradsku šumu i navodnjavane svakog dana do poljskog kapaciteta za vodu. Sadnice su jednom nedeljno pregledane kako bi se uočili simptomi bolesti i mortalitet (sušenje terminalnog izbojka, sušenje i opadanje četina). Procena bolesti za sadnice *A. concolor*, *P. pungens*, *P. abies*, *P. omorika* i *P. menziesii* bazira se na procentu mrtvih sadnica zabeleženih tokom vremena. Područje ispod krive napredka bolesti (area under disease progress curve (AUDPC)) korišćeno je za kvantifikaciju intenziteta bolesti tokom vremena (Madden i sar. 2007). AUDPC poručje je izračunato trapezoidnim integracionim metodom koisteći jednačinu:

$$AUDPC = \sum_{i=1}^{n-1} [(y_i + y_{i+1})/2] * (t_{i+1} - t_i)$$

Gde je n ukupan broj obzervacija,  $y_i$  intenzitet bolesti pri  $i^{th}$  obzervaciji i  $t_i$  vreme (nedelje) pri  $i^{th}$  obzervaciji.

Kada su u pitanju sadnice *P. sylvestris* i *P. nigra* intenzitet bolesti utvrđen je na osnovu % suvih sadnica šest nedelja nakon inokulacije. Na osnovu razlika u smrtnosti *P. nigra* sadnica, rezultat 1-3 dodeljen je svakom *D. sapinea* izolatu korišćenom u ogledu, sa 1 – najmanje agresivni izolat= <50 % sadnica prstenovano, preostale sadnice sa smolavim nekrozama koje su prstenovale biljke, izbojci uvenuli, izliv smole prisutan na izbojcima i sadnicama; 2– srednje agresivni izolat= >50 % sadnica prstenovano, preostale sadnice sa smolavim nekrozama koje prstenuju stablo, izbojci uvenuli, curenje smole prisutno na izbojcima i sadnicama i 3 – najagresivniji izolat= sve sadnice prstenovane, izbojci uvenuli, curenje smole prisutno na izbojcima i sadnicama, četine suve (potpuno suve sadnice).

Zbog toga što nije primećeno sušenje sadnica *J. horizontalis*, *T. occidentalis*, *C. atlantica*, *C. deodara*, *C. lawsoniana* i *P. laurocerasus* sadnica šest nedelja (*C. deodara*) ili šest meseci (sve ostale vrste) nakon inokulacije, sadnice su vertikalno presečene i izmerena je dužina vaskularne diskoloracije/smolavog tkiva iznad i ispod mesta inokulacije.

Kada je eksperiment završen, piknidi su sakupljeni sa površine ubijenog tkiva i pregledani kako je opisano u Poglavlju 3. Segmenti tkiva (3 x 3 mm) sa prelaznog dela između nekrotiranog i na izgled zdravog tkiva bili su površinski sterilisani (1 min u 70 % etanolu), isprani u sterilnoj destilovanoj vodi, prosušeni na sterilnim papirnim ubrusima, sterilisani plamenom i stavljeni na Petri šolje sa 2 % MEA podlogom. Petri šolje su čuvane na laboratorijskom stolu na sobnoj temperaturi ( $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ) tokom 2 nedelje. Identitet *D. sapinea* bio je potvrđen na osnovu morfologije kultura i konidija kako bi se potvrdili Kohovi postulati. Svi inokulacioni eksperimenti ponovljeni su jednom.

#### **4.3.4. Inokulacije izbojaka**

Izbojci, 30-40 cm dugi i 1.3-1.5 cm tanki uzeti su sa zdravih *F. sylvatica* stabala koja su rasla u eksperimentalnoj šumi Šumarskog fakulteta u Beogradu, u Srbiji. Izbojci su sakupljeni u maju 2015, na početku vegetacione sezone i inokulisani sa pet izolata *D. sapinea* poreklom iz *C. atlantica* (CMW 39329, CMW 39337), *P. nigra* (CMW 39332), *P. sylvestris* (CMW 39343) i *F. sylvatica* (CMW 39336). Deset izbojaka po izolatu inokulisano je zumbom prečnika 6 mm i delovima micelije istog prečnika, u centralnom delu izbojaka. Izbojci su sečeni koso vertikalno kako bi se povećalo usvajanje vode i čuvani su u posudama sa destilovanom vodom tokom 3 nedelje na sobnoj temperaturi ( $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ) pod prirodnim svetlošću na laboratorijskom stolu. Voda je menjana svakog drugog dana i krajevi izbojaka su tada opet sečeni. Kako bi se postigla vlažna atmosfera, izbojci su prekrivani plastičnim kesama tokom prve nedelje eksperimenta i svakog dana prskani vodom do kraja eksperimenta. Deset kontrolnih izbojaka svake vrste drveća inokulisano je sterilnom WA podlogom. Nakon tri nedelje, izbojci su sečeni vertikalno i merena je dužina vaskularne diskoloracije. Re-izolacija je vršena iz diskolorisanog tkiva, a izolati su identifikovani kako je predhodno opisano. Celi eksperiment je ponavljen jednom.



#### 4.3.5. Inokulacije u stakleniku

Tri godine stare ukorenjene sadnice *E. grandis* i 5 godina stare sadnice *P. patula* inokulisane su sa dva izolata *D. sapinea* dobijenih iz stabala *C. atlantica* (CMW 39329, CMW 39337) iz Srbije i mediteranskog dela Crne Gore. Za svaki izolat, korišćeno je deset sadnica za inokulacije gljivom, a deset sadnica korišćeno je kao kontrola. Sadnice su inokulisane tako što je u donjem delu sadnice napravljena rana (15-20 cm iznad nivoa zemlje) uz pomoć zumbe prečnika 9 mm i delovi micelije prečnika 9 mm stavljani su u rane kako je predhodno opisano. Kada su u pitanju kontrolne sadnice, isti broj sadnica inokulisan je sterilnom WA podlogom. Sadnice su čuvane na temperaturi od 25°C u prirodnim režimu ciklusa dan-noć tokom šest nedelja i zalivani svakog dana. Na kraju eksperimenta, izmerene su dužine lezija i *D. sapinea* je re-izolovana i identifikovana kako je predhodno opisano.

#### 4.3.6. Statističke analize

Podaci iz testova patogenosti analizirani su uz pomoć programa Statistica 8.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) i IBM SPSS Statistics 20.0 (New York, U.S.A). Rezultati dva uzastopna testa patogenosti upoređivani su uz pomoć Studentovog t-testa ili test analize varijansi (ANOVA) pri  $p < 0.05$ . Pošto nisu dobijene značajne razlike između rezultata dobijenih tokom dva ponovljena ogleda, rezultati dobijeni sa različitih vrsta drveća objedinjeni su u jedan set podataka za porebe budućih analiza. Normalnost podataka proverena je uz pomoć Kolmogorov–Smirnov testa i homogenost varijansi uz pomoć Levenovog testa. Analize su zatim urađene koristeći Studentov t-test, Kruskal-Wallis ne-parametrijsku jednosmernu analizu varijansi (ANOVA) ili parametrijski ANOVA test nakon čega je usledio post-hoc test najmanjih statistički značajnih razlika (Least Significant Difference (LSD)) poređenja srednjih vrednosti sa faktorom značajnosti od 0.05.

### 4.4. Rezultati

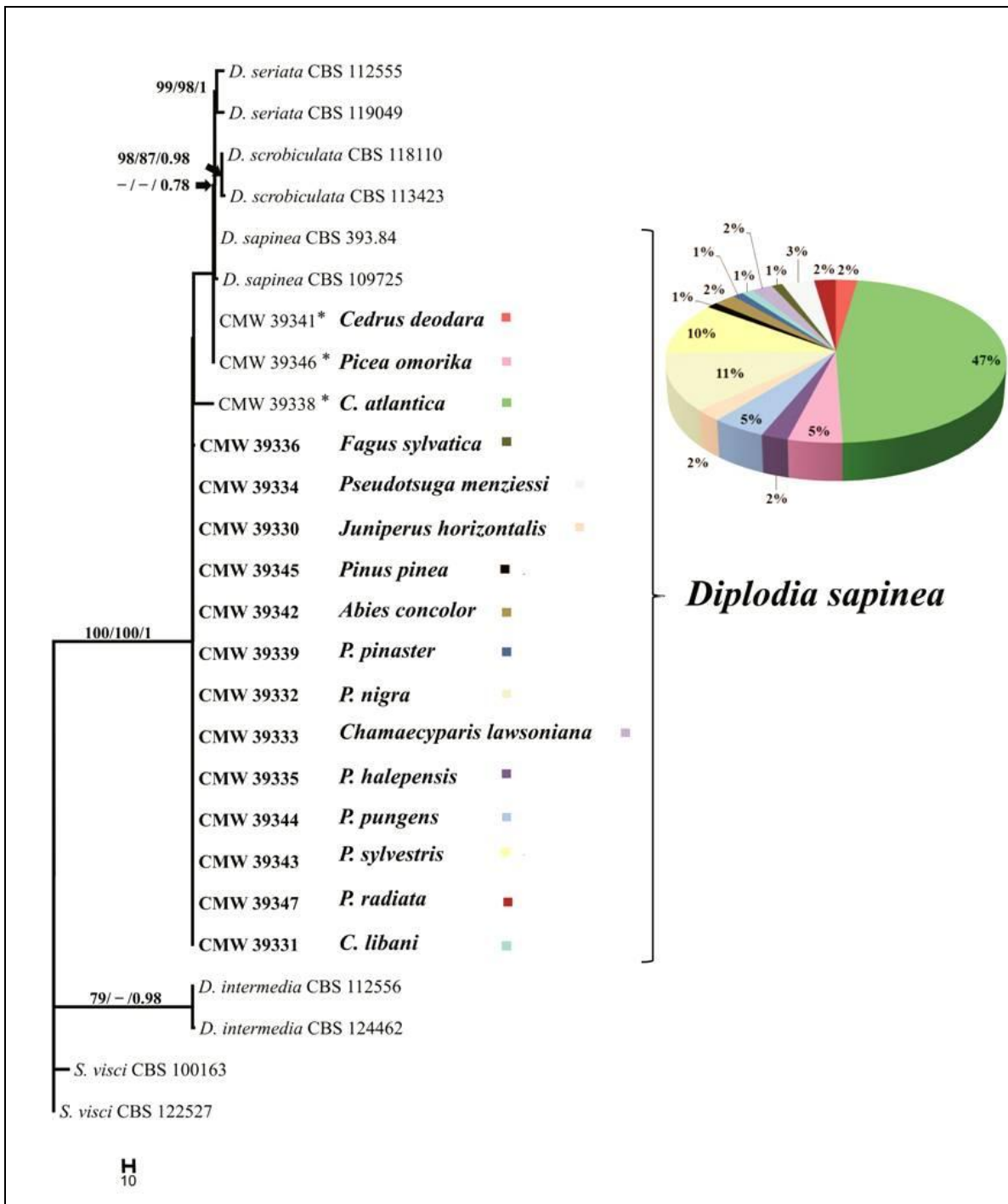
#### 4.4.1. Sakupljanje uzorka i izolacija gljive *D. sapinea*

U ovom istraživanju, dobijeno je ukupno 83 izolata i to 42 izolata iz *C. atlantica*, deset izolata iz *P. nigra*, devet izolata iz *P. sylvestris*, četiri izolata iz *P. pungens*, tri izolata iz *P. menziesii*, po dva izolata iz *P. halepensis*, *P. radiata*, *P. omorika*, *J. horizontalis*, *A. concolor*, *C. lawsoniana* i jedan izolat iz *Pinus pinea*, *Pinus pinaster*, *F. sylvatica* i *Cedrus libani*

(Tabela 2, Fig. 10). Dva izolata *D. sapinea* iz *P. omorika* i po jedan izolat iz *C. atlantica* i *C. deodara* preuzeti su iz predhodnog istraživanja (Poglavlje 3). Ovi izolati identifikovani su na osnovu analiza više delova gena (ITS, TEF-1- $\alpha$ ,  $\beta$ -tub i LSU) i morfoloških karakteristika konidija i kultura i uključeni u istraživanje.

#### 4.4.2. Filogenetske analize

Preliminarna identifikacija *D. sapinea*-sličnih izolata izvršena je na osnovu komparacije sekvenci ITS regiona ili kombinacije ITS i TEF-1  $\alpha$  dela gena i MP analiza. Reprezentativni izolati dobijeni iz svakog domaćina (uključujući one iz predhodnog istraživanja –Poglavlje 3) dodatno su analizirani uz pomoć MP, ML i BI analiza. Kombinovani set podataka četiri lokusa (ITS, TEF-1- $\alpha$ ,  $\beta$ -tub i LSU) činilo je 26 sekvenci i to 13 sekvenci iz ovog istraživanja, 3 sekvence iz predhodnog istraživanja (Poglavlje 3) i 10 sekvenci je preuzeto iz Banke Gena sa *S. visci* kao spoljnim taksonom. Set podataka sekvenci činilo je 1816 karaktera među kojima je 163 bilo parsimoni informativno, 1653 je bilo parsimoni ne-informativno, sa CI=0.8, RI=0.9 i TL=188. Rezultat PHT testa dao je P-vrednost od P=0.8. Model TrN+G izabran je za potrebe ML i BI analiza (G=0.1390). Topologije stabala koja su proizašla kao rezultat MP, ML i BI analiza bile su slične ako se uzme u obzir pozicija klade *D. sapinea* i stoga je prikazano samo MP stablo (Fig. 10). Na osnovu ovih filogenetskih analiza, svi izolati dobijeni u ovom istraživanju identifikovani su kao *D. sapinea* (Tabela 2, Fig. 10).



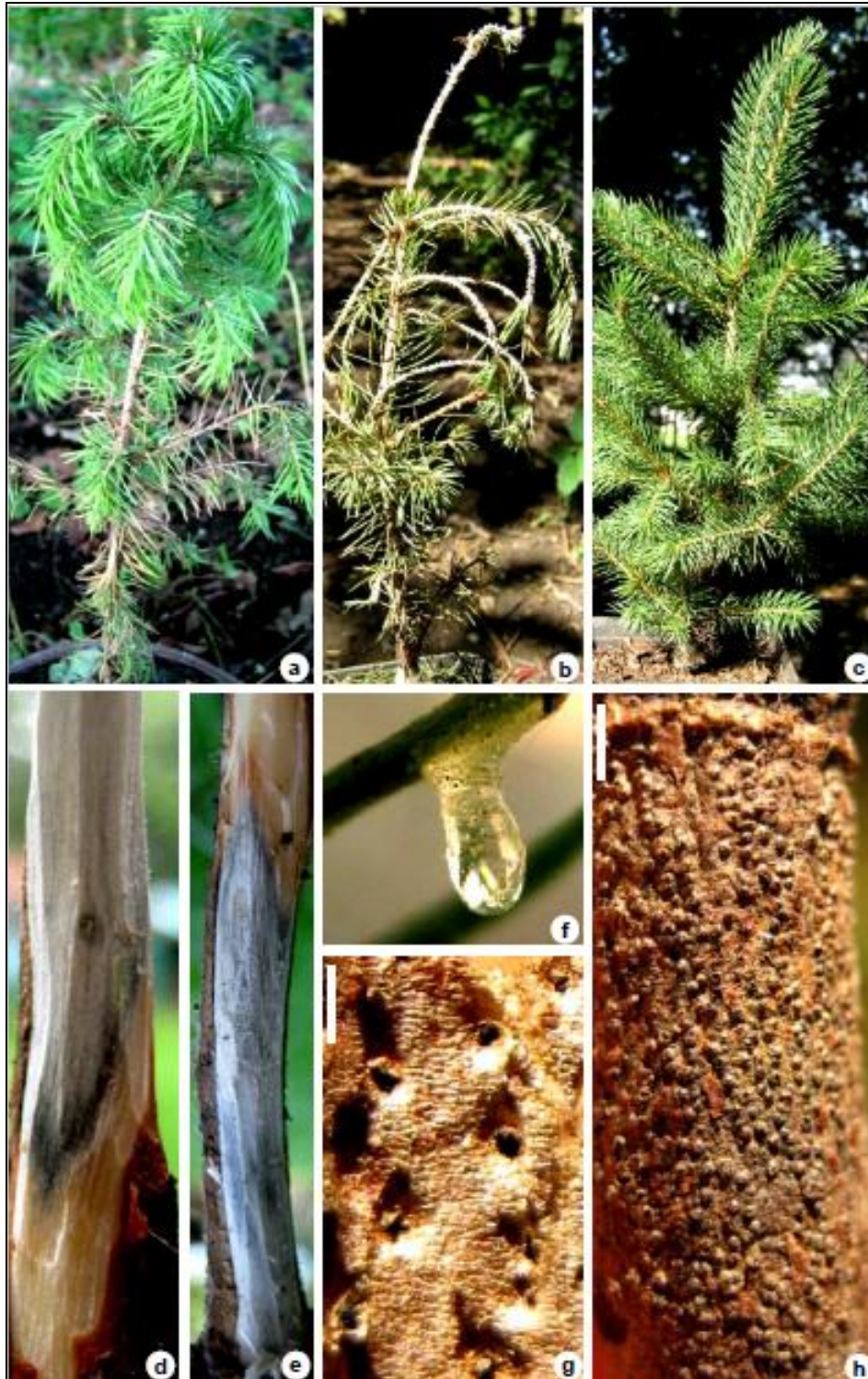
**Figure 10.** Prvo od 1000 jednako naj parsimoni stabala koja su rezultat parsimoni analiza kombinovanog ITS, TEF-1- $\alpha$ ,  $\beta$ -tub i LSU poravnavanja sekvenci. Vrednosti bootstrap podrške (MP/ML  $\geq$  70 %) prikazane su na čvorovima, a razmera predstavlja broj promena. Stablo je ukorenjeno uz pomoć *S. visci* CBS 100163 i CBS 122527. Pita prikazuje domaćine iz kojih je *D. sapinea* izolovana.\*Domaćini iz predhodnog istraživanja (Poglavlje 3).

#### 4.4.3. Inokulacija sadnica u polju

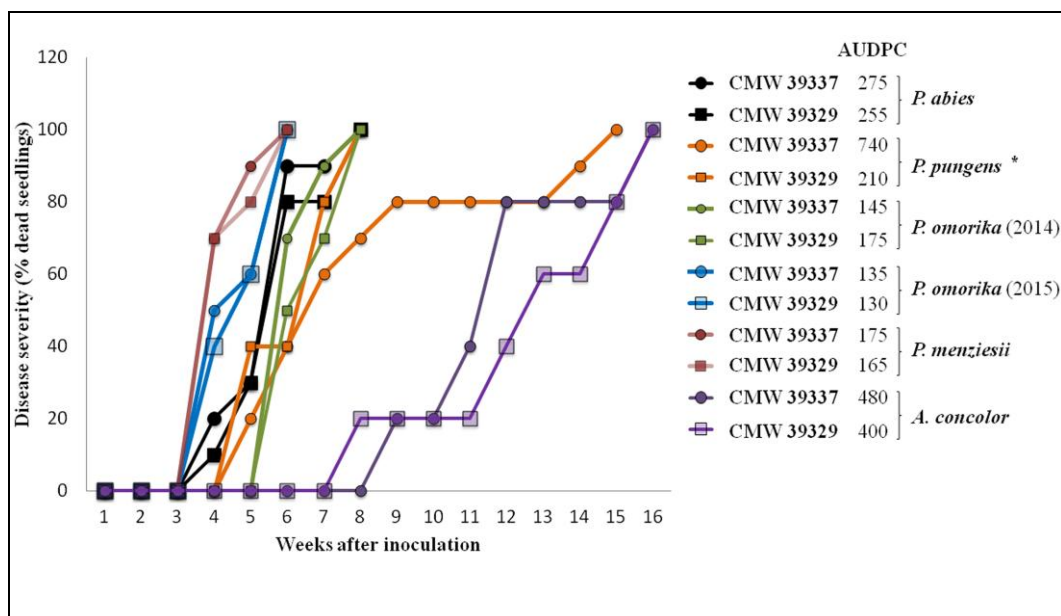
Pokazalo se da izolati *C. atlantica* mogu inficirati sadnice *P. abies*, *P. pungens*, *P. omorika*, *A. concolor* i *P. menziesii* i oni su na kraju eksperimenta i ubili inokulisane biljke (Fig. 11, 12). Početni simptomi bili su uvenuće izbojaka, žutilo i posmeđivanje četina. Početni simptomi zapaženi su u sledećim intervalima nakon inokulacije: dve nedelje u slučaju *A. concolor* i *P. menziesii*; tri nedelje u slučaju *P. abies*; četiri nedelje u slučaju *P. pungens*, četiri nedelje (trogodišnje sadnice) i jedna nedelja (dvogodišnje sadnice) kada su u pitanju sadnice *P. omorika*. Ostali simptomi uključivali su sušenje sadnica sa vrha, curenje smole, isušivanje četina i njihovo opadanje, sušenje izbojaka od osnove ka vrhu, smolom natopljene lezije koje pstenuju stablo i pojavu piknida na ubijenim tkivima.

Prvi mortalitet nastupio je u sledećim intervalima nakon inokulacije: četiri nedelje u slučaju *P. omorika* (dvogodišnje sadnice), *P. abies* i *P. menziesii*; pet nedelja u slučaju *A. concolor* i *P. pungens* i šest nedelja u slučaju *P. omorika* (trogodišnje sadnice) (Fig. 12). Kontrolne sadnice nisu pokazivale znake bolesti. AUDPC vrednost (740) bila je značajno veća ( $p < 0.05$ ) u slučaju sadnica *P. pungens* inokulisanih *D. sapinea* izolatom iz *C. atlantica* CMW 39329 u poređenju sa inokulacijama izolatom CMW 39337 (AUDPC= 210). Nije bilo značajnih razlika u AUDPC vrednostima između *D. sapinea* izolata inokulisanih u druge vrste pri  $p < 0.05$ . Smrtnost sadnica nastupila je u periodu između 5<sup>th</sup> i 16<sup>th</sup> nedelje trajanja eksperimenta, u zavisnosti od izolata *D. sapinea* i inokulisane vrste drveća (Fig. 12).

Izolati iz *C. atlantica* mogli su da inficiraju *J. horizontalis* i dužina lezija iznosila je od 1 do 2.3 cm. Nije bilo značajnih razlika u dužini lezija koje proizvode dva izolata poreklom iz *C. atlantica* pri  $p < 0.05$  (Tabela 5). Lezije nisu zapažene na kontrolnim sadnicama.



**Figura 11.** Simptomi uzrokovani gljivom *D. sapinea* nakon inokulacije sadnica *P. omorika*, *P. abies*, *P. pungens* i *A. concolor*. **a.** Uvenuće izbojaka *P. omorika*; **b.** Uvenuće izbojaka, isušivanje četina i njihovo opadanje u slučaju *P. abies*; **c.** Kontrolne sadnice *P. abies* koje ne pokazuju simptome bolesti; **d-e.** Lezije koje prstenuju sadnice *P. pungens*; **f.** Curenje smole na četinama *P. pungens*; **g.** Piknidi *D. sapinea* formirani na ubijenoj sadnici *P. pungens*; **h.** Piknidi *D. sapinea* formirani na mrtvoj sadnici *A. concolor*. Razmere: g = 1 mm, h = 10 mm.



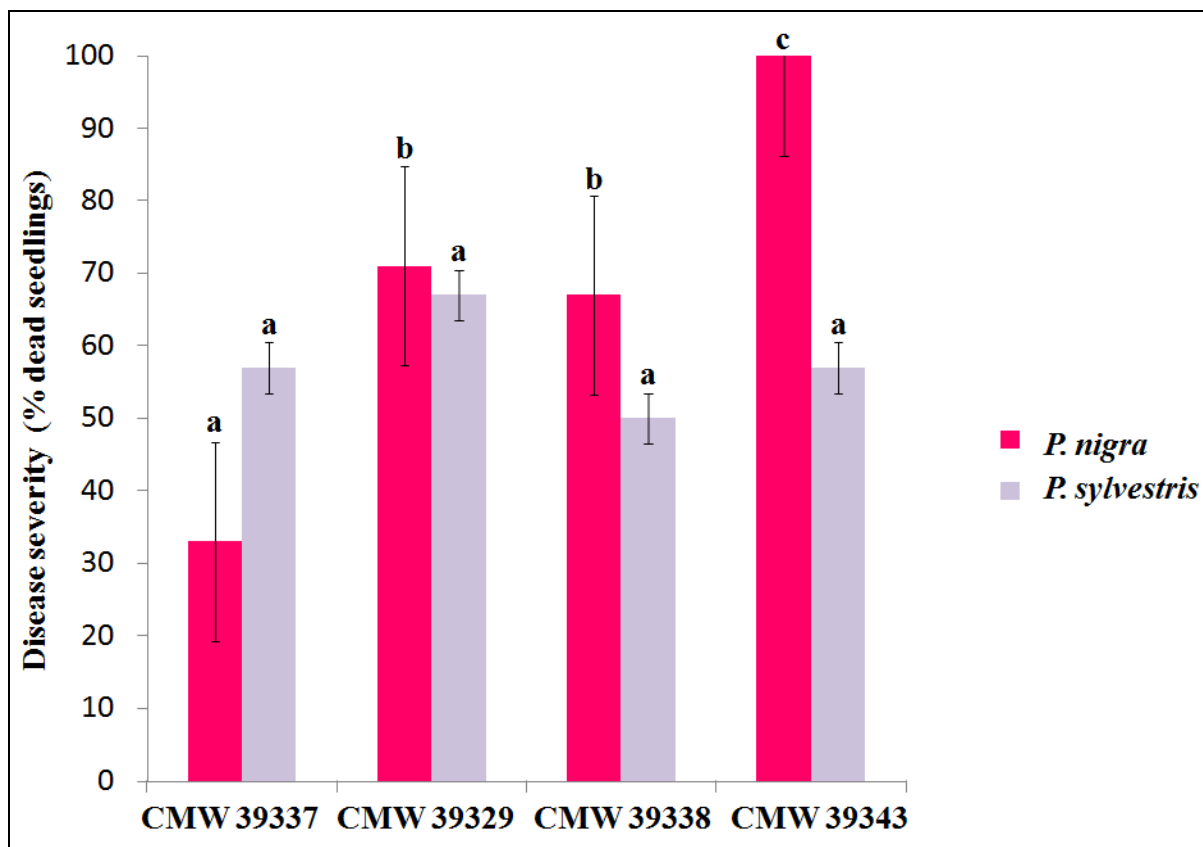
**Figura 12.** Krive razvoja bolesti i područje ispod krive razvoja bolesti (AUDPC) sadnica trogodišnje *Picea abies*, trogodišnje *Picea pungens*, trogodišnje *Picea omorika* (inokulisanih 2014), dvogodišnje *P. omorika* (inokulisane 2015), dvogodišnje *Pseudotsuga menziesii* i dvogodišnje *Abies concolor* inokulisane *D. sapinea* izolatima CMW 39337 i CMW 39329. \*AUDPC vrednosti su bile statistički značajne ( $p < 0.05$ ).

**Tabela 5.** Srednje vrednosti lezija na sadnicama *J. horizontalis*, *T. occidentalis*, *C. atlantica*, *C. deodara*, *C. lawsoniana*, *P. laurocerasus*, *P. patula* i *E. grandis* i izbojcima *F. sylvatica* inokulisanim *D. sapinea* izolatima CMW 39329 i CMW 39337.

| Sadnice                         | Dužina lezije (cm) <sup>1</sup> |                | Kontrola (cm) | Statistička značajnost <sup>2</sup> |
|---------------------------------|---------------------------------|----------------|---------------|-------------------------------------|
|                                 | CMW 39329                       | CMW 39337      |               |                                     |
| <i>Juniperus horizontalis</i>   | 1.6 (1-2.3)                     | 1.2 (1.1-1.3)  | –             | –                                   |
| <i>Thuja occidentalis</i>       | 1.2 (0.8-1.4)                   | 1.2 (0.9-1.3)  | 0.9 (0.8-1.2) | n.s.                                |
| <i>Cedrus atlantica</i>         | 0.6 (0.5-0.7)                   | 0.7 (0.5-0.6)  | 0.5 (0.4-0.6) | n.s.                                |
| <i>C. deodara</i>               | 0.7 (0.6-0.7)                   | 0.6 (0.6-0.7)  | 0.5 (0.4-0.6) | n.s.                                |
| <i>Chamaecyparis lawsoniana</i> | 1.1 (0.9-1.3)                   | 1 (0.9-1.1)    | 1 (0.9-1.1)   | n.s.                                |
| <i>Prunus laurocerasus</i>      | 1.2 (0.8-1.8)                   | 1.1 (0.8-1.2)  | 1 (0.8-1.2)   | n.s.                                |
| <i>Fagus sylvatica</i> *        | 1.1 (0.9-1.3)                   | 1.08 (0.9-1.3) | –             | n.s.                                |
| <i>Pinus patula</i>             | 78.8 (26-160)                   | 44.6 (23-72)   | 6 (6-7)       | <b>p &lt; 0.05</b>                  |
| <i>Eucalyptus grandis</i>       | 12.5 (10-22)                    | 11.8 (9-15)    | 6 (6-7)       | n.s.                                |

<sup>1</sup> Srednja vrednost diskolorisanog ili smolavog tkiva na mestu inokulacije <sup>2</sup> Statistički značajne razlike u dužini lezija uzrokovanih sa dva izolata *D. sapinea*. \*Srednje vrednosti lezija koje su proizveli izolati CMW 39338, CMW 39332, CMW 39343 i CMW 39336 bile su 1.09, 1.11, 1.1 i 1.1 ( $p > 0.05$ ).

Izolati poreklom iz *C. atlantica*, *P. nigra* i *P. sylvestris* mogli su da inficiraju sadnice *P. nigra* i *P. sylvestris*. Početni simptomi bolesti koji uključuju uvenuće izbojaka uočeni su tri i četiri nedelje nakon inokulacije. Prvo sušenje sadnica nastupilo je pet nedelja nakon inokulacije. Statističke analize su pokazale da nije bilo značajnih razlika u intenzitetu bolesti među sadnicama *P. sylvestris* pri  $p < 0.05$ . Nasuprot, zapažene su značajne razlike među sadnicama *P. nigra*. Izolat CMW 39343 poreklom iz *P. sylvestris* bio je najagresivniji i izolat CMW 39337 iz *C. atlantica* bio je najmanje agresivan ( $p < 0.05$ , Fig. 12). Inokulisane biljke ispoljavale su simptome curenja smole, sušenje četina od baze četine ka vrhu, hlorozu četina i smolave lezije koje prstenuju sadnice. *Diplodia sapinea* je bila re-izolovana i identifikovana iz inokulisanih sadnica.



**Figura 12.** Intenzitet bolesti (% osušenih sadnica) sadnica *P. sylvestris* i *P. nigra* inokulisanih sa četiri *D. sapinea* izolata šest nedelja nakon inokulacije. Kod svakog stuba vertikalne linije predstavljaju standardnu grešku srednje vrednosti. Izolati sa istim slovom iznad stuba nisu se značajno razlikovali (LSD,  $p > 0.05$ ).

Izolati poreklom iz *C. atlantica* nisu mogli da inficiraju sadnice *T. occidentalis*, *C. lawsoniana*, *C. atlantica*, *C. deodara* i *P. laurocerasus*. Inokulacije na *P. laurocerasus* sadnicama proizvele su tamno braon ili crne diskoloracije, dok su se na ostalim sadnicama pojavile smolave lezije. Ova diskoloracija /smolavost nije bila značajno različita od one zabeležene na kontrolnim sadnicama pri  $p < 0.05$  i *D. sapinea* nije bila re-izolovana iz ovih tkiva (Tabela 5).

#### **4.4.4. Inokulacije izbojaka**

Izolati poreklom iz *C. atlantica*, *P. nigra*, *P. sylvestris* i *F. sylvatica* proizveli su tamno braon lezije dimenzija u rasponu od 0.9-1.3 cm na izbojcima *F. sylvatica* ( $p > 0.05$ , Tabela 5). Kontrolni izbojci nisu proizveli lezije. *D. sapinea* je bila re-izolovana iz lezija sa svih inokulisanih izbojaka, ali ne i iz kontrolnih izbojaka.

#### **4.4.5. Inokulacije u stakleniku**

Isolati poreklom iz *C. atlantica* proizveli su lezije na sadnicama *P. patula* i *E. grandis*. Postojale su značajne razlike u dužini lezija nastalih kao rezultat inokulacije sa dva izolata *D. sapinea* na sadnicama *P. patula*. Lezije koje je proizveo izolat CMW 39337 bile su značajno veće od onih koje je proizveo izolat CMW 39329 (Tabela 5), a lezije proizvedene od strane i jednog i drugog izolata bile su značajno veće od onih koje su se pojavile na kontrolnim sadnicama. Lezije su na *E. grandis* bile male i nisu bile značajno različite u odnosu na lezije sa kontrolnih sadnica. *D. sapinea* je uspešno re-izolovana iz svih inokulisanih sadnica, koje su se nalazile u polju ili stakleniku, i time su bili ispunjeni Kohovi postulati. Patogen nije izolovan iz kontrolnih sadnica.

### **4.5. Diskusija i zaključci**

U ovom istraživanju, spektar domaćina gljive *D. sapinea* na području Zapadnog Balkana znatno je proširen uključujući i pojavu neočekivanih domaćina. Gljiva je izolovana iz 16 drvenastih vrsta, uključujući 15 četinara i jednog lišćara (*F. sylvatica*). Najveći broj izolata bio je poreklom iz *C. atlantica*, zatim iz *P. nigra* i *P. sylvestris*, dok je *D. sapinea* izolovana iz drugih vrsta samo povremeno. *D. sapinea* je mogla da inficira sedam drvenastih vrsta ali isto tako i *P. abies* i *P. patula* iz kojih patogen nije bio izolovan u ovom istraživanju.



Poznato je da gljiva *D. sapinea* pokazuje određeni nivo privrženosti domaćinima, izolovana je iz borova i povremeno iz ostalih četinarara (Gibson 1979; Phillips i sar. 2013). Ipak, u ovom istraživanju, patogen je predominantno izolovan iz *C. atlantica*. Ovo je iznenađujuće, pogotovu zbog toga što su testovi patogenosti pokazali da gljiva *D. sapinea* najverovatnije ne učestvuje u sušenju *C. atlantica*. U Srbiji, patogen je samo povremeno izolovan iz *C. atlantica* (Karadžić i Stojadinović 1988; Milijašević 2009). Velika učestalost izolacije gljive *D. sapinea* iz *C. atlantica* u ovom istraživanju mogla bi bila povezana sa većim brojem uzorkovanih stabala *C. atlantica* u poređenju sa stablima borova.

Podatak o često izolaciji *D. sapinea* iz stabala borova u ovom istraživanju nije iznenađujući, jer je gljiva predhodno izolovana iz deset vrsta borova od strane Milijašević (2009). Ovaj autor je pokazao da izolati *D. sapinea* sa područja Balkana mogu inficirati neozleđene izbojke *P. nigra*. Ali u ovom istraživanju, sadnice *P. nigra* i *P. sylvestris* bile su inokulisane stavljanjem micelije u otvorene rane napravljene na stablu i rezultati su pokazali visok nivo agresivnosti na *P. nigra* i *P. sylvestris*. Ovo je u skladu sa zapažanjima o velikoj šteti koju je gljiva *D. sapinea* počinila na *P. nigra* i *P. sylvestris* u zemljama Evrope u kojima su ovi borovi autohtoni (Dam i de Kam 1984; Piou i sar. 1991; Diminić i Jurc 1999; Jankovský i Palovčíková 2003; Blaschke i Cech 2007; Karadžić i Milijašević 2008; Fabre i sar. 2011). Ovo je suprotno istraživanju sprovedenom od strane Iturrutxa i sar. (2013) u kom su sadnice *P. nigra* i *P. sylvestris* inokulisane u stakleniku bile delimično podložne infekciji španskim izolatima gljive *D. sapinea* u poređenju sa veoma osetljivom vrstom *P. radiata*.

Gljiva *Diplodia sapinea* bila je opisana kao patogen *P. pungens*, *P. abies*, *P. menziesii* i *A. concolor* u SAD (Hepting 1971; Luley i Gleason 1988) i na *A. concolor* u Srbiji (Karadžić i Stojadinović 1988; Milijašević 2009). Zbog toga nije iznenađujuće što je gljiva izolovana iz smrče i jele u ovom istraživanju, mada je identifikacija *D. sapinea* u predhodnim istraživanjima bila bazirana na morfološkim istraživanjima. S obzirom na konfuziju prisutnu u taksonomskim istraživanjima ove gljive i bliskih kriptičnih vrsta (Phillips i sar. 2013) rezultati ovog istraživanja koji uključuju DNA sekvence su bitni i potvrđuju vezu *D. sapinea* sa ovim vrstama drveća. Testovi patogenosti sprovedeni u ovom istraživanju pokazali su da su balkanski izolati *D. sapinea* bili sposobni da izazovu bolest na testiranim vrstama *Picea* i *Abies* sa simptomima sličnim onima viđenim na zrelih stablima u prirodnim uslovima. Agresivnost *D. sapinea* prema sadnicama *P. omorika* naročito je uznemirujuća zbog toga što je ova vrsta ugrožena i pretil joj izumiranje (Alberto i sar. 2013).

*D. sapinea* je samo povremeno izolovana iz *C. libani*, *C. lawsoniana* i *J. horizontalis* u ovom istraživanju kao i iz *C. deodara* u predhodnom istraživanju od strane Zlatković i sar. (2016). Zabeleženo je da patogen izaziva simptome kakvi su rak rane, sušenje grana sa vrha i trulež pridanka *C. deodara* u SAD i Francuskoj (Hepting 1971; Morelet i Chandelier 1993). Ipak, rezultati ovog istraživanja pokazali su da *D. sapinea* nije bila patogena prema *C. deodara* i *C. lawsoniana*. Nasuprot, testovi inokulacije pokazali su da gljiva može izazvati bolest na *J. horizontalis*, nagoveštavajući da gljiva najverovatnije doprinosi uočenom odumiranju žbunova *J. horizontalis*. Turski izolati *D. sapinea* bili su veoma agresivni prema sadnicama *C. libani* (Doğmuş-Lehtijärvi i sar. 2009), ali testovi patogenosti nisu urađeni na *C. libani* u ovom istraživanju.

*D. sapinea* je u ovom istraživanju po prvi put izolovana iz lišćarske vrste *F. sylvatica*. Iako je gljiva prvenstveno poznata kao endofit i patogen četinara, naročito *Pinus* spp. *D. sapinea* je izolovana iz nekoliko lišćarskih vrsta (Bettucci i sar. 1999, 2004; Damm i sar. 2007; Lazzizzera i sar. 2008; Inderbitzin i sar. 2010). Damm i sar. (2007) su izolovali *D. sapinea* iz piknida nađenih na kori *P. persica*, što je u suprotnosti sa našim istraživanjem u kome smo gljivu izolovali iz nekrotiranog tkiva domaćina. U ovom istraživanju, izolacije su dale samo jedan izolat ove gljive iz *F. sylvatica* i testovi inokulacije pokazali su da gljiva nije patogena prema ovom domaćinu. Lazzizzera i sar. (2008) izolovali su *D. sapinea* iz stabala masline u voćnjacima okruženim stablima bora i autori su zaključili da je visoki nivo inokuluma najverovatnije uzrokovao nekoliko infekcija na maslinama. Verujemo da je slična situacija prisutna i u slučaju izolacije gljive *D. sapinea* iz *F. sylvatica* u ovom istraživanju.

Recipročne inokulacije urađene uz pomoć balkanskih izolata *D. sapinea* na *P. patula* dovele su do pojave lezija koje su značajno duže u odnosu na one sa kontrolnih biljaka. Poznato je da je *P. patula* vrsta podložna infekciji *D. sapinea* u kontrolisanim uslovima (Swart i sar. 1988) i ta osetljivost je potvrđena u ovom istraživanju. Lezije proizvedene na sadnicama *E. grandis* nisu bile značajno veće u poređenju sa onim koje su se pojavile na kontrolnim biljkama ( $p < 0.05$ ). Stoga nije izvesno da je *D. sapinea* potencijalni patogen ove vrste.

Recipročne inokulacije prikazane u ovom istraživanju nisu ukazale na to da je *D. sapinea* selektivni patogen. Ipak, one nisu ukazale ni na to da je u pitanju patogen generalist. Na primer, *D. sapinea* je bila agresivna prema *Pinaceae* (*Pinus*, *Abies*, *Pseudotsuga*, *Picea*), ali se pokazalo da je patogena samo prema jednom predstavniku familije *Cupressaceae* (*J.*

*horizontalis*). Stoga je moguće da Pinaceae poseduju neke genetičke i biohemijske karakteristike koje pripadnike ove familije čine naročito podložnim infekciji *D. sapinea*. Selektivnost *D. sapinea* u pogledu izbora domaćina nagovestili su i de Wet i sar. (2008) a prisutna je u slučaju nekih drugih *Botryosphaeriaceae* (Jami i sar. 2014). Ipak, ovo istraživanje potvrdilo je da *Botryosphaeriaceae* vrste “skaču” u oba pravca, od autohtonih domaćina do introdukovanih vrsta drveća i *vice versa* (Pavlic i sar. 2007; Slippers i Wingfield 2007). Na primer, *D. sapinea* je u ovom istraživanju izolovana iz autohtonih *P. sylvestris*, *P. nigra*, *P. omorika*, *P. abies* i introdukovanih *P. pungens*, *A. concolor*, *P. menziesii* i *J. horizontalis*.

Četinari uzorkovani u ovom istraživanju mogli bi biti ekofiziološki neadaptirani na njihovo trenutno stanište i posledično podložni infekciji od strane *D. sapinea*. U Srbiji se četinari često sade na staništima malih nadmorskih visina koja su, zbog ekoloških uslova, prirodna staništa lišćarskih vrsta, naročito hrasta i bukve. Uticaj staništa na bolesti izazvane patogenom *D. sapinea* zabeležen je i od strane Munck i sar. (2009). Ovi autori su pronašli više konidija u plantažama severnog Wisconsin (SAD) koje su podizane na staništima na kojima je tokom istorije bio sađen *Pinus banksiana* u poređenju sa staništima sa manje peskovitog sadržaja na kojima je predhodno bio sađen crveni bor.

I drugi faktori mogli su učiniti četinare podložnim infekciji *D. sapinea* i oni uključuju klimatske ekstreme (npr. visoke temperature, sušu), dodatne stresove kojima su stabla koja rastu u urbanim sredinama izložena (Poglavlje 3) i smanjenu otpornost na patogene zbog smanjene proizvodnje smole kod četinara koji su izloženi stresu (Allen i sar. 2010). Isto tako, u Srbiji, *P. sylvestris* je na južnoj granici svog geografskog rasprostranjenja i mogao bi naročito biti osetljiv na sušu i visoke temperature. Već se pokazalo da toplija klima i stres od suše doprinose smanjenom porastu i intenzivnom sušenju *P. sylvestris* blizu južne granice rasprostranjenja ove vrste u Švajcarskoj i Italiji (Allen i sar. 2010). Takođe, stabla *Pinus* spp. uzorkovana u ovom istraživanju bila su često sađena u neposrednoj blizini drugih ukrasnih četinara. To je moglo dovesti do povećanja tzv. pritiska patogena (eng. pathogen pressure) (Ennos 2015) koji je, zajedno sa predhodno pomenutim faktorima stresa omogućio gljivi *D. sapinea* da inficira obližnje četinare. Predpostavlja se da su veliki pritisak propagula i geografska blizina uzrok epidemije *D. sapinea* u plantaži *P. menziesii* u Turskoj (Kaya 2014) i za *D. sapinea* infekcije na sadnicama u rasadnicima u SAD i Južnoj Africi (Palmer i Nicholls 1985; Stanosz i sar. 2007; Bihon i sar. 2011). Ipak, ne može se predpostaviti da

samo zbog toga što se *D. sapinea* javlja na *Pinus* spp. i drugim četinarima u neposrednoj blizini ima bilo kakave genetičke razmene među njima i populaciono genetička istraživanja su neophodna da potvrde ovu hipotezu.

## **5. Prvi nalaz gljive *Neofusicoccum parvum* prouzrokovača rupičavosti lišća lovor višnje (*Prunus laurocerasus* L.) u Srbiji**

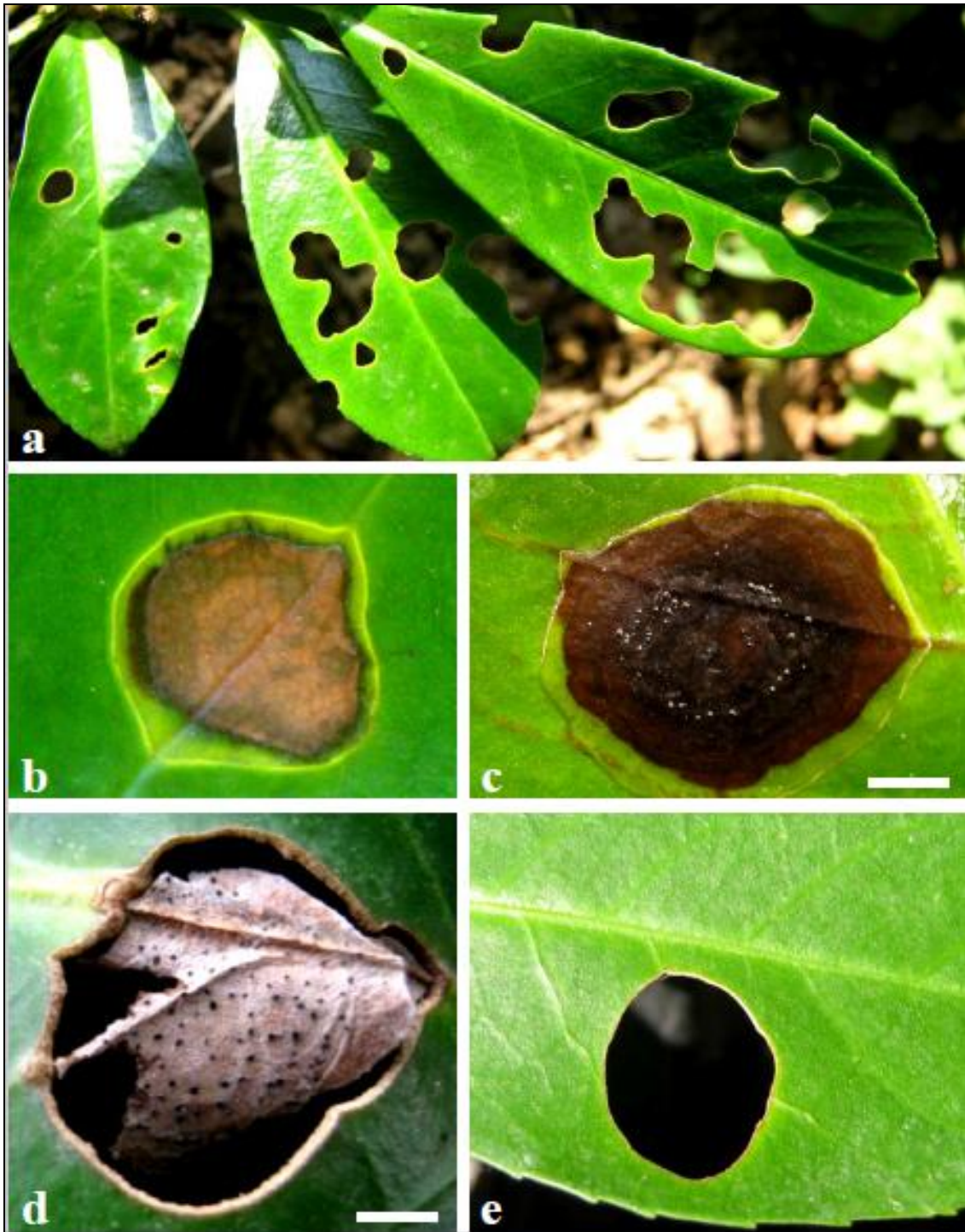
### **5.1. Uvod**

Lovor višnja (*Prunus laurocerasus* L.) je zimzeleni žbun ili stablo male do srednje visine sa velikim, voskastim, tamno zelenim listovima. To je ukrasna biljka koja se koristi kao zelena ograda u javnom zelenilu i privatnim dvorištima u regionima sa umerenom klimom. U Srbiji, *P. laurocerasus* je autohtona biljna vrsta koja se često sadi u gradovima, proizvodi u rasadnicima ukrasnog bilja i raste kao vrsta prizemnog sprata u šumi bukve sa lovor višnjom (*Lauroceraso-Fagetum*) u Jugoistočnoj Srbiji (Jovanović 1967; Glavendekić 2013).

Tokom proleća, leta i jeseni 2010-2014, primećena je pojava rupičavosti lišća na više od 30 *Prunus laurocerasus* žbunova na sedam lokaliteta u Beogradu, u Srbiji. Lišće inficiranih biljaka imalo je braon nekrotične lezije (dužine 1–2.5 cm) koje su bile oivičene svetlo zelenim areolom. Sa starenjem listova, na površini lezija pojavljivali su se crni piknidi (Fig. 1). Piknidi su sadržali konidije i spermacije. Konidije su bile jednoćelijske, hijalinske, fuziformne do elipsoidne, glatke sa finim granularnim sadržajem i dimenzija 16.8 (14.8–18.3) × 6.4 (5.6–7.4) μm. Spermacije su bile jednoćelijske, hijalinske, prut-izgleda sa zaobljenim krajevima i dimenzija 5.4 (2.4–5.7) × 2.8 (1.9–3.2) μm. U poslednjoj fazi razvoja bolesti, lezije su ispadale iz listova, dajući im pri tom izgled rupičavosti.

### **5.2. Ciljevi istraživanja**

Cilj ovog istraživanja bio je identifikacija uzročnika rupičavosti lišća *P. laurocerasus* u Srbiji. Simptomatični materijal je sakupljen i izolacije su vršene iz simptoma i piknida. Izolati su identifikovani uz pomoć većeg broja gena.



**Figura 13.** Simptomi rupičavosti lista izazvani sa *Neofusicoccum parvum* na *Prunus laurocerasus* u Srbiji. **a.** Listovi sa simptomom rupičavosti; **b.** Braon nekrotična lezija okružena svetlo zelenim prstenom; **c-d.** Nekrotična lezija sa piknidima *N. parvum* koji se formiraju na površini lezije; **e.** List sa rupom. Razmera: c, d= 1 cm.

### 5.3. Materijal i metode

Deset simptomatičnih listova sakupljeno je sa svake obolele biljke; piknidi su uklonjeni sterilnom iglom i stavljeni na malt ekstrakt agar (MEA) kao što je opisano u radu Zlatković i sar. (2016). Nakon nedelju dana, pojavile su se vunaste, brzorastuće, sive kolonije gljive i one su pročišćene metodom vrhova hifa. Dva izolata, BOT 131 i BOT 275, svaki dobijen sa različite biljke korišćeni su dalje u ovom istraživanju.

DNA je ekstrahovana iz micelije kultura starih nedelju dana uz pomoć PrepMan Ultra reagent (Applied Biosystems, Foster City, California) prateći uputstva proizvođača. ITS region rDNA operona amplifikovan je koristeći prajmere ITS-1 i ITS-4 (White i sar. 1990); deo TEF-1- $\alpha$  gena amplifikovan je uz pomoć prajmera EF1-728F i EF1-986R (Carbone i Kohn 1999);  $\beta$ -tubulin gen amplifikovan je uz pomoć prajmera Bt2a i Bt2b (Glass i Donaldson 1995) i deo druge velike podjedinice RNA polymerase II gena (RPB2) amplifikovan je uz pomoć prajmera RPB2bot6F i RPB2bot7R (Sakalidis 2004). Uslovi i procedure za PCR amplifikaciju i PCR sekvenciranje bili su slični onima opisanim u radu Zlatković i sar. (2016).

Nukleotidne sekvence oba smera su pregledane i spojene uz pomoć CLC Main Workbench 6.6.1 (CLC Bio, Aarhus, Denmark). Poravnavanja sekvenci urađena su prema metodi opisanom u radu Zlatković i sar. (2016). Filogenetske analize urađene su metodama maksimalne štedljivosti (Maximum Parsimony (MP)) i maksimalne verovatnoće (Maximum Likelihood (ML)). MP analize urađene su u programu PAUP verzija 4.0b10 (Swofford 2003). ML analize urađene su koristeći online verziju PhyML 3.0 (Guindon i sar. 2010) i nivoi pouzdanosti potvrđeni su uz pomoć 1000 bootstrap replikacija (Felsenstein 1985). Podudarnost različitih setova podataka testirana je koristeći test homogenosti particija (PHT) (Farris i sar. 1995) u programu PAUP v. 4. U slučaju ML analiza najbolji model substitucije nukleotida utvrđen je uz pomoć programa Jmodeltest v.0.1 (Posada 2008). Filogenetska stabla kreirana su uz pomoć MEGA v.6. DNA sekvence su poslate Banci Gena (KF729040 i KF729068-ITS, KF729370 i KF729398- TEF-1- $\alpha$ , KF29330 i KF729358- $\beta$ -tubulin).

Test patogenosti urađen je koristeći dva izolata *N. parvum* u dva ponavljanja na deset ukorenjenih biljaka *P. laurocerasus* koje su čuvane u rasadniku Šumarskog fakulteta u Beogradu. Na deset listova sa deset 2-godišnjih *P. laurocerasus* sadnica napravljena je mala rana uz pomoć sterilne igle i micelijski isečak (3 mm prečnika) uzet je sa periferije kolonije stare sedam dana i postavljen micelijskom stranom prema rani, pokriven vlažnom vatom i

Parafilmom. Biljke su pokrивane plastičnim kesama kako bi se zadržala vlažna atmosfera. Na kontrolnim biljkama rane su napravljene na istom broju listova i u njih je stavljen sterilni MEA.

#### 5.4. Rezultati i diskusija

Kombinovani set podataka sadržao je 24 sekvenci i 1283 karaktera (416 parsimoni informativnih, 867 parsimoni neinformativnih, CI = 0.9, RI = 0.9, TL = 587) sa *Pseudofusicoccum stromaticum* kao spoljnom grupom. Rezultati PHT testa nisu bili značajni (P = 0.1). Model TrN+G izabran je za potrebe ML analiza (G = 0.2010). MP i ML analize dale su stabla sa sličnom topologijom i stoga je samo ML stablo prikazano (Fig. 14). Na osnovu filogenetskih analiza, izolati iz ovih istraživanja identifikovani su kao *N. parvum*.

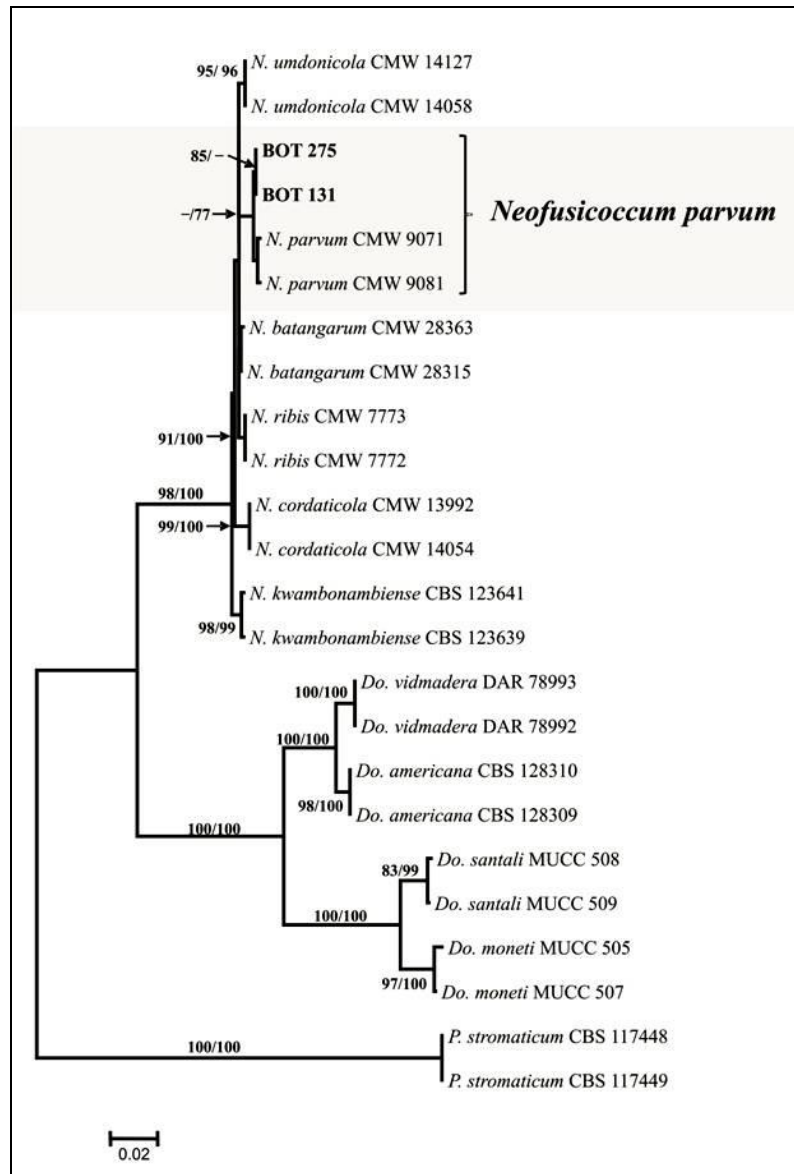
Pet dana nakon inokulacije, pojavile su se nekrotične lezije na svim inokulisanim listovima i Parafilm je bio uklonjen sa listova. Lezije se nisu pojavile na listovima kontrolnih biljaka. Dve nedelje nakon inokulacije, formirali su se piknidi unutar svih lezija, i sve lezije su ispale iz inokulisanih listova tri nedelje nakon inokulacije, proizvodeći simptome slične onima viđenim u prirodnim uslovima. Re-izolacije su urađene iz svih nekrotičnih lezija, kao i iz piknida na inokulisanim listovima. Identifikacija preostalih izolata potvrdila je da je uzročnik rupičavosti lišća bila gljiva *N. parvum*.

U predhodnim istraživanjima simptomi rupičavosti lišća na *P. laurocerasus* bili su povezani sa bakterijom *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (Marchi i sar. 2014) i gljivama uključujući *Stigmina carpophila*, *Spaceloma* sp. i *Mycosphaerella* sp. (Butin 2003). Prema našim saznanjima, ovo je prvi nalaz rupičavosti lišća na *P. laurocerasus* uzrokovan gljivom *N. parvum*. Zbog toga što su različiti mikrobi bili povezani sa ovim neobičnim simptomima možemo pretpostaviti da je u pitanju uobičajena pojava uzrokovana infekcijom na biljci *P. laurocerasus*.

Pojava gljive *N. parvum* na *P. laurocerasus* u Srbiji nije iznenađujuća, jer je u pitanju patogen generalist izolovan iz ukrasnih stabala širom sveta (Phillips i sar. 2013). Gljiva *Neofusicoccum parvum* je nedavno bila izolovana iz *Chamaecyparis lawsoniana* i *Aesculus hippocastanum* u Srbiji i iz *P. laurocerasus* u susednoj Crnoj Gori (Zlatković i sar. 2016). Još jedan pripadnik familije *Botryosphaeriaceae*, gljiva *Diplodia seriata* zabeležena je kao prouzročivač rak rana na izbojcima i sušenja *P. laurocerasus* u Italiji (Quaglia i sar. 2014).



Patogenost gljive *N. parvum* na *P. laurocerasus* od posebne je važnosti za Srbiju. *P. laurocerasus* je reliktna vrsta pred istrebljenjem zbog ograničene geografske distribucije (www.sepa.gov.rs). Vrsta se prirodno javlja samo na planini Ostrozub u Jugoistočnoj Srbiji u šumi lovor višnje sa bukvom (*Lauroceraso-Fagetum*). Nije poznato da li se bolest javila na *P. laurocerasus* žbunovima koji rastu u ovoj šumi i to treba dodatno istražiti.



**Figure 14.** ML stablo nastalo kao rezultat analize maksimalne verovatnoće kombinovanog ITS, TEF-1- $\alpha$  i  $\beta$ -tub poravnavanja sekvenci. Vrednosti bootstrap podrške (ML/MP  $\geq$  70%) prikazane su na čvorovima i razmera predstavlja broj promena. Stablo je ukorenjeno sekvencama *P. stromaticum* CBS 117448 i CBS 117449. Klada koja predstavlja gljivu *N. parvum* je osenčena.

## 6. Novi domaćini ko-inficirajućih *Botryosphaeriaceae* na ukrasnom i šumskom drveću na području Zapadnog Balkana

### 6.1. Uvod

Gljive iz familije *Botryosphaeriaceae* (Ascomycota: Botryosphaeriales) imaju širok krug domaćina i javljaju se u umerenoj, mediteranskoj i tropskoj klimi širom sveta (Phillips i sar. 2013; Mehl i sar. 2013). Ove vrste mogu biti endofiti u asimptomatičnom biljnom tkivu, ali su isto tako i patogeni od značaja za poljoprivredu i šumarstvo. Prelaz iz endofitske u patogenu fazu nastaje nakon što su biljke domaćini bile podvrgnute stresu uzrokovanim faktorima spoljašnje sredine kakvi su suša, poplave i visoke temperature (Slippers i Wingfield 2007; Mehl i sar. 2013). Nedavna povećana patogeno aktivnost i proširenje geografskog areala *Botryosphaeriaceae* vrsta u Evropi vezana je za topliju klimu i ekstremne vremenske uslove (Fabre i sar. 2011; Piškur i sar. 2011; Adamson i sar. 2015; Zlatković i sar. 2016).

Većina *Botryosphaeriaceae* vrsta inficira veliki broj domaćina, koji mogu ili moraju biti u bliskoj vezi jedan sa drugim. Ipak, neke vrste imaju uski krug domaćina ili inficiraju samo jednog domaćina. Primeri uključuju *Botryosphaeria scharifii* Abdollahz., Zare, A.J.L. Phillips, *Diplodia quercivora* Linaldeddu & A.J.L. Phillips, *Dothiorella brevicollis* Jami, Gryzenh., Slippers & M.J. Wingf., *Phaeobotryon mamane* Crous & A.J.L. Phillips i *Sphaeropsis visci* (Alb. & Schwein.) Sacc., a ove gljive su izolovane iz *Mangifera indica*, *Quercus canariensis*, *Acacia karroo*, *Sophora chrysophylla* i *Viscum album* (Phillips i sar. 2013). Ipak, privrženost određenim domaćinima *Botryosphaeriaceae* vrsta je diskutabilna, jer se sakupljanje uzoraka u najvećem broju istraživanja odnosilo na jednu određenu vrstu drveća ili geografsko područje (Jami i sar. 2014). Takođe, nekoliko *Botryosphaeriaceae* vrsta je često izolovano iz istog domaćina, istog stabla, tkiva ili na istom lokalitetu (Slippers i Wingfield 2007; Taylor i sar. 2009; Sakalidis i sar. 2013; Jami i sar. 2014; Linaldeddu i sar. 2014).

*Botryosphaeriaceae* vrste većinom su izolovane iz skrivenosemenica (Phillips i sar. 2013). Čini se da su upravo skrivenosemenice glavna grupa biljaka na kojima su ove gljive evoluirale i da su se tek kasnije kolonizovale i specijalizovale se za infekciju golosemenica (De Wet i sar. 2008; Slippers i sar. 2013). Ipak, neke *Botryosphaeriaceae* prvenstveno inficiraju četinare npr. *D. sapinea*, koja pokazuje privrženost prvenstveno ka *Pinus* vrstama ali se javlja i

na *Abies*, *Picea* i *Pseudotsuga* (Pinales: *Pinaceae*); zatim *Diplodia scrobiculata* J. de Wet, Slippers & M.J. Wingf. koja je izolovana iz *Pinus banksiana*, *Pinus resinosa*, i *Pinus greggii* (Pinales: *Pinaceae*), *Diplodia cupressi* A.J.L. Phillips & A. Alves izolovana iz *Cupressus* i *Juniperus* spp. (Pinales: *Cupressaceae*), *Diplodia tsugae* (A. Funk) A.J.L. Phillips & A. Alves izolovana samo iz *Tsuga heterophylla* (Pinales: *Pinaceae*) i *Phaeobotryon cupressi* Abdollahzadeh, Zare & A.J.L. Phillips izolovana iz *Cupressus sempervirens* i *Juniperus scopulorum* (Pinales: *Cupressaceae*) (De Wet i sar. 2008; Phillips i sar. 2013; Slippers i sar. 2013; Poglavlje 4).

Čini se da gotovo i nema barijera za kretanje *Botryosphaeriaceae* vrsta sa autohtonih na alohtone vrste drveća i *vice versa* unutar istih geografskih regiona. Na primer, *Diplodia seriata* De Not. izolovana je iz autohtone vrste *Vitis vinifera* i introdukovane *Chamaecyparis lawsoniana* i *Thuja plicata* u Portugalu (Alves i sar. 2013); *D. sapinea* nadjena je na različitim autohtonim *Pinus* spp. i introdukovanom *Pinus radiata* u Italiji (Luchi i sar. 2014); *Neofusicoccum mediterraneum* Crous, M.J. Wingf. & A.J.L. Phillips nadjena je na autohtonij vrsti *Sequoiadendron giganteum* i introdukovanoj *Pistacia vera* u SAD (Inderbitzin i sar 2010); *Neofusicoccum parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips izolovan je iz autohtone vrste *Syzygium cordatum* i introdukovane *Eucalyptus grandis* u Južnoj Africi (Pavlic i sar. 2007; Pillay i sar. 2013). Ipak, kada su izolovane iz autohtonih domaćina, *Botryosphaeriaceae* su bile u mogućnosti i da recipročno inficiraju introdukovane domaćine u ogledima u stakleniku (Pavlic i sar. 2007).

Neizvesnost u pogledu taksonomije i morfoloških karakteristika *Botryosphaeriaceae* učinili su ove gljive izuzetno teškim za identifikaciju (Phillips i sar. 2013; Slippers i sar. 2013, 2014). Iz ovog razloga, ekološka uloga *Botryosphaeriaceae* vrsta slabo je proučena u mnogim ekosistemima, uključujući urbane sredine u kojima su ekološke interakcije i evolucija vrsta još uvek nedovoljno proučene (Shochat i sar. 2006; Slippers i Wingfield 2007; Begoude i sar. 2010; Slippers i sar. 2013; Zlatković i sar. 2016). Nasuprot velikom broju istraživanja čiji je predmet proučavanja bio diverzitet i posledice infekcije *Botryosphaeriaceae* vrsta u mediteranskom regionu (MR) i u tropskim sredinama (npr. Burgess i sar. 2005; Rodas i sar. 2009; Alves i sar. 2014; Jami i sar. 2014), manja važnost je data *Botryosphaeriaceae* vrstama koje se javljaju u regionu sa kontinentalnom klimom (CR). Izuzev nekih nedavnih istraživanja sa područja Balkana (npr. Piškur i sar. 2011; Zlatković i sar. 2016), većina istraživanja *Botryosphaeriaceae* vrsta

urađena u CR odnosila su se na patogen borova, gljivu *D. sapinea* (npr. Jankovský i Palovčíková 2003; Karadžić i Milijašević 2008; Fabre i sar. 2011; Adamson i sar. 2015).

Na području Zapadnog Balkana, utvrđeno je da *N. parvum*, *Botryosphaeria dothidea* (Moug.: Fr.) Ces. & De Not. i *D. seriata* uzrokuju bolest na *V. vinifera*, *Malus domestica* i *Olea europaea* (Latinović i sar., 2013; Vasić i sar, 2013; Kaliterna i sar., 2012, 2013). Isto tako, nedavno je otkriven veliki diverzitet *Botryosphaeriaceae* vrsta na različitom bolesnom drveću većinom ukrasnih vrsta a identifikovane vrste uključuju *B. dothidea*, *N. parvum*, *Diplodia sapinea*, (Fr.) Fuckel, *Diplodia mutila* (Fr.: Fr.) Fr., *D. seriata*, *Dothiorella sarmentorum* (Fr.) A.J.L. Phillips, J. Luque & A. Alves, *Dothiorella* sp. 1, *Dothiorella* sp. 2, *Phaeobotryon cupressi* Abdollahz., Zare & A.J.L. Phillips i *S. visci*. Ove vrste izolovane su kako iz golosemenica tako i iz skrivenosemenica koje pripadaju familijama kakve su npr. *Rosaceae*, *Fagaceae*, *Cupressaceae*, *Pinaceae*, *Oleaceae*, *Sapindaceae*, *Santalaceae*, *Pittosporaceae* i *Myrtaceae* (Zlatković i sar. 2016; Poglavlja 4, 5).

## 6.2. Ciljevi istraživanja

Cilj ovog istraživanja bio je da razmotri spektar domaćina *Botryosphaeriaceae* vrsta na području Zapadnog Balkana. To je postignuto identifikacijom *Botryosphaeriaceae* vrsta iz velike kolekcije *Botryosphaeriaceae*-sličnih izolata, koristeći DNA sekvence internog transkribovanog spejsera (ITS) rDNA, translacionog elongacionog faktora 1 $\alpha$  (TEF 1- $\alpha$ ),  $\beta$ -tubulin 2 (BT2) i dela druge velike podjedinice RNA polymerase II gena (RPB2). Izabrani izolati su zatim korišćeni za potrebe recipročnih inokulacija na domaćinima iz kojih su *Botryosphaeriaceae* vrste izolovane, kao i na *E. grandis* i *Pinus patula*. Razmotreno je i preklapanje *Botryosphaeriaceae* vrsta na različitim skrivenosemenicama i golosemenicama, kao i u CR i MR regionima a isto tako i diverzitet *Botryosphaeriaceae* vrsta unutar istog stabla i tkiva.

## 6.3. Materijal i metode

### 6.3.1. Sakupljanje uzoraka i izolacija *Botryosphaeriaceae* gljiva

Uzorci su sakupljeni sa 219 stabala (40 vrsta), 15 žbunova (pet vrsta) i četiri sadnice (tri vrste) u periodu od 2009 do 2014 u 15 gradova, tri seoska naselja, osam šumskih sastojina, tri šumske plantaže i dva rasadnika ukrasnog bilja u Srbiji, Crnoj Gori, Bosni, Hercegovini i Grčkoj (Poglavlja 3, 4, 5; Tabele S3, S4). Uzorkovana stabla i žbunovi pokazivala su različite

simptome bolesti kakvi su rak rane, sušenje stabala sa vrha i obilni izliv smole iz ovih simptomatičnih tkiva. *Botryosphaeriaceae* vrste su izolovane iz zdravih tkiva, bolesnih tkiva i plodonosnih tela na 2% malt ekstrakt agar (MEA) podlozi zakišelenom mlečnom kiselinom (AMEA) kako je opisano u Poglavlju 3. Kolonije gljiva očišćene su metodom transfera vrhova hifa i *Botryosphaeriaceae*-slični izolati su prebacivani u nove Petri šolje. Reprezentativni izolati dobijeni iz svakog domaćina čuvaju se u kolekciji kultura (CMW) Instituta za Šumarstvo, Poljoprivredu i Biotehnologiju (FABI), u Južnoj Africi.

### 6.3.2. Tipovi klime

Uzorci su sakupljani u regionu sa kontinentalnom i regionu sa mediteranskom klimom. Prema Köppen-Geiger sistemu klasifikacije (Köppen 1936) kontinentalna klima sa toplim letima (Dwa) javlja se u severnim, istočnim i centralnim delovima Srbije, dok se kontinentalna klima sa suvim letima (Dwb) javlja u zapadnim i južnim delovima Srbije, Bosne i Hercegovine i severnim delovima Crne Gore. Mediteranska (Csa) klima javlja se u obalnom delu Crne Gore.

### 6.3.3. Analize DNA sekvenci

DNA je ekstrahovana iz micelije kultura starih nedelju dana uz pomoć PrepMan Ultra reagensa, prateći uputstva proizvođača. ITS region rDNA operona amplifikovan je uz pomoć prajmera ITS-1 ili ITS1F i ITS-4 (White i sar. 1990; Gardes i Bruns 1993); deo TEF-1- $\alpha$  gena amplifikovan je uz pomoć prajmera EF1-728F i EF1-986R (Carbone i Kohn 1999) ili EF1-F i EF2-R (Jacobs i sar. 2004);  $\beta$ -tubulin gen amplifikovan je uz pomoć prajmera Bt2a i Bt2b (Glass i Donaldson 1995) i RPB2 gen je amplifikovan uz pomoć prajmera RPB2bot6F i RPB2bot7R (Sakalidis 2004). Uslovi i procedure za PCR amplifikaciju, PCR sekvenciranje i poravnavanje sekvenci bili su isti kao oni opisani u Poglavlju 3.

Filogenetske analize urađene su koristeći metode maksimalne štedljivosti (MP) i maksimalne verovatnoće (ML). MP analize izvršene su u programu PAUP verzija 4.0b10 (Swofford 2003). ML analize urađene su koristeći online verziju programa PhyML 3.0 (Guindon i sar. 2010), a nivo verovatnoće utvrđeni je uz pomoć 1000 bootstrap replikacija (Felsenstein 1985). Kod ML analiza, najbolji model substitucije utvrđen je uz pomoć programa Jmodeltest v.0.1 (Posada 2008). Filogenetska stabla kreirana su u programu MEGA v.6. DNA sekvence poslate su Banci Gena (Tabela S4).

#### 6.3.4. Analize diverziteta *Botryosphaeriaceae* gljiva

Alfa diverzitet procenjen je u odnosu na bogatstvo vrsta (eng. species richness S) (broj vrsta u regionu/izolovanih iz domaćina), obilnost (eng. abundance) (broj izolata) i podjednakost J (dominacija vrste u regionu/izolovana iz domaćina). Shannon Wiener indeks (H, Shannon i Weaver 1949) izračunat je uz pomoć formule:

$$H = \sum P_i \ln P_i$$

i normalizovan tako da koriguje razlike u broju izolata uz pomoć formule:

$$H' = H / \ln N$$

gde je  $P_i$  proporcija individua  $i^{\text{th}}$  vrste, a N je broj izolata dobijen iz svakog domaćina. Vrednosti  $H'$  variraju od 0 (prisutna jedna vrsta) do 1 (svaki izolat predstavlja drugu vrstu).

Beta diverzitet određen je koristeći Jaccardov indeks sličnosti uz pomoć formule:

$$J = a / (a+b+c)$$

gde a predstavlja broj vrsta koje se javljaju u oba regiona /golosemenice-skrivenosemenice, b predstavlja broj vrsta ograničenih na region 1/golosemenice, i c predstavlja broj vrsta ograničenih na region 2/skrivenosemenice. J vrednosti kreću se od 0 (nema deljenih vrsta) do 1 (sve vrste su deljene) (Kumar i Hyde 2004). Indeksi diverziteta izračunati su uz pomoć programa R (R Core Team 2015), koristeći statistički program Vegan v. 2.2.1 (Oksanen i sar. 2015).

#### 6.3.5. Inokulacije sadnica u polju

Izolati *Botryosphaeriaceae* vrsta korišćeni za inokulacije sadnica dobijeni su iz simptomatičnih stabala 12 vrsta drveća koje rastu u Srbiji i Mediteranskom delu Crne Gore (Tabela 6). Testovi inokulacije urađeni su tokom vegetacionih sezona 2014 i 2015 godine (od aprila do oktobra i od aprila do juna) u eksperimentalnom rasadniku Šumarskog fakulteta u Beogradu. Inokulacije su urađene na 16 domaćina iz kojih su *Botryosphaeriaceae* vrste izolovane u ovom istraživanju. *Cedrus deodara* i *Picea omorika* su isto tako recipročno inokulisane izolatom *N. parvum* CMW 39327, koji je bio veoma agresivan nakon što je inokulisan u svoje prirodne domaćine (Tabele 6, 8, 19; Fig. 21, 22). Detalji inokulisanih vrsta dati su u Tabeli 7. Neke sadnice su dobijene od strane rasadnika Šumarskog fakulteta a druge su kupljene u rasadniku ukrasnog bilja koji se nalazi u Novom Sadu, Srbija. Sadnice su bile ukorenjene biljke u saksijama.

**Tabela 6.** Izolati *Botryosphaeriaceae* vrsta korišćeni u testovima inokulacije. Izolati sekvencirani u ovom istraživanju su boldovani. <sup>1</sup>Poglavlje 3, <sup>2</sup>Poglavlje 4.

| Isolate                 | <i>Botryosphaeriaceae</i><br>species | Host                            | Location                | Substrate                   |
|-------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| CMW 39329 <sup>2</sup>  | <i>Diplodia sapinea</i>              | <i>Cedrus atlantica</i>         | Belgrade, Serbia        | Smolava lezija na stablu    |
| CMW 39337 <sup>2</sup>  | <i>D. sapinea</i>                    | <i>C. atlantica</i>             | Bar, Montenegro         | Smolavo drive               |
| CMW 39343 <sup>2</sup>  | <i>D. sapinea</i>                    | <i>P. sylvestris</i>            | Niš, Serbia             | Piknidi u osnovi četine     |
| CMW 39332 <sup>2</sup>  | <i>D. sapinea</i>                    | <i>Pinus nigra</i>              | Pirot, Serbia           | Piknidi na šišaricama       |
| <b>CMW 39301</b>        | <i>Botryosphaeria dothidea</i>       | <i>Chamaecyparis lawsoniana</i> | Belgrade, Serbia        | Piknidi na grani            |
| <b>CMW 39315</b>        | <i>B. dothidea</i>                   | <i>C. lawsoniana</i>            | Bar, Montenegro         | Rak rana na grani           |
| <b>CMW 39327</b>        | <i>Neofusicoccum parvum</i>          | <i>Sequoiadendron giganteum</i> | Belgrade, Serbia        | Nekrotirane četine          |
| CMW 39317 <sup>1</sup>  | <i>N. parvum</i>                     | <i>Eucalyptus globulus</i>      | Bar, Montenegro         | Rak rana na stablu          |
| <b>CMW 39348</b>        | <i>Diplodia mutila</i>               | <i>Cupressus sempervirens</i>   | Herceg Novi, Montenegro | Smolava rak rana na grani   |
| <b>CMW 39385</b>        | <i>D. mutila</i>                     | <i>Thuja plicata</i>            | Belgrade, Serbia        | Piknidi na izbojku          |
| CMW 39376 <sup>1</sup>  | <i>Diplodia seriata</i>              | <i>C. pisifera</i>              | Belgrade, Serbia        | Nekrotirane četine          |
| <b>CMW 39382</b>        | <i>D. seriata</i>                    | <i>Quercus robur</i>            | Morović, Serbia         | Nekrotična lezija na stablu |
| CMW 39364 <sup>1</sup>  | <i>Dothiorella sarmentorum</i>       | <i>C. lawsoniana</i>            | Belgrade, Serbia        | Smolava lezija na grani     |
| <b>CMW 39365</b>        | <i>Do. sarmentorum</i>               | <i>T. occidentalis</i>          | Pirot, Serbia           | Piknidi na grani            |
| CBS 135622 <sup>1</sup> | <i>Dothiorella</i> sp. 1             | <i>C. atlantica</i>             | Belgrade, Serbia        | Smolava lezija na grani     |
| CBS 135623 <sup>1</sup> | <i>Dothiorella</i> sp. 1             | <i>T. plicata</i>               | Belgrade, Serbia        | Save solve četine           |
| CMW 39361 <sup>1</sup>  | <i>Dothiorella</i> sp. 2             | <i>C. sempervirens</i>          | Podgorica, Montenegro   | Piknidi na grani            |
| CMW 39363 <sup>1</sup>  | <i>Dothiorella</i> sp. 2             | <i>C. lawsoniana</i>            | Belgrade, Serbia        | Plavetnilo drveta           |
| CMW 39386 <sup>1</sup>  | <i>Sphaeropsis visci</i>             | <i>Viscum album</i>             | Mt Goč, Serbia          | Piknidi na listovima        |
| CMW 39387 <sup>1</sup>  | <i>Phaeobotryon cupressi</i>         | <i>C. sempervirens</i>          | Podgorica, Montenegro   | Smolava lezija na grani     |

Deset sadnica po vrsti drveta i izolatu inokulisano je 3-9 cm iznad nivoa zemljišta stavljanjem micelije u ranu napravljenu zumbalom prečnika 3 ili 6 mm, kako je opisano u Poglavlju 4. Isti broj kontrolnih sadnica svake vrste inokulisan je sterilnim vodom agarom bez micelije (WA). Sadnice su čuvane u otvorenom rasadniku, navodnjavane jednom dnevno do poljskog kapaciteta i pregledane na simptome bolesti i mortalitet svake nedelje.

**Tabela 7.** Sadnice korišćene u testovima inokulacije u polju.

| Vrsta                           | Starost<br>(godine) | Prečnik stabla<br>(cm) | Visina (cm) |
|---------------------------------|---------------------|------------------------|-------------|
| <i>Cedrus atlantica</i>         | 2                   | 0.9                    | 17          |
| <i>C. deodara</i>               | 2                   | 0.9                    | 17          |
| <i>Cupressus arizonica</i>      | 3                   | 1.3                    | 39          |
| <i>P. omorika</i>               | 2                   | 0.9                    | 18          |
| <i>P. abies</i>                 | 3                   | 1.4                    | 29          |
| <i>Abies concolor</i>           | 2                   | 1.2                    | 20          |
| <i>Pseudotsuga menziesii</i>    | 2                   | 0.9                    | 18          |
| <i>Liriodendron tulipifera</i>  | 3                   | 1.5                    | 32          |
| <i>Ligustrum vulgare</i>        | 3                   | 1.2                    | 32          |
| <i>Juniperus horizontalis</i>   | 2                   | 0.9                    | 14          |
| <i>Chamaecyparis lawsoniana</i> | 3                   | 1.5                    | 36          |
| <i>Thuja occidentalis</i>       | 3                   | 1.5                    | 35          |
| <i>Prunus laurocerasus</i>      | 2                   | 1.3                    | 22          |
| <i>Quercus robur</i>            | 3                   | 1.2                    | 29          |
| <i>Pittosporum tobira</i>       | 3                   | 1.2                    | 25          |
| <i>Sequoiadendron giganteum</i> | 2                   | 0.9                    | 18          |
| <i>Magnolia grandifolia</i>     | 2                   | 1.1                    | 16          |
| <i>C. sempervirens</i>          | 2                   | 0.9                    | 19          |

Kada su u pitanju sadnice *C. lawsoniana*, *Picea abies*, *Quercus robur*, *Cupressus arizonica* i *Liriodendron tulipifera* vrednost od 0-2, 1-3 i 1-2 dodeljena je svakom Botryosphaeriaceae izolatu korišćenom u testu inokulacije (Tabela 8). Test je trajao šest nedelja kada je u pitanju *Q. robur*, osam nedelja kada je u pitanju *P. abies* i šest meseci u slučaju *C. lawsoniana*, *C. arizonica* i *L. tulipifera*. Procena bolesti za sadnice *S. giganteum*, *Thuja occidentalis*, *Abies concolor*, *C. sempervirens* i *P. omorika* bazirala se na proračunu Oblasti Ispod Krive Razvoja Bolesti (AUDPC). AUDPC je određena uz pomoć trapezoidnog integracionog metoda (Madden i sar. 2007):

$$\text{AUDPC} = \sum_{i=1}^{n-1} [(y_i + y_{i+1})/2] * (t_{i+1} - t_i)$$

Gde je n ukupni broj obzervacija,  $y_i$  intenzitet bolesti pri  $i^{\text{th}}$  obzervaciji i  $t_i$  vreme (nedelja) pri  $i^{\text{th}}$  obzervaciji. Sadnice *Pittosporum tobira*, *C. deodara*, *Cedrus atlantica*, *Ligustrum vulgare*, *Juniperus horizontalis*, *C. arizonica*, *Prunus laurocerasus*, *Magnolia grandifolia*, *Pseudotsuga menziesii* i *L. tulipifera* su uzdužno presečene i smolavost/vaskularna diskoloracija merena je iznad i ispod mesta inokulacije šest nedelja (*P. tobira* i *C. deodara*) i šest meseci (sve ostale vrste) nakon početka eksperimenta.



Kada je eksperiment završen, *Botryosphaeriaceae* su re-izolovane iz margine nekrotiranog i na izgled zdravog tkiva, kako je opisano u Poglavlju 4. Piknidi gljive su sakupljeni i pregledani kako je opisano u Poglavlju 3. Identitet *Botryosphaeriaceae* vrsta potvrđen je na osnovu morfologije kultura i konidija, te su Kohovi postulati bili ispunjeni. Eksperimenti inokulacije ponovljeni su jednom.

### 6.3.6. Inokulacije izbojaka i listova

Izbojci, 30-40 cm dugi i 1.3-1.5 cm debeli, sakupljeni su u maju 2015 sa zdravih *Aesculus hippocastanum* stabala u eksperimentalnoj šumi Šumarskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, Srbija. *Viscum album* žbunovi koji nisu pokazivali simptome bolesti sakupljeni su u oktobru 2014 sa *Abies alba* stabala u urbanoj šumi “Košutnjak”, u Beogradu. *Aesculus hippocastanum* inokulisan je sa četiri *Botryosphaeriaceae* (dva izolata svake vrste), *V. album* žbun inokulisan je izolatom *S. visci*, dok su listovi *P. laurocerasus* inokulisani koristeći po dva izolata *N. parvum* i *D. mutila* (Tabela 6).

Deset izbojaka po izolatu inokulisano kako je opisano u Poglavlju 4, a isti broj kontrolnih izbojaka inokulisan je sterilnom WA. Za izbojke *A. hippocastanum* vrednost od 1-3 dodeljena je svakom *Botryosphaeriaceae* izolatu korišćenom u ogledu pri čemu se 1 odnosilo na najmanje agresivni izolat = nekrotične lezije 1.5-4 mm, piknidi se formiraju na ubijenoj kori, 2 na srednje agresivni izolat = >50 % izbojaka suvo, izbojci su prstenovani, prisutno je tamno obojavanje vaskularnog tkiva, piknidi su formirani na ubijenoj kori, dok se vrednost 3 odnosila na najagresivniji izolat = svi izbojci su suvi, tamno obojavanje ili posmeđivanje vaskularnog tkiva prisutno, piknidi se formiraju u ubijenoj kori.

**Tabela 8.** Procena bolesti za sadnice *C. lawsoniana*, *P. abies*, *Q. robur*, *C. arizonica* i *L. tulipifera*. \* Inokulacije listova

| Inoculisane vrste               | Procena bolesti   |
|---------------------------------|---|
| <i>Chamaecyparis lawsoniana</i> | <b>0</b> (gljiva <b>nije patogena</b> )= biljke izgledaju zdravo, prisutne su samo smolave promene drvnog tkiva ( <i>B. dothidea</i> CMW 39301, <i>N. parvum</i> , <i>S. visci</i> , <i>Do. sarmentorum</i> , <i>D. mutila</i> , <i>D. seriata</i> , <i>Dothiorella</i> sp. 1)  |
|                                 | <b>1 (srednje agresivna)</b> = >50 % biljaka sa posmeđivanjem lišća od mesta inokulacije naviše i naniže, ulegnute rak rane dimenzija 1.4-2.1cm, piknidi formirani u rak rani ( <i>B. dothidea</i> CMW 39315)   |
|                                 | <b>2 (najagresivnija)</b> = posmeđivanje listova prisutno kod svih biljaka, izdužene, ulegnute rak rane sa vertikalnim pukotinama unutar rak rane i oko rak rane > 3cm, piknidi se formiraju unutar rak rane ( <i>P. cupressi</i> )   |
| <i>Prunus laurocerasus</i> *    | <b>0 (nije patogena)</b> = lezije se nisu pojavile na inokulisanim listovima ( <i>D. mutila</i> CMW 39385)  |
|                                 | <b>1 (najmanje agresivna)</b> = male (3-5 mm) lezije pojavile su se oko mesta inokulacije, ali su ispadale iz listova čineći rupice ( <i>D. mutila</i> CMW 39348)   |
|                                 | <b>2 (srednje agresivna)</b> = na listovimka su se pojavile nekrotične lezije crvenkasto braon boje sa koncentričnim krugovima okruženim svetlo zelenim prstenom (1-2.5 cm), piknidi su se formirali unutar lezija, >80 % lezija je ispalo ( <i>N. parvum</i> CMW 39327)  |
| <i>Picea abies</i>              | <b>3 (najagresivnija)</b> = na listovimka su se pojavile nekrotične lezije crvenkasto braon boje sa koncentričnim krugovima okružene svetlo zelenim prstenom (2.5-4 cm), piknidi su se formirali unutar lezija, <10 % lezija je ispalo, >50 % listova je postalo potpuno nekrotično i listovi su otpali ( <i>N. parvum</i> CMW 39317) |
|                                 | <b>1 (najmanje agresivna)</b> = biljke sa izduženim ili kružnim smolavim lezijama, dimenzija 2.5-6.5 cm, neke biljke sa sušenjem izbojaka sa vrha ( <i>N. parvum</i> CMW 39317)   |
|                                 | <b>2 (srednje agresivna)</b> = <50 % biljaka prstenovano i suvo, preostale biljke sa smolavim kružnim lezijama dimenzija 2.5-7.5 cm i kapljice smole na četinama i stablu ( <i>B. dothidea</i> )  |
|                                 | <b>3 (najagresivnija)</b> = sve biljke prstenovane i suve, kapljice smole na suvim četinama i stablu ( <i>D. sapinea</i> , <i>N. parvum</i> CMW 39327)  |

**Tabela 8.** Nastavak.

| Inokulisane vrste              | Procena bolesti   |
|--------------------------------|---|
| <i>Quercus robur</i>           | <b>1 (manje agresivna)</b> = biljke sa ulegnutim, elipsoidnim nekrotičnim lezijama dimenzija 1.9-7.5 cm, piknidi se formiraju unutar lezija ( <i>D. seriata</i> CMW 39382)  |
|                                | <b>2 (agresivnija)</b> =>50 % biljaka prstenovano i suvo, piknidi se formiraju unutar suvih biljnih delova, kružne lezije >2cm se formirale na preostalim biljkama ( <i>D. seriata</i> CMW 39376)                         |
| <i>Cupressus arizonica</i>     | <b>1 (manje agresivna)</b> = biljke sa elipsoidnim nekrotičnim lezijama < 2cm, piknidi se formiraju unutar lezija ( <i>B. dothidea</i> CMW 39301)   |
|                                | <b>2 (agresivnija)</b> = biljke sa izduženim do kružnim ulegnutim rak ranama sa vertikalnim pukotinama unutar rak rane i oko rak rane dimenzija > 4cm, piknidi se formiraju unutar lezija ( <i>B. dothidea</i> CMW 39315) |
| <i>Liriodendron tulipifera</i> | <b>1 (manje agresivna)</b> = biljke sa lezijama dimenzija 5.4-8.3 cm ( <i>B. dothidea</i> CMW 39315)  |
|                                | <b>2 (agresivnija)</b> = biljke sa lezijama dimenzija 6-30 cm, > 50 % biljaka sa suvim vrhom i piknidima koji se formiraju u kori suvim biljaka ( <i>B. dothidea</i> CMW 39301)   |

Na deset *V. album* listova po izbojku (deset izbojaka) sterilnom iglom nežno su napravljene rane i micelija prečnika 3 mm sa periferije kolonije *S. visci* stare deset dana postavljena je micelijom prema rani, pokrivena vlažnom vatom i Parafilmom. Deset listova sa deset kontrolnih izbojaka inokulisano je sterilnom WA. Deset listova sa deset sadnica *P. laurocerasus* po izolatu nežno je ranjeno sterilnom iglom i inokulisano kako je opisano u Poglavlju 5. Nakon dve nedelje (*V. album*) i tri nedelje (*A. hippocastanum*, *P. laurocerasus*), merena je dužina vaskularne diskoloracije na izbojcima-nekrotičnim lezijama na listovima, zabeleženo je prisustvo piknida i re-izolacije su urađene kako je opisano u Poglavljima 4, 5. Svi eksperimenti su ponovljeni jednom.

### **6.3.7. Inokulacije u stakleniku**

Deset trogodišnjih ukorenjenih *E. grandis* sadnica i deset petogodišnjih ukorenjenih *P. patula* sadnica inokulisano je sa dva izolata *B. dothidea* i *N. parvum* (Tabela 6). Sadnice su inokulisane u donjem delu stabala kao što je opisano u radu Zlatković i sar. (2016b). Dvadeset kontrolnih sadnica inokulisano je sterilnim WA. Sadnice su zalivane jednom dnevno, držane na temperaturi od 25°C i omogućeno im je da prođu kroz prirodni ciklus dan/noć tokom šest nedelja. Izmerene su dužine lezija i *B. dothidea* i *N. parvum* su ponovo izolovane kao što je opisano u Poglavlju 4.

### **6.3.8. Statističke analize**

Statističke analize urađene su uz pomoć programa Statistica 8.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) i IBM SPSS Statistics 20.0 (New York, USA). Normalnost seta podataka proverena je uz pomoć Kolmogorov-Smirnov testa i Levenovog testa homogenosti varijansi. Rezultati dva uzastopna testa patogenosti upoređivani su uz pomoć t-testa zavisnih uzoraka ili analize varijanse ponovljenih vrednosti (ANOVA) pri  $p < 0.05$ . Pošto nisu pronađene značajne razlike između dva ponavljanja eksperimenta jedan set podataka je korišćen u narednim analizama. Analize su dalje nastavljene uz pomoć Studentovog t-testa, Kruskal-Wallis ne-parametrijske jednosmerne analize ANOVA ( $p < 0.05$ ) ili jednosmerne ANOVA analize praćene post-hock testom najmanjih značajnih razlika (LSD) i vrednosti  $p < 0.05$  su smatrane značajnim.

## **6.4. Rezultati**

### **6.4.1. Simptomi bolesti**

Uzorkovana stabla i žbunovi pokazivali su brojne simptome bolesti uključujući rak rane, curenje smole, sušenje stabala sa vrha, pucanje kore, diskoloraciju drveta i proizvodnju piknida gljive na mrtvom tkivu (Tabela 9).

**Tabela 9.** Simptomi bolesti zapaženi na različitim vrstama drveća i *Botryosphaeriaceae* vrste prouzrokovajući datih simptoma.

| Domaćin                         | Curenje smole | Nekroza/Rak rana |       |        | Die-back |        | Pucanje kore | Diskol. drveta | Plodonosna tela |        |       | Četine/Lišće | <i>Botryosphaeriaceae</i> vrste <sup>1</sup>  |
|---------------------------------|---------------|------------------|-------|--------|----------|--------|--------------|----------------|-----------------|--------|-------|--------------|---|
|                                 |               | Četine/Lišće     | Grana | Stablo | Izbojak  | Stablo |              |                | Šišar.          | Stablo | Grana |              |   |
| <i>Cedrus atlantica</i>         | +             | +                | +     | +      | +        | +      | +            |                |                 |        | +     |              | <i>N. parvum</i>  |
| <i>C. deodara</i>               | +             |                  |       | +      |          | +      | +            |                |                 |        |       |              | – ( <i>D. sapinea</i> )   |
| <i>C. libani</i>                | +             |                  |       | +      |          | +      | +            |                |                 |        |       |              | /   |
| <i>Chamaecyparis lawsoniana</i> | +             | +                | +     | +      | +        | +      | +            | +              | +               | +      | +     |              | <i>B. dothidea</i>  |
| <i>C. obtusa</i>                |               | +                |       |        | +        | +      |              |                |                 |        |       |              | /   |
| <i>C. pisifera</i>              |               | +                |       |        |          | +      |              |                |                 |        |       |              | /   |
| <i>Thuja occidentalis</i>       | +             | +                | +     | +      | +        | +      | +            | +              |                 |        | +     | +            | <i>B. dothidea</i> , <i>N. parvum</i> ,<br><i>D. seriata</i> , <i>Do. sarmentorum</i> |
| <i>T. plicata</i>               | +             | +                | +     | +      | +        | +      |              | +              |                 |        |       | +            | /   |
| <i>Sequoiadendron giganteum</i> | +             | +                |       |        | +        | +      | +            | +              |                 |        |       |              | <i>B. dothidea</i> , <i>N. parvum</i> ,<br><i>Dothiorella</i> sp. 2                   |
| <i>Sequoia sempervirens</i>     |               | +                |       |        | +        |        |              |                |                 |        |       |              | /   |
| <i>Pseudotsuga menziesii</i>    | +             | +                | +     | +      |          |        | +            |                |                 |        |       |              | <i>D. sapinea</i>   |
| <i>Pinus</i> spp.               | +             | +                | +     | +      | +        | +      |              | +              | +               |        |       | +            | <i>D. sapinea</i>   |
| <i>Abies concolor</i>           | +             | +                | +     | +      | +        | +      | +            | +              | +               |        |       |              | <i>B. dothidea</i> , <i>D. seriata</i> ,<br><i>D. sapinea</i>                         |
| <i>Picea abies</i>              | +             | +                | +     |        | +        | +      |              |                |                 |        |       |              | <i>B. dothidea</i> , <i>N. parvum</i>   |
| <i>P. pungens</i>               | +             | +                | +     |        | +        | +      |              |                |                 |        |       |              | <i>D. sapinea</i>   |
| <i>P. omorika</i>               | +             | +                | +     |        | +        | +      |              | +              |                 |        |       |              | <i>D. sapinea</i>   |
| <i>C. sempervirens</i>          | +             | +                | +     | +      | +        | +      | +            | +              | +               | +      |       |              | <i>B. dothidea</i> , <i>D. seriata</i> ,<br><i>D. mutila</i>                          |
| <i>C. arizonica</i>             | +             | +                | +     |        | +        |        | +            | +              | +               |        |       |              | <i>B. dothidea</i> , <i>D. mutila</i>   |
| <i>Cryptomeria japonica</i>     |               | +                |       |        | +        |        |              |                |                 |        |       |              | /   |
| <i>Juniperus horizontalis</i>   |               | +                |       |        | +        | +      |              |                |                 |        |       |              | <i>B. dothidea</i> , <i>D. sapinea</i>  |

**Tabela 9.** Nastavak.

| Domaćin                                  | Curenje smole          | Nekroza/Rak rana |       |        | Die-back |        | Pucanje kore | Diskol. drveta | Šišar. | Plodonosna tela |       | Četine/Lišće | <i>Botryosphaeriaceae</i> vrste                           |
|--|------------------------|------------------|-------|--------|----------|--------|--------------|----------------|--------|-----------------|-------|--------------|---|
|  |                        | Četine/Lišće     | Grana | Stablo | Izboj.   | Stablo |              |                |        | Stablo          | Grana |              |   |
| <i>Prunus laurocerasus</i>               | curenje gumoznih mat.  | +                | +     | +      | +        | +      | +            | +              |        |                 | +     | +            | <i>D. mutila, N. parvum</i>                               |
| <i>P. cerasus</i>                        | curenje gum.mater      |                  | +     | +      | +        | +      | +            | +              |        |                 |       |              | /   |
| <i>Ligustrum vulgare</i>                 |                        |                  | +     | +      | +        | +      |              |                |        | +               | +     |              | <i>D. seriata</i>   |
| <i>Forsythia europaea</i>                |                        |                  |       |        | +        | *      |              |                |        |                 |       |              | /   |
| <i>Magnolia grandiflora</i>              |                        |                  |       |        | +        | +      |              |                |        |                 |       |              | <i>B. dothidea</i>  |
| <i>Liriodendron tulipifera</i>           |                        |                  |       |        | +        | +      |              |                |        |                 |       |              | <i>B. dothidea</i>  |
| <i>Aesculus hippocastanum</i>            | curenje crnog eksudata |                  | +     | +      |          |        |              |                |        |                 |       |              | <i>B. dothidea, N. parvum, D. mutila, Do. sarmentorum</i> |
| <i>Platanus acerifolia</i>               |                        |                  |       | +      |          |        |              |                |        |                 |       |              | /   |
| <i>Quercus robur</i>                     |                        |                  |       | +      |          |        |              |                |        |                 |       |              | <i>D. seriata</i>   |
| <i>Q. ilex</i>                           |                        |                  |       |        | +        | +      |              |                |        | +               | +     |              | /   |
| <i>Q. rubra</i>                          |                        |                  |       |        | +        | +      |              |                |        |                 |       |              | /   |
| <i>Q. cerris</i>                         |                        |                  |       | +      |          |        |              | +              |        |                 |       |              | /   |
| <i>Pittosporum tobira</i>                |                        |                  |       |        | +        | +      |              |                |        |                 |       |              | <i>N. parvum</i>  |
| <i>Rubus fruticosus</i>                  |                        |                  |       |        | +        | +      |              |                |        |                 |       |              | /   |
| <i>Fagus sylvatica</i>                   |                        |                  |       | +      |          |        |              |                | +      |                 |       |              | <i>D. sapinea</i>   |
| <i>Viscum album</i>                      |                        |                  |       |        |          |        |              |                |        | +               |       | +            | <i>S. visci</i>   |
| <i>Populus nigra</i> var. <i>italica</i> |                        |                  |       |        | +        |        |              |                |        |                 | +     |              | /   |
| <i>Salix caprea</i>                      |                        |                  |       |        | +        | +      |              |                | +      | +               | +     |              | /   |
| <i>Taxus baccata</i>                     |                        |                  | +     |        |          |        |              |                |        |                 |       |              | /   |
| <i>Fraxinus excelsior</i>                |                        |                  | +     |        |          |        |              |                |        |                 |       |              | /   |
| <i>Eucalyptus globulus</i>               | curenje crnog kina     |                  |       | +      |          |        |              | +              |        |                 |       |              | /   |
| <i>P. tremula</i>                        |                        |                  |       | +      |          |        |              | +              |        |                 |       |              | /   |

**Tabela 9.** \*Izbojci su postali crvenkasto braon boje i kukasti sa listovima koji su još uvek bili na izbojku. <sup>1</sup> *Botryosphaeriaceae* vrste uključene u pojavu simptoma bolesti:  
/ Testovi patogenosti nisu urađeni. – *Botryosphaeriaceae* vrste nisu patogene prema datom domaćinu.

#### 6.4.2. Izolacija *Botryosphaeriaceae* gljiva

U ovom istraživanju, dobijeno je ukupno 188 *Botryosphaeriaceae*-sličnih izolata. Takođe, 120 izolata dobijeno je u prethodnim istraživanjima (Poglavlja 3, 4, 5) i uključeno u naredne analize. Od ovih, 285 izolata dobijeno je iz ukrasnog drveća u gradskim i seoskim sredinama, 14 izolata dobijeno je iz stabala u šumskim sastojinama, pet izolata dobijeno je iz šumskih plantaža i četiri izolata dobijeno je iz sadnica u rasadnicima ukrasnog bilja (Tabele S3, S4).

Među sakupljenim uzorcima, *Botryosphaeriaceae* su najčešće izolovane iz nekrotičnih lezija i rak rana (45.4 % od ukupnog broja uzoraka), zatim iz smolavih lezija i tkiva (22 %). *Botryosphaeriaceae* su samo povremeno izolovane iz zdravih tkiva (1.3 %), diskolorisanog drveta (4.9 %) i margina na izgled zdravog i suvog drveta stabala sa simptomom sušenja vrha (5.2 %) (Tabela 10).

#### 6.4.3. Analize DNA sekvenci

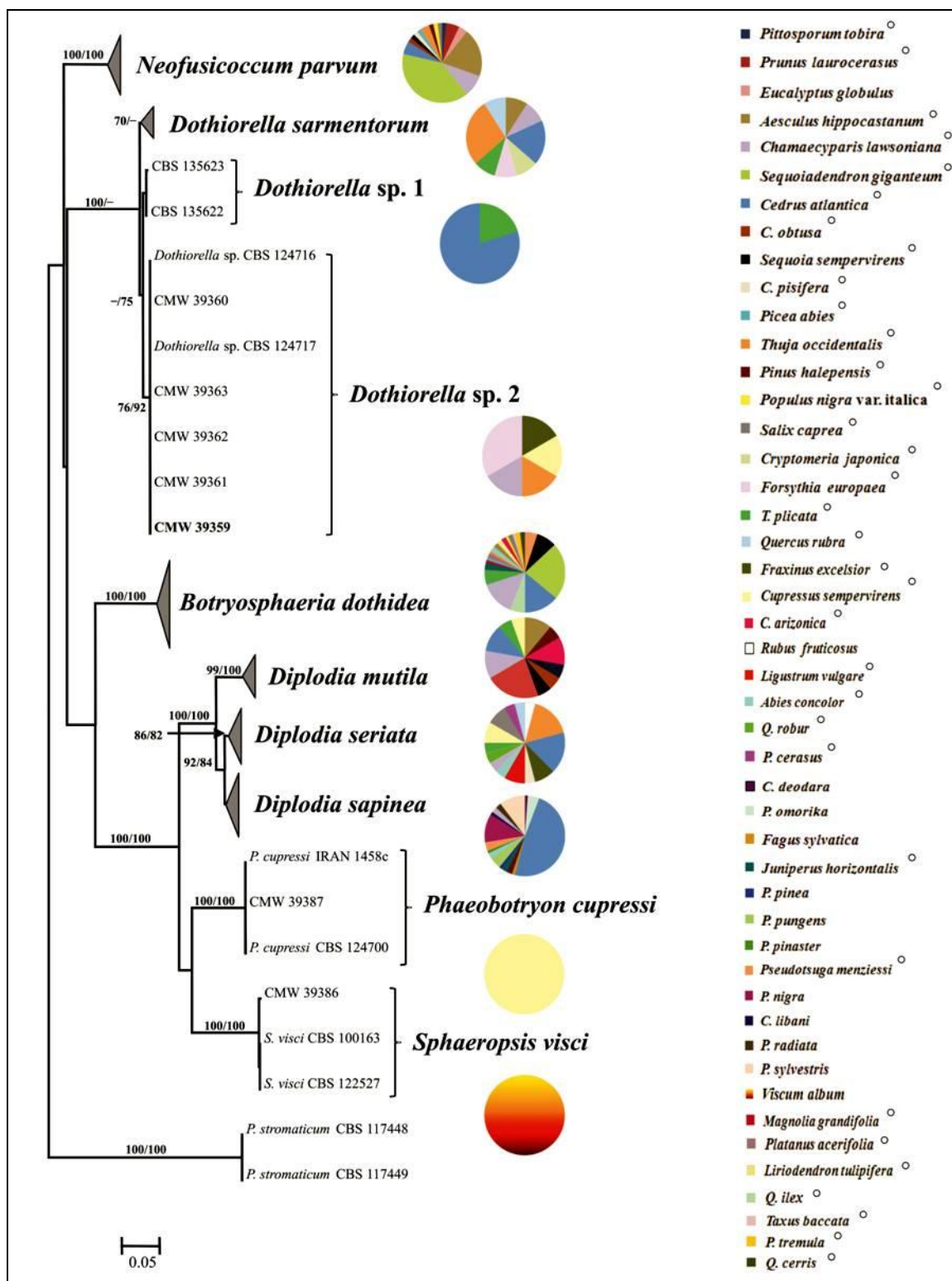
Preliminarna identifikacija izolata dobijenih u ovom istraživanju urađena je na osnovu ITS sekvenci i izolati *N. parvum* su naknadno podvrgnuti MP analizama kombinacije ITS, TEF-1 $\alpha$ ,  $\beta$ -tub i RPB2 genskih regiona (stabla nisu prikazana). Na osnovu ovih analiza, izolati dobijeni u ovom istraživanju identifikovani su kao *D. seriata*, *D. mutila*, *B. dothidea*, *Do. sarmentorum*, *Dothiorella* sp. 2 i *N. parvum*. U analize su uključeni i reprezentativni izolati sa svakog domaćina četiri predhodno identifikovane vrste i to *Dothiorella* sp. 1, *S. visci*, *P. cupressi* i *Diplodia sapinea* (Fr.) Fuckel (Poglavlja 3, 4). Reprezentativni izolati svakog domaćina i svake identifikovane vrste (uključujući četiri predhodno identifikovane) podvrgnuti su MP i ML analizama ITS sekvenci (Fig. 15).

ITS set podataka sadržao je 145 sekvenci, a gljiva *Pseudofusicoccum stromaticum* (CBS 117448, CBS 117449) korišćena je kao spoljna vrsta. Set sekvenci sadržao je 528 karaktera među kojima je 150 bilo parsimoni informativno, 378 je bilo parsimoni neinformativno, sa CI=0.8, RI=0.9 i TL=247. Model GTR+G je izabran za ML analize (G=0.2050). Topologije stabala koja su nastala kao rezultat MP i ML analiza bile su slične i stoga je samo ML stablo prikazano (Fig. 15).



**Tabela 10.** *Botryosphaeriaceae* vrste izolovane iz različnih delova stabla. Vrednosti predstavljaju broj i procenat uzoraka iz kojih su *Botryosphaeriaceae* izolovane.

| <i>Botryosphaeriaceae</i><br>vrste | Smolavo          |         |       |        |      |          | Nekrotično/Rak rane |         |       |        |     | Sušenje<br>sa<br>vrha | Diskol.<br>drveta | Plod.<br>tela | Suvo | Zdravo | Total       | % |
|------------------------------------|------------------|---------|-------|--------|------|----------|---------------------|---------|-------|--------|-----|-----------------------|-------------------|---------------|------|--------|-------------|---|
|                                    | Četine/<br>Lišće | Izbojak | Grana | Stablo | Kora | Šišarica | Četine/<br>Lišće    | Izbojak | Grana | Stablo |     |                       |                   |               |      |        |             |   |
| <i>Diplodia sapinea</i>            | 3                | 1       | 13    | 17     | 0    | 5        | 0                   | 4       | 6     | 12     | 4   | 1                     | 13                | 6             | 2    | 87     | <b>28.2</b> |   |
| <i>D. mutila</i>                   | 0                | 0       | 1     | 1      | 0    | 1        | 0                   | 4       | 1     | 5      | 0   | 1                     | 3                 | 1             | 0    | 18     | <b>5.8</b>  |   |
| <i>D. seriata</i>                  | 0                | 1       | 2     | 0      | 0    | 0        | 3                   | 1       | 4     | 4      | 0   | 2                     | 4                 | 3             | 0    | 24     | <b>7.8</b>  |   |
| <i>Dothiorella sp. 1</i>           | 0                | 0       | 0     | 0      | 0    | 0        | 1                   | 0       | 1     | 1      | 0   | 0                     | 1                 | 1             | 0    | 5      | <b>1.6</b>  |   |
| <i>Dothiorella sp. 2</i>           | 0                | 0       | 0     | 0      | 0    | 0        | 2                   | 0       | 2     | 1      | 0   | 1                     | 1                 | 0             | 0    | 6      | <b>1.9</b>  |   |
| <i>Do. sarmentorum</i>             | 0                | 0       | 1     | 0      | 0    | 0        | 2                   | 3       | 0     | 2      | 0   | 0                     | 2                 | 1             | 0    | 11     | <b>3.6</b>  |   |
| <i>Botryosphaeria dothidea</i>     | 2                | 0       | 4     | 3      | 2    | 0        | 20                  | 9       | 11    | 13     | 10  | 5                     | 11                | 8             | 1    | 99     | <b>32.1</b> |   |
| <i>Neofusicoccum parvum</i>        | 0                | 1       | 6     | 2      | 0    | 0        | 11                  | 8       | 2     | 11     | 2   | 6                     | 2                 | 4             | 1    | 56     | <b>18.2</b> |   |
| <i>Sphaeropsis visci</i>           | 0                | 0       | 0     | 0      | 0    | 0        | 0                   | 0       | 0     | 0      | 0   | 0                     | 1                 | 0             | 0    | 1      | <b>0.3</b>  |   |
| <i>Phaeobotryon cupressi</i>       | 0                | 0       | 1     | 0      | 0    | 0        | 0                   | 0       | 0     | 0      | 0   | 0                     | 0                 | 0             | 0    | 1      | <b>0.3</b>  |   |
| Total                              | 5                | 3       | 29    | 23     | 2    | 6        | 38                  | 28      | 26    | 48     | 16  | 15                    | 38                | 26            | 4    | 308    | <b>100</b>  |   |
| %                                  | 1.6              | 1       | 9.4   | 7.5    | 0.6  | 1.9      | 12.3                | 9.1     | 8.4   | 15.6   | 5.2 | 4.9                   | 12.3              | 8.4           | 1.3  | 100    |             |   |

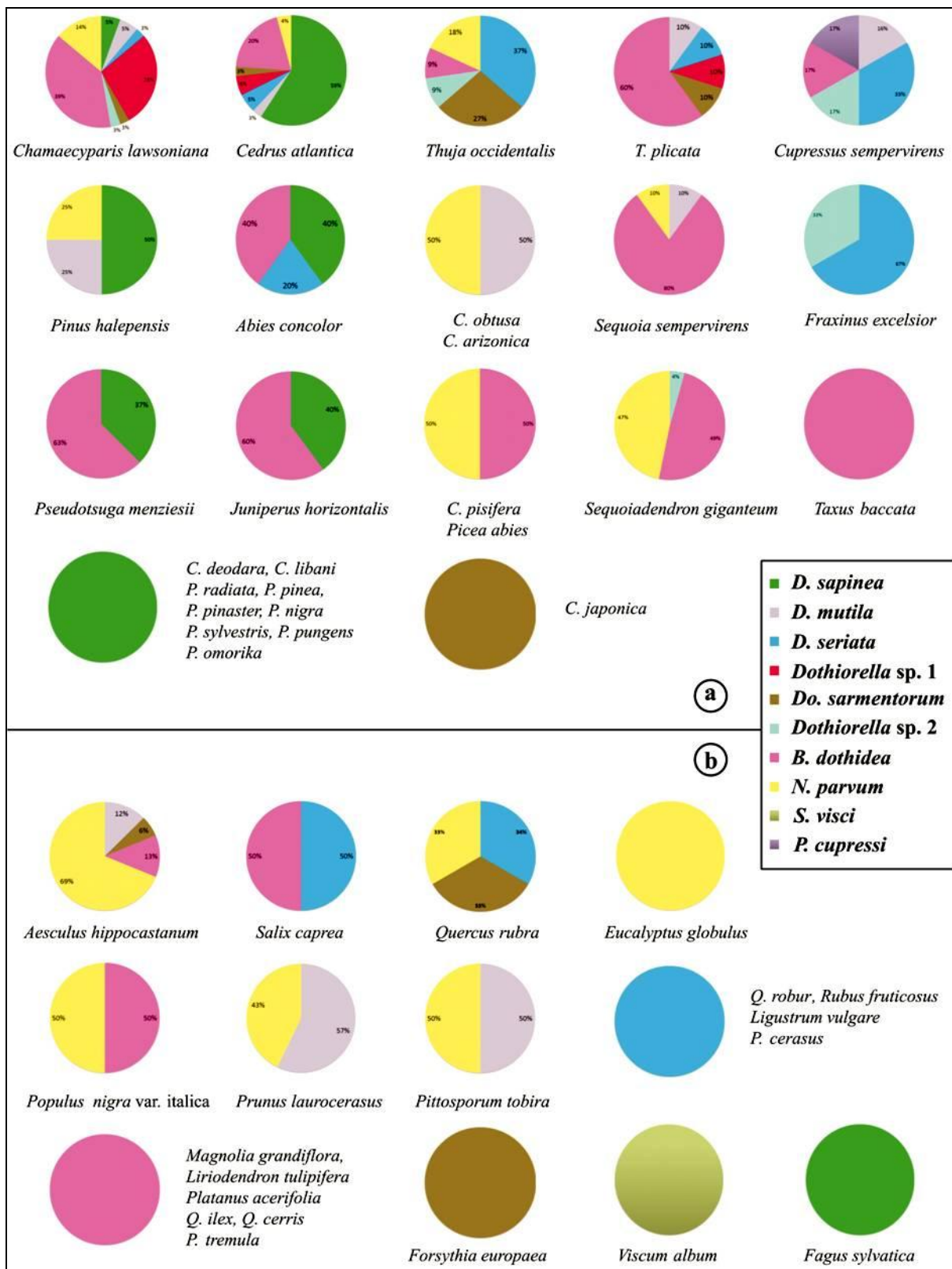


**Figura 15.** Maximum likelihood (ML) stablo ITS sekvenci. Vrednosti bootstrap podrške (MP/ML  $\geq 70$  %) date su na čvorovima i razmera predstavlja broj promena. Stablo je ukorenjeno sa *P. stromaticum* CBS 117448 i CBS 117449. Izolati sekvencirani u ovom istraživanju su boldovani. Grane koje odgovaraju *Botryosphaeriaceae* vrstama koje su izolovane iz više od pet domaćina su kolapsirane. Kolapsirane grane prikazane su kao sivi trouglovi i veličina trouglova je proporcionalna broju domaćina. Pite predstavljaju domaćine iz kojih su *Botryosphaeriaceae* izolovane. Domaćini iz ovog istraživanja obeleženi su krugovima.

#### 6.4.4. Analize diverziteta *Botryosphaeriaceae* gljiva

Najčešće izolovana vrsta u ovom istraživanju bila je *B. dothidea* (32.1 %), zatim sledi *D. sapinea* (28.2 %) i *N. parvum* (18.2 %). *Dothiorella* sp. 2 (1.9 %), *Dothiorella* sp. 1 (1.6 %), *S. visci* (0.3 %) i *P. cupressi* (0.3 %) izolovane su samo povremeno. Najveći broj *Botryosphaeriaceae* vrsta najčešće je izolovan iz nekrotičnih lezija i rak rana. Izuzetak je bila gljiva *D. sapinea* koja je najčešće izolovana iz nekrotičnih lezija i tkiva (44.8 %), *S. visci* je izolovana iz piknida i *P. cupressi* je izolovana samo iz smolave lezije na grani (Tabela 10).

Rezultati LSD testa ukazali su na to da postoje značajne razlike ( $p < 0.05$ ) u privrženosti određenim domaćinima između *Botryosphaeriaceae* vrsta. *P. cupressi*, *S. visci* i *Dothiorella* sp. 1. pokazali su najveću privrženost jer su izolovani iz samo jednog domaćina ili iz dva domaćina. Svaka od preostalih sedam *Botryosphaeriaceae* vrsta pokazivala je jedinstvenu privrženost određenim domaćinima (Fig. 15, 16). Nove veze na relaciji patogen-domaćin stvorene su za *Do. sarmentorum*, *Dothiorella* sp. 1, *Dothiorella* sp. 2, *B. dothidea*, *D. mutila*, *D. seriata* i *N. parvum* (Tabela 11). Shannon Weiner indeks diverziteta ( $H'$ ) pokazao je najveći diverzitet *Botryosphaeriaceae* vrsta na *T. occidentalis* ( $H' = 0.61$ ), zatim na *T. plicata* ( $H' = 0.53$ ) i iz 27 domaćina izolovana je samo jedna vrsta. Visoke vrednosti podjednakosti (Evenness ( $J = 0.58-0.91$ )) pokazale su jednakost zajednica kod većine domaćina (Tabela 12). LSD test pokazao je da postoje značajne razlike ( $p < 0.05$ ) u kompoziji i diverzitetu *Botryosphaeriaceae* vrsta na različitim domaćinima (Tabele 12, Fig. 16).



**Figura 16.** *Botryosphaeriaceae* vrste izolovane iz golosemenica i skrivenosemenica. **a.** golosemenice; **b.** skrivenosemenice

**Tabela 11.** Novi domaćini *Botryosphaeriaceae* vrsta u ovom istraživanju.

| <i>Botryosphaeriaceae</i> vrste | Novi domaćin  | <i>Botryosphaeriaceae</i> vrste | Novi domaćin  |
|---------------------------------|---|---------------------------------|---|
| <b><i>Do. sarmentorum</i></b>   | <i>Quercus rubra</i><br><i>Cryptomeria japonica</i><br><i>Forsythia europaea</i><br><i>Thuja plicata</i><br><i>T. occidentalis</i>  | <b><i>D. mutila</i></b>         | <i>Pittosporum tobira</i><br><i>Prunus laurocerasus</i><br><i>C. sempervirens</i><br><i>C. obtusa</i><br><i>C. atlantica</i><br><i>T. plicata</i>   |
| <b><i>Dothiorella</i> sp. 1</b> | <i>T. plicata</i><br><i>Cedrus atlantica</i>  | <b><i>D. seriata</i></b>        | <i>Q. robur</i><br><i>A. concolor</i><br><i>S. caprea</i><br><i>P. cerasus</i><br><i>Q. rubra</i>   |
| <b><i>Dothiorella</i> sp. 2</b> | <i>Sequoiadendron giganteum</i><br><i>Cupressus sempervirens</i>  | <b><i>N. parvum</i></b>         | <i>C. obtusa</i><br><i>C. pisifera</i><br><i>T. occidentalis</i><br><i>Sequoia sempervirens</i><br><i>Pinus halepensis</i><br><i>P. abies</i><br><i>S. caprea</i><br><i>P. laurocerasus</i> |
| <b><i>B. dothidea</i></b>       | <i>C. atlantica</i><br><i>Chamaecyparis lawsoniana</i><br><i>T. occidentalis</i><br><i>T. plicata</i><br><i>C. arizonica</i><br><i>Abies concolor</i><br><i>Picea abies</i><br><i>Juniperus horizontalis</i><br><i>Magnolia grandiflora</i><br><i>Liriodendron tulipifera</i><br><i>Platanus acerifolia</i><br><i>Aesculus hippocastanum</i><br><i>Salix caprea</i><br><i>C. sempervirens</i><br><i>Taxus baccata</i><br><i>Q. cerris</i><br><i>Populus tremula</i> |                                 |   |

**Tabela 12.** Diverzitet i preklapanje *Botryosphaeriaceae* vrsta izolovanih iz različitih domaćina

| Domaćin                             | Bogatstvo vrsta (S) | Obilje | Shannon indeks (H') <sup>1</sup> | Podjednakost (J) <sup>1</sup> | LSD 0.05 <sup>2</sup> |
|-------------------------------------|---------------------|--------|----------------------------------|-------------------------------|-----------------------|
| Golosemenice                        |                     |        |                                  |                               |                       |
| <i>Chamaecyparis lawsoniana</i>     | 7                   | 26     | 0.44                             | 0.73                          | A                     |
| <i>Cedrus atlantica</i>             | 7                   | 71     | 0.30                             | 0.66                          | A                     |
| <i>Cupressus sempervirens</i>       | 5                   | 6      |                                  |                               | B                     |
| <i>Thuja plicata</i>                | 5                   | 10     | 0.53                             | 0.76                          | B                     |
| <i>T. occidentalis</i>              | 5                   | 11     | 0.61                             | 0.91                          | B                     |
| <i>Abies concolor</i>               | 3                   | 5      |                                  |                               | D                     |
| <i>Sequoiadendron giganteum</i>     | 3                   | 47     | 0.22                             | 0.76                          | D                     |
| <i>Pinus halepensis</i>             | 3                   | 4      |                                  |                               | D                     |
| <i>Sequoia sempervirens</i>         | 3                   | 10     | 0.28                             | 0.58                          | D                     |
| <i>C. pisifera</i>                  | 2                   | 2      |                                  |                               | D                     |
| <i>C. obtusa</i>                    | 2                   | 2      |                                  |                               | D                     |
| <i>C. arizonica</i>                 | 2                   | 4      |                                  |                               | D                     |
| <i>Pseudotsuga menziesii</i>        | 2                   | 8      |                                  |                               | D                     |
| <i>Juniperus horizontalis</i>       | 2                   | 5      |                                  |                               | D                     |
| <i>Picea abies</i>                  | 2                   | 2      |                                  |                               | D                     |
| <i>P. nigra</i>                     | 1                   | 10     | 0                                | 0                             | E                     |
| <i>P. sylvestris</i>                | 1                   | 9      |                                  |                               | E                     |
| <i>C. deodara</i>                   | 1                   | 1      |                                  |                               | E                     |
| <i>P. pungens</i>                   | 1                   | 4      |                                  |                               | E                     |
| <i>P. omorika</i>                   | 1                   | 4      |                                  |                               | E                     |
| <i>C. libani</i>                    | 1                   | 1      |                                  |                               | E                     |
| <i>P. radiata</i>                   | 1                   | 2      |                                  |                               | E                     |
| <i>P. pinea</i>                     | 1                   | 1      |                                  |                               | E                     |
| <i>P. pinaster</i>                  | 1                   | 1      |                                  |                               | E                     |
| <i>Cryptomeria japonica</i>         | 1                   | 1      |                                  |                               | E                     |
| <i>Taxus baccata</i>                | 1                   | 1      |                                  |                               | E                     |
| Skrivenosemenice                    |                     |        |                                  |                               |                       |
| <i>Aesculus hippocastanum</i>       | 4                   | 16     | 0.34                             | 0.69                          | C                     |
| <i>Salix caprea</i>                 | 2                   | 4      |                                  |                               | D                     |
| <i>Prunus laurocerasus</i>          | 2                   | 7      |                                  |                               | D                     |
| <i>Fraxinus excelsior</i>           | 2                   | 3      |                                  |                               | D                     |
| <i>Pittosporum tobira</i>           | 2                   | 2      |                                  |                               | D                     |
| <i>Quercus rubra</i>                | 3                   | 3      |                                  |                               | D                     |
| <i>Q. ilex</i>                      | 1                   | 6      |                                  |                               | E                     |
| <i>Ligustrum vulgare</i>            | 1                   | 2      |                                  |                               | E                     |
| <i>Populus tremula</i>              | 1                   | 2      |                                  |                               | E                     |
| <i>Eucalyptus globulus</i>          | 1                   | 2      |                                  |                               | E                     |
| <i>Platanus acerifolia</i>          | 1                   | 2      |                                  |                               | E                     |
| <i>Viscum album</i>                 | 1                   | 1      |                                  |                               | E                     |
| <i>Forsythia europaea</i>           | 1                   | 1      |                                  |                               | E                     |
| <i>Magnolia grandiflora</i>         | 1                   | 1      |                                  |                               | E                     |
| <i>Liriodendron tulipifera</i>      | 1                   | 1      |                                  |                               | E                     |
| <i>Fagus sylvatica</i>              | 1                   | 1      |                                  |                               | E                     |
| <i>Q. robur</i>                     | 1                   | 1      |                                  |                               | E                     |
| <i>Rubus fruticosus</i>             | 1                   | 1      |                                  |                               | E                     |
| <i>P. nigra</i> var. <i>italica</i> | 2                   | 2      |                                  |                               | E                     |
| <i>P. cerasus</i>                   | 1                   | 1      |                                  |                               | E                     |
| <i>Q. cerris</i>                    | 1                   | 2      |                                  |                               | E                     |

<sup>1</sup>Indeksi diverziteta izračunati su samo za domaćine iz kojih je dobijeno najmanje deset izolata . <sup>2</sup>Domaćini sa istim slovom se nisu značajno razlikovali u pogledu kompozicije *Botryosphaeriaceae* vrsta pri 0.05 vrednosti verovatnoće koristeći LSD test.

Nije bilo značajnih razlika u pogledu diverziteta *Botryosphaeriaceae* vrsta izolovanih iz skrivenosemenica ( $H'=0.42$ ) u poređenju sa golosemenicama ( $H'=0.29$ ,  $p>0.05$ ). Visoke vrednosti Podjednakosti (Evenness (0.76 and 0.8)) pokazale su da su zajednice ovih vrsta relativno slične. Jaccard-ov indeks pokazao je relativno veliko preklapanje vrsta izolovanih iz golosemenica i skrivenosemenica ( $J'=0.7$ , Tabela 14). Kompozicija vrsta razlikovala se tako da je gljiva *S. visci* nađena samo na skrivenosemenicama, *Dothiorella* sp. 1 i *P. cupressi* su izolovane samo iz golosemenica, *B. dothidea* i *D. seriata* su izolovane iz golosemenica i iz skrivenosemenica sa gotovo jednakom učestalošću, a sve ostale *Botryosphaeriaceae* vrste najčešće su izolovane iz golosemenica ( $p<0.05$ ) (Tabela 14).

**Tabela 13.** Procenat izolata svake *Botryosphaeriaceae* vrste izolovane iz golosemenica i skrivenosemenica

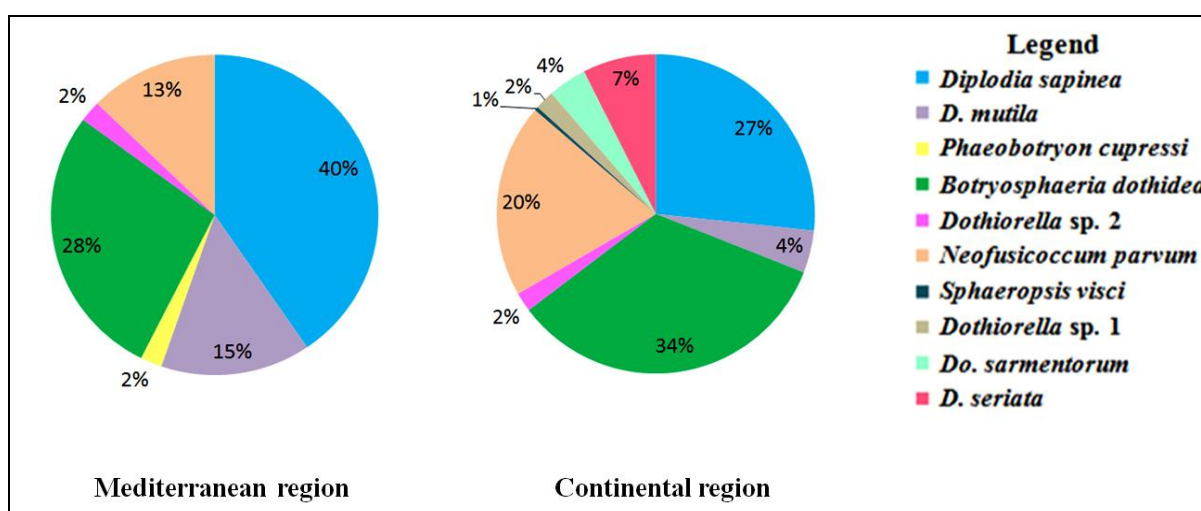
| Botryosphaeriaceae vrste       | Golosemenice (%) | Skrivenosemenice (%) | Statistička značajnost |
|--------------------------------|------------------|----------------------|------------------------|
| <i>Botryosphaeria dothidea</i> | 54.5             | 45.5                 | >0.05                  |
| <i>Neofusicoccum parvum</i>    | 60               | 40                   | <0.05                  |
| <i>Diplodia sapinea</i>        | 93.8             | 6.2                  | <0.05                  |
| <i>D. mutila</i>               | 72.7             | 27.3                 | <0.05                  |
| <i>D. seriata</i>              | 50               | 50                   | >0.05                  |
| <i>Dothiorella</i> sp. 1       | 100              | /                    | /                      |
| <i>Do. sarmentorum</i>         | 62.5             | 37.5                 | <0.05                  |
| <i>Dothiorella</i> sp. 2       | 80               | 20                   | <0.05                  |
| <i>Phaeobotryon cupressi</i>   | 100              | /                    | /                      |
| <i>Sphaeropsis visci</i>       | /                | 100                  | /                      |

Nije bilo značajnih razlika u pogledu diverziteta *Botryosphaeriaceae* vrsta u kontinentalnom regionu (CR) ( $H'=0.30$ ) u poređenju sa mediteranskim regionom (MR) ( $H'=0.37$ ,  $p>0.05$ ). Visoke vrednosti Podjednakosti (Evenness) ukazale su na gotovo podjednaku distribuciju vrsta (0.77 i 0.8) i Jaccard-ov indeks pokazao je prosečnu podudarnost vrsta ( $J'=0.5$ ). *D. seriata*, *Do. sarmentorum*, *Dothiorella* sp. 1 i *S. visci* nađene su samo u CR; *P. cupressi* je nađena samo u MR i pet vrsta je nađeno u oba klimatska regiona (Tabela 14, Fig. 17).



**Tabela 14.** Diverzitet *Botryosphaeriaceae* vrsta izolovanih iz domačina u kontinentalnom i mediteranskom regionu i izolovanih iz golosemenica i skrivenosemenica

| Klimatski region/<br>Domaćini | Bogatstvo<br>vrsta (S) | Obilje | Shannon<br>indeks (H') | Podjednakost<br>(J) | Jaccard<br>indeks (J') |
|-------------------------------|------------------------|--------|------------------------|---------------------|------------------------|
| <b>Kontinentalni</b>          | 9                      | 262    | 0.30                   | 0.77                | 0.5                    |
| <b>Mediteranski</b>           | 6                      | 47     | 0.37                   | 0.8                 |                        |
| <b>Golosemenice</b>           | 9                      | 254    | 0.29                   | 0.76                | 0.7                    |
| <b>Skrivenosemenice</b>       | 8                      | 55     | 0.42                   | 0.8                 |                        |
| Total                         | 10                     | 309    | 0.29                   | 0.74                | –                      |



**Figure 17.** *Botryosphaeriaceae* vrste izolovane iz domačina u regionu sa mediteranskom i kontinentalnom klimom.

Pojedinačna stabla, delovi stabala i lezije često su bile kolonizovane sa nekoliko *Botryosphaericeae* vrsta. Do pet vrsta je nađeno u istom obolelom domačinu i do tri vrste su izolovane iz istih delova stabla (Tabela 15). *B. dothidea* i *N. parvum* su gljive koje su najčešće bile nađene zajedno u istom stablu (16 %), *B. dothidea* je najčešće bila nađena (30.6 %) u istom stablu i istom delu stabla (24.5 %) u kombinaciji sa drugim vrstama (Tabela 16) i više *Botryosphaeriaceae* vrsta je najčešće izolovano iz *C. atlantica* (22.2 %) (Tabela 17).

**Tabela 15.** *Botryosphaeriaceae* vrste izolovane iz istog stabla i tkiva.

| Kompozicija <i>Botryosphaeriaceae</i> vrsta (jedno stablo)   | Domaćin  |
|--|--|
| <i>Botryosphaeria dothidea</i> / <i>Diplodia seriata</i>   | <i>Chamaecyparis lawsoniana</i><br><i>Salix caprea</i>   |
| <i>B. dothidea</i> / <i>Diplodia mutila</i>  | <i>Cupressus arizonica</i>   |
| <i>B. dothidea</i> / <i>Diplodia sapinea</i>   | <i>Cedrus atlantica</i><br><i>Pseudotsuga menziessi</i>  |
| <i>B. dothidea</i> / <i>Neofusicoccum parvum</i>   | <i>Sequoiadendron giganteum</i><br><i>C. lawsoniana</i><br><i>Aesculus hippocastanum</i><br><i>Populus nigra</i> var. <i>italica</i> |
| <i>B. dothidea</i> / <i>Dothiorella</i> sp. 1  | <i>C. atlantica</i>  |
| <i>B. dothidea</i> / <i>N. parvum</i> / <i>Dothiorella</i> sp. 2                                       | <i>S. giganteum</i>  |
| <i>B. dothidea</i> / <i>N. parvum</i> / <i>D. mutila</i>   | <i>Sequoia sempervirens</i>  |
| <i>B. dothidea</i> / <i>D. mutila</i> / <i>Dothiorella sarmentorum</i>                                 | <i>Thuja plicata</i>   |
| <i>B. dothidea</i> / <i>D. sapinea</i> / <i>D. mutila</i> / <i>D. seriata</i> / <i>Do. sarmentorum</i> | <i>C. atlantica</i>  |
| <i>N. parvum</i> / <i>D. sapinea</i>   | <i>C. atlantica</i>  |
| <i>N. parvum</i> / <i>D. seriata</i>   | <i>Chamaecyparis pisifera</i>  |
| <i>N. parvum</i> / <i>D. mutila</i>  | <i>C. atlantica</i><br><i>Chamaecyparis obtusa</i><br><i>Pittosporum tobira</i><br><i>Prunus laurocerasus</i>                        |
| <i>N. parvum</i> / <i>Do. sarmentorum</i>  | <i>A. hippocastanum</i>  |
| <i>N. parvum</i> / <i>D. seriata</i> / <i>Do. sarmentorum</i>  | <i>Quercus rubra</i>   |
| <i>Do. sarmentorum</i> / <i>Dothiorella</i> sp. 1  | <i>C. atlantica</i>  |
| <i>Do. sarmentorum</i> / <i>D. mutila</i>  | <i>C. lawsoniana</i>   |
| <i>Do. sarmentorum</i> / <i>D. seriata</i>   | <i>Thuja occidentalis</i>  |
| <i>Dothiorella</i> sp. 2 / <i>Phaeobotryon cupressi</i>  | <i>Cupressus sempervirens</i>  |
| <i>Dothiorella</i> sp. 2 / <i>D. seriata</i>   | <i>Fraxinus excelsior</i>  |

**Tabela 16.** Učestalost pojave više *Botryosphaeriaceae* vrsta koje obitavaju u istim obolelim stablima (A) i unutar istih obolelih delova stabla (B). Stabla i delovi stabala sa najvećom učestalošću su boldovani i osenčeni.

| <i>Botryosphaeriaceae</i> vrste u istom tkivu (A)        | Učestalost pojave (%) | <i>Botryosphaeriaceae</i> vrste u istom tkivu (B)   | Učestalost pojave (%) | <i>Botryosphaeriaceae</i> vrste | Učestalost pojave (%) |
|--|-----------------------|---|-----------------------|---------------------------------|-----------------------|
|  |                       |   |                       | (A)                             |                       |
| <i>Botryosphaeria dothidea</i> / <i>Diplodia seriata</i> | 6                     | <b><i>B. dothidea</i> / <i>Diplodia mutila</i></b>  | <b>13</b>             | <b><i>B. dothidea</i></b>       | <b>30.6</b>           |
| <i>B. dothidea</i> / <i>Diplodia mutila</i>              | 12                    | <b><i>B. dothidea</i> / <i>Diplodia sapinea</i></b> | <b>13</b>             | <i>N. parvum</i>                | 22.4                  |
| <i>B. dothidea</i> / <i>Diplodia sapinea</i>             | 10                    | <i>B. dothidea</i> / <i>Neofusicoccum parvum</i>    | 6                     | <i>D. mutila</i>                | 17.6                  |
| <b><i>B. dothidea</i> / <i>Neofusicoccum parvum</i></b>  | <b>16</b>             | <i>B. dothidea</i> / <i>Dothiorella</i> sp. 1       | 6                     | <i>D. seriata</i>               | 12.9                  |
| <i>B. dothidea</i> / <i>Dothiorella</i> sp. 2            | 2                     | <i>B. dothidea</i> / <i>Dothiorella sarmentorum</i> | 6                     | <i>D. sapinea</i>               | 10.6                  |
| <i>B. dothidea</i> / <i>Dothiorella</i> sp. 1            | 2                     | <i>N. parvum</i> / <i>D. sapinea</i>                | 6                     | <i>Dothiorella</i> sp. 1        | 2.4                   |
| <i>B. dothidea</i> / <i>Dothiorella sarmentorum</i>      | 4                     | <i>N. parvum</i> / <i>D. mutila</i>                 | 6                     | <i>Dothiorella</i> sp. 2        | 2.4                   |
| <i>N. parvum</i> / <i>D. sapinea</i>                     | 2                     | <i>N. parvum</i> / <i>Do. sarmentorum</i>           | 6                     | <i>Phaeobotryon cupressi</i>    | 1.2                   |
| <i>N. parvum</i> / <i>D. seriata</i>                     | 4                     | <i>D. sapinea</i> / <i>D. seriata</i>               | 6                     | (B)                             |                       |
| <i>N. parvum</i> / <i>D. mutila</i>                      | 10                    | <b><i>Do. sarmentorum</i> / <i>D. mutila</i></b>    | <b>13</b>             | <b><i>B. dothidea</i></b>       | <b>24.5</b>           |
| <i>N. parvum</i> / <i>Do. sarmentorum</i>                | 4                     | <i>Do. sarmentorum</i> / <i>Dothiorella</i> sp. 1   | 6                     | <i>N. parvum</i>                | 22.4                  |
| <i>N. parvum</i> / <i>Dothiorella</i> sp. 2              | 2                     | <i>Dothiorella</i> sp. / <i>D. seriata</i>          | 6                     | <i>D. sapinea</i>               | 10.2                  |
| <i>D. sapinea</i> / <i>D. mutila</i>                     | 2                     |   |                       | <i>Do. sarmentorum</i>          | 10.2                  |
| <i>D. sapinea</i> / <i>D. seriata</i>                    | 2                     |   |                       | <i>D. seriata</i>               | 6.1                   |
| <i>D. mutila</i> / <i>D. seriata</i>                     | 2                     |   |                       | <i>Dothiorella</i> sp. 1        | 4.1                   |
| <i>Do. sarmentorum</i> / <i>D. sapinea</i>               | 2                     |   |                       | <i>D. mutila</i>                | 2                     |
| <i>Do. sarmentorum</i> / <i>Dothiorella</i> sp. 1        | 2                     |   |                       | <i>Dothiorella</i> sp. 2        | 2                     |
| <i>Do. sarmentorum</i> / <i>D. mutila</i>                | 6                     |   |                       |                                 |                       |
| <i>Do. sarmentorum</i> / <i>D. seriata</i>               | 6                     |   |                       |                                 |                       |
| <i>Dothiorella</i> sp. 2 / <i>Phaeobotryon cupressi</i>  | 2                     |   |                       |                                 |                       |
| <i>Dothiorella</i> sp. 2 / <i>D. seriata</i>             | 2                     |   |                       |                                 |                       |

**Tabela 17.** Učestalost izolacije više *Botryosphaeriaceae* vrsta iz istog stabla različitih vrsta drveća.

| Domaćin                         | Učestalost (%) |
|---------------------------------|----------------|
| <b><i>Cedrus atlantica</i></b>  | <b>22.2</b>    |
| <i>Chamaecyparis lawsoniana</i> | 11.1           |
| <i>Sequoiadendron giganteum</i> | 7.4            |
| <i>Aesculus hippocastanum</i>   | 7.4            |
| <i>Cupressus arizonica</i>      | 3.7            |
| <i>Pseudotsuga menziesii</i>    | 3.7            |
| <i>Pinus nigra</i>              | 3.7            |
| <i>Sequoia sempervirens</i>     | 3.7            |
| <i>Thuja plicata</i>            | 3.7            |
| <i>C. pisifera</i>              | 3.7            |
| <i>C. obtusa</i>                | 3.7            |
| <i>Pittosporum tobira</i>       | 3.7            |
| <i>Prunus laurocerasus</i>      | 3.7            |
| <i>Quercus rubra</i>            | 3.7            |
| <i>T. occidentalis</i>          | 3.7            |
| <i>C. sempervirens</i>          | 3.7            |
| <i>Fraxinus excelsior</i>       | 3.7            |

#### 6.4.5. Inokulacije sadnica u polju

*Botryosphaeria dothidea* i *P. cupressi* mogle su da inficiraju *C. lawsoniana* i *P. cupressi* je bila najagresivnija vrsta. Izolat *B. dothidea* iz *C. lawsoniana* iz CR i šest drugih *Botryosphaeriaceae* vrsta nisu mogle da inficiraju ovog domaćina (Tabele 8, 18, 19; Fig. 18). Pokazalo se da je *D. seriata* izolovana iz *C. pisifera* sposobna da inficira *Q. robur* i bila je agresivnija u poređenju sa izolatom iz *Q. robur* (Tabele 8, 18, 19; Fig. 20). *N. parvum*, *D. sapinea* i *B. dothidea* mogle su da inficiraju *P. abies*. *D. sapinea* i *N. parvum* izolovane iz *C. lawsoniana* bile su najagresivnije gljive i one su na kraju ubile inokulisane biljke (Tabele 8, 18, 19; Fig. 19). *B. dothidea* i *D. mutila* mogle su da inficiraju *C. arizonica* i *B. dothidea* izolovana iz *C. lawsoniana* iz MR bila je najagresivnija gljiva (Tabele 8, 18, 19; Fig. 19).

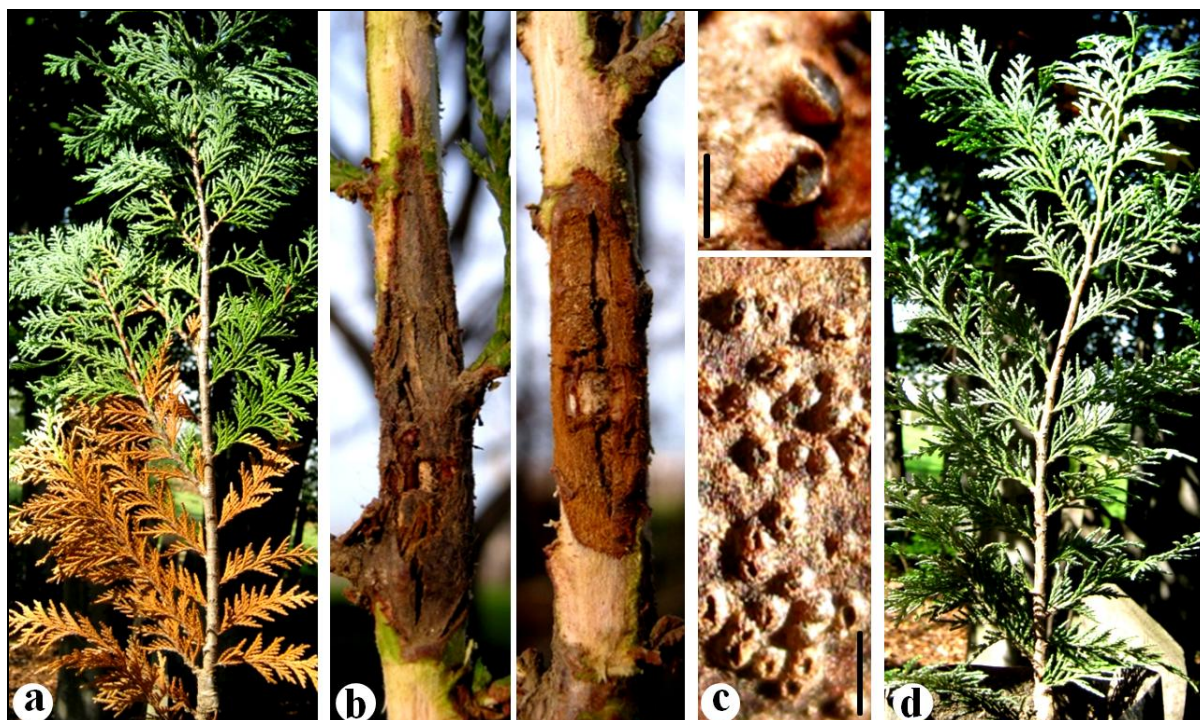
**Tabela 18.** Patogenost *Botryosphaeriaceae* vrsta na različitim domaćinima.

| Domaćin                         | Botryosphaeriaceae vrste                   |  |                         |  |                     |                                |                          |                  |                              |                          |
|---------------------------------|--|--|-------------------------|--|---------------------|--------------------------------|--------------------------|------------------|------------------------------|--------------------------|
|                                 | <i>Botryosphaeria dothidea</i>             | <i>Neofusicoccum parvum</i>                | <i>Diplodia seriata</i> | <i>D. mutila</i>                               | <i>D. sapinea</i> ° | <i>Dothiorella sarmentorum</i> | <i>Dothiorella</i> sp. 2 | <i>Do. sp.</i> 1 | <i>Phaeobotryon cupressi</i> | <i>Sphaeropsis visci</i> |
| <i>Chamaecyparis lawsoniana</i> | - <sup>1</sup> / <sup>+</sup> <sup>2</sup> | -  | -                       | -  | -                   | -                              | -                        | -                | +                            | -                        |
| <i>Cedrus atlantica</i>         | -  | + <sup>3</sup> / <sup>-</sup> <sup>4</sup> | -                       | -  | -                   | -                              | /                        | -                | /                            | /                        |
| <i>C. deodara</i>               | /  | -  | /                       | /  | -                   | /                              | /                        | /                | /                            | /                        |
| <i>Prunus laurocerasus</i>      | /  | +/ <sup>+</sup> <sup>o</sup>               | /                       | - <sup>5,°</sup> / <sup>+</sup> <sup>6,°</sup> | -                   | /                              | /                        | /                | /                            | /                        |
| <i>Sequoiadendron giganteum</i> | +  | +  | /                       | /  | /                   | /                              | +                        | /                | /                            | /                        |
| <i>Thuja occidentalis</i>       | +  | +  | +                       | /  | -                   | +                              | /                        | /                | /                            | /                        |
| <i>Pseudotsuga menziesii</i>    | -  | /  | /                       | /  | +                   | /                              | /                        | /                | /                            | /                        |
| <i>Abies concolor</i>           | +  | /  | +                       | /  | +                   | /                              | /                        | /                | /                            | /                        |
| <i>Juniperus horizontalis</i>   | +  | /  | /                       | /  | +                   | /                              | /                        | /                | /                            | /                        |
| <i>Cupressus arizonica</i>      | +  | /  | /                       | +  | /                   | /                              | /                        | /                | /                            | /                        |
| <i>Liriodendron tulipifera</i>  | +  | /  | /                       | /  | /                   | /                              | /                        | /                | /                            | /                        |
| <i>Magnolia grandifolia</i>     | +  | /  | /                       | /  | /                   | /                              | /                        | /                | /                            | /                        |
| <i>Ligustrum vulgare</i>        | /  | /  | +                       | /  | /                   | /                              | /                        | /                | /                            | /                        |
| <i>C. sempervirens</i>          | +  | /  | +                       | +  | /                   | /                              | -                        | /                | -                            | /                        |
| <i>Picea omorika</i>            | /  | + <sup>3</sup> // <sup>4</sup>             | /                       | /  | /                   | /                              | /                        | /                | /                            | /                        |
| <i>Quercus robur</i>            | /  | /  | +                       | /  | /                   | /                              | /                        | /                | /                            | /                        |
| <i>Pittosporum tobira</i>       | /  | +  | /                       | -  | /                   | /                              | /                        | /                | /                            | /                        |
| <i>Aesculus hippocastanum</i> * | +  | +  | /                       | +  | /                   | +                              | /                        | /                | /                            | /                        |

**Tabela 18.** Nastavak.

| Domaćin                     | Botryosphaeriaceae vrste       |                             |                         |                  |                                |                                |                          |           |                              |                          |
|-----------------------------|--------------------------------|-----------------------------|-------------------------|------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------|-----------|------------------------------|--------------------------|
|                             | <i>Botryosphaeria dothidea</i> | <i>Neofusicoccum parvum</i> | <i>Diplodia seriata</i> | <i>D. mutila</i> | <i>D. sapinea</i> <sup>n</sup> | <i>Dothiorella sarmentorum</i> | <i>Dothiorella</i> sp. 2 | Do. sp. 1 | <i>Phaeobotryon cupressi</i> | <i>Sphaeropsis visci</i> |
| <i>Pinus patula</i> #       | +                              | +                           | /                       | /                | +                              | /                              | /                        | /         | /                            | /                        |
| <i>Eucalyptus grandis</i> # | +                              | +                           | /                       | /                | –                              | /                              | /                        | /         | /                            | /                        |
| <i>P. abies</i>             | +                              | +                           | /                       | /                | +                              | /                              | /                        | /         | /                            | /                        |
| <i>P. pungens</i>           | /                              | /                           | /                       | /                | +                              | /                              | /                        | /         | /                            | /                        |
| <i>P. nigra</i>             | /                              | /                           | /                       | /                | +                              | /                              | /                        | /         | /                            | /                        |
| <i>P. sylvestris</i>        | /                              | /                           | /                       | /                | +                              | /                              | /                        | /         | /                            | /                        |
| <i>F. sylvatica</i> *       | /                              | /                           | /                       | /                | +                              | /                              | /                        | /         | /                            | /                        |
| <i>Viscum album</i> *       | /                              | /                           | /                       | /                | /                              | /                              | /                        | /         | /                            | +                        |

\*Inokulacije izbojaka ° Inokulacije listova. # Ogled u stakleniku. / Vrsta nije izolovana iz domaćina i/ili inokulisana. <sup>n</sup> Poglavlje 4. <sup>1</sup> CMW 39301, <sup>2</sup> CMW 39315, <sup>3</sup> CMW 39327, <sup>4</sup> CMW 39317, <sup>5</sup> CMW 39358, <sup>6</sup> CMW 3934.



**Figura 18.** Simptomi uočeni na *Chamaecyparis lawsoniana* sadnicama inokulisanim sa *Phaeobotryon cupressi*. **a.** Posmeđivanje četina od mesta inokulacije naviše i naniže; **b.** Ulegnute rak rane sa pukotinama oko ivice rak rane i unutar rak rane; **c.** Piknidi gljive *P. cupressi* formirani unutar ubijenog tkiva stabla; **d.** Kontrolne sadnice inokulisane sterilnim MEA koje ne pokazuju simptome bolesti.

*Botryosphaeria dothidea*, *Dothiorella* sp. 2 i *N. parvum* mogle su inficirati *S. giganteum* i ubile su sve biljke 13 nedelja nakon inokulacije. Sadnice su pokazale početni simptom odumiranja izbojaka sa vrha nedelju dana nakon inokulacije. Ostali simptomi su uključivali uvenuće, sušenje izbojaka sa vrha i pojavu lezija koje prstenuju stablo. Kontrolne sadnice su bile bez simptoma bolesti. Izolat *B. dothidea* iz *C. lawsoniana* iz CR i *Dothiorella* sp. 2 imali su najveće AUDPC vrednosti i pokazali su se najagresivnijim. *N. parvum* izolovan iz *E. globulus* bila je najmanje agresivna gljiva (Tabela 18, Fig. 21). *D. sapinea*, *D. seriata* i *B. dothidea* bile su sposobne da inficiraju *A. concolor* i ubile su sadnice nakon 12-20 nedelja. Biljke su pokazivale simptome kakvi su opisani u Poglavlju 4. *B. dothidea* je bila najagresivnija gljiva i izolat *D. seriata* iz *Q. robur* bio je najmanje agresivan (Tabela 18; Fig. 12, 23).

Sadnice *T. occidentalis* pokazale su prve simptome bolesti u vidu žutila, posmeđivanja i crvenila četina i sušenja izbojaka sedam nedelja nakon inokulacije sa četiri *Botryosphaeriaceae* vrste. Ostali simptomi uključuju isušene, crne i nekrotične listove, lezije koje prstenuju stablo i pojavu piknida gljive unutar obolelih tkiva. Kontrolne biljke su ostale asimptomatične (Fig. 19).

*D. seriata*, *N. parvum* izolovan iz *E. globulus* i *B. dothidea* izolovana iz *C. lawsoniana* iz CR bile su najagresivnije vrste (Tabela 18, Fig. 22). *D. mutila*, *D. seriata* i *B. dothidea* mogle su da inficiraju *C. sempervirens*. Sadnice su ispoljile prve simptome bolesti u vidu sušenja izbojaka dve nedelje nakon inokulacije i kasnije sušenje sadnice sa vrha, žutilo četina i njihovo isušivanje. Simptomi bolesti nisu zapaženi na sadnicama inokulisanim sa *P. cupressi*, *Dothiorella* sp. 2 ili na kontrolnim biljkama (Tabela 18, Fig. 24). Gljive *D. sapinea* i *N. parvum* mogle su da inficiraju i ubiju *P. omorika* i *N. parvum* je bio najagresivnija vrsta. Simptomi bolesti bili su slični onima opisanim u Poglavlju 4 i kontrolne sadnice su ostale zdrave (Tabela 18, Fig. 12, 25).



**Figura 19.** Simptomi uočeni na sadnicama *Thuja occidentalis* nakon inokulacije sa *Botryosphaeria dothidea*, *Neofusicoccum parvum*, *Diplodia seriata*, *Dothiorella sarmentorum*, na sadnicama *Cupressus arizonica* nakon inokulacije sa *B. dothidea* i na sadnicama *Picea abies* nakon inokulacije sa *B. dothidea*. **a.** Žutilo, posmeđivanje i crvenilo četina *T. occidentalis*; **b.** Isušene četine *T. occidentalis*; **c.** Kontrolna biljka *T. occidentalis* inokulisana sterilnim MEA koja ne pokazuje znake bolesti; **d.** Nekrotične četine *T. occidentalis*; **e.** Nekrotične i dikolorisane četine *T. occidentalis*; **f.** *C. arizonica* sadnice sa ulegnutom rak ranom i vertikalnim pukotinama unutar rak rane; **g.** *P. abies* sadnica sa smolavom nekrotičnom lezijom.

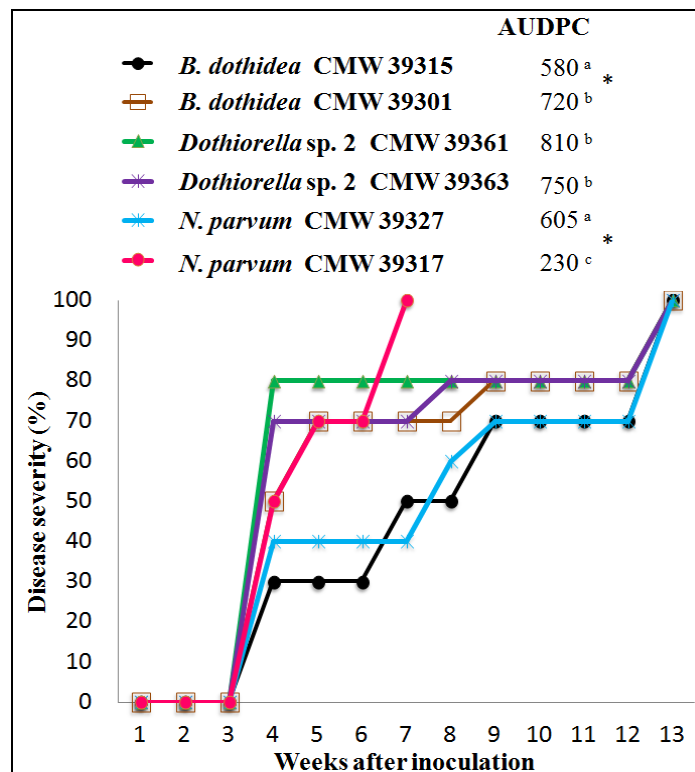




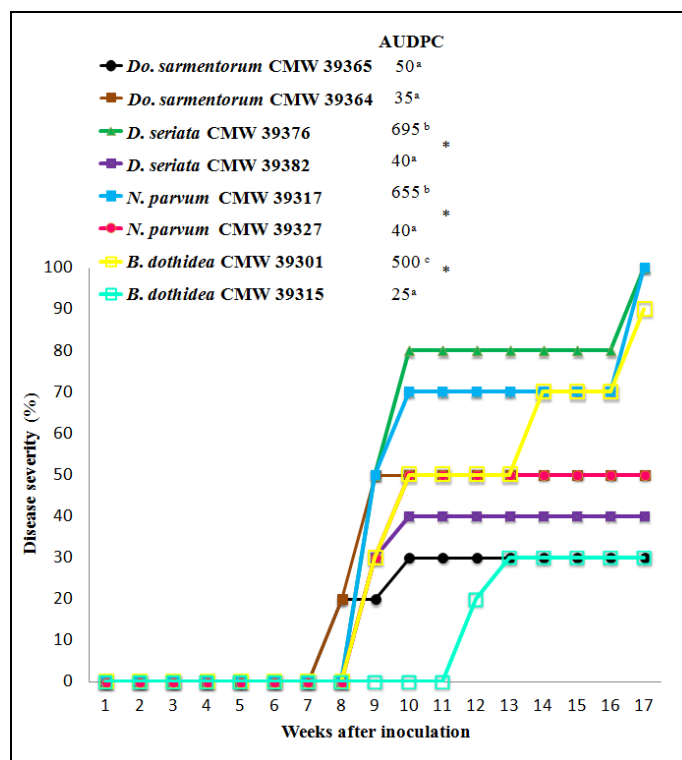
**Figura 20.** Patogenost *Diplodia seriata* prema sadnicama *Quercus robur*. **a-b.** Izdužena lezija koja prstenuje stablo sa piknidima *D. seriata* uronjenim u ubijenu koru; **c.** Piknidi *D. seriata* koji izbijaju na površinu kroz ubijenu koru. Razmera: a-c=1cm.

*Diplodia seriata* i *B. dothidea* mogle su da inficiraju *L. vulgare* i *M. grandifolia* (Tabele 18, 19). *B. dothidea* je mogla da inficira *L. tulipifera* i izolat iz *C. lawsoniana* iz CR bio je agresivniji u poređenju sa izolatom iz istog domaćina iz MR (Tabele 18, 19). Nasuprot, *B. dothidea* nije mogla da inficira *P. menziesii* i *N. parvum* izolat iz *S. giganteum* nije mogao da inficira *C. deodara* (Tabele 18, 19). *N. parvum* izolovan iz *S. giganteum* mogao je da inficira *C. atlantica* i proizveo je rak rane kružnog obika na stablima ovog domaćina. Ostale Botryosphaeriaceae vrste nisu bile patogene i proizvele su samo male smolave lezije (Tabele 18, 19). *B. dothidea* i *D. sapinea* mogle su da inficiraju *J. horizontalis* (Tabele 18, 19). Gljiva *N. parvum* je inficirala *P. tobira* i proizvela je tamno braon izdužene rak rane na ovoj vrsti

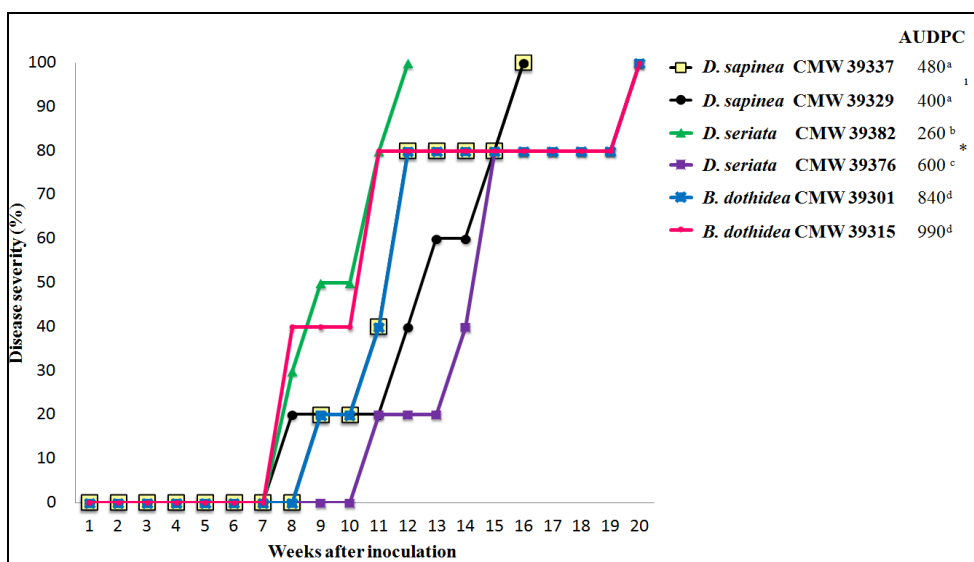
(Tabele 18, 19). Izolati *D. mutila* nisu proizveli lezije, a one se nisu pojavile ni na kontrolnim biljkama. *N. parvum* i *D. mutila* izolovane iz *C. sempervirens* mogle su da inficiraju *P. laurocerasus* i proizvele su crvenkasto-braon izdužene rak rane sa pukotinama unutar rak rane i oko nje. *D. mutila* izolovana iz *T. plicata* proizvela je samo tamno braon lezije vidljive nakon što je spoljašna kora uklonjena i ove lezije nisu bile značajno veće od onih koje su bile proizvedene na kontrolnim biljkama ( $p>0.05$ ) (Tabele 18,19; Fig. 26). *Botryosphaeriaceae* su ponovo izolovane i identifikovane iz svih inokulisanih sadnica, ali ne i iz kontrolnih.



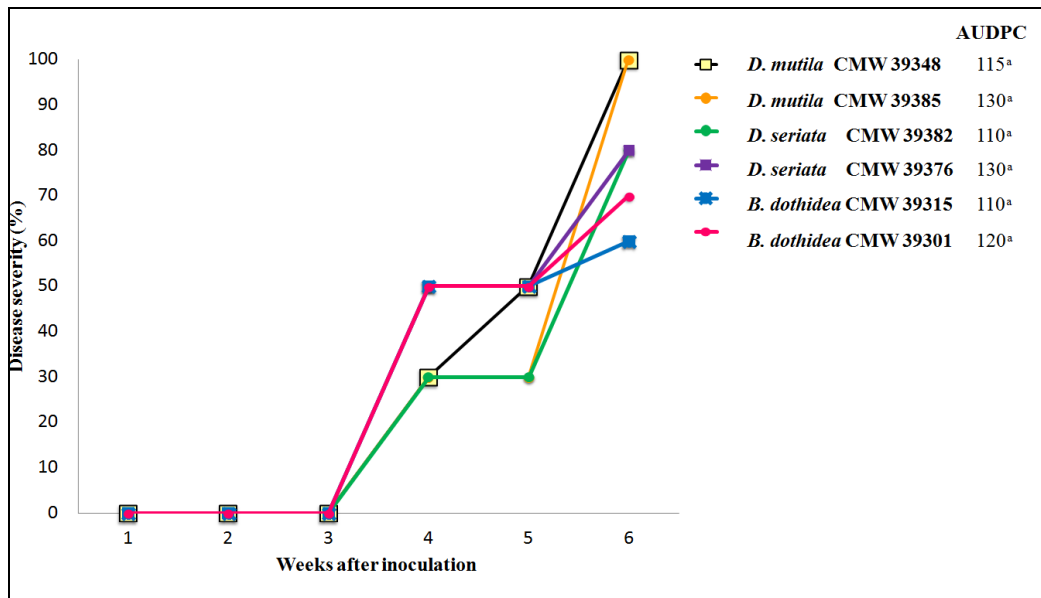
**Figura 21.** Krive razvoja bolesti i Područje Ispod Krive Razvoja Bolesti (AUDPC) sadnica *Sequoiadendron giganteum* inokulisanih različitim *Botryosphaeriaceae* vrstama \* AUDPC vrednosti izolata iste vrste bile su značajno različite ( $p<0.05$ ). Srednje vrednosti sa istim slovom nisu se značajno razlikovale koristeći LSD test pri  $p<0.05$ .



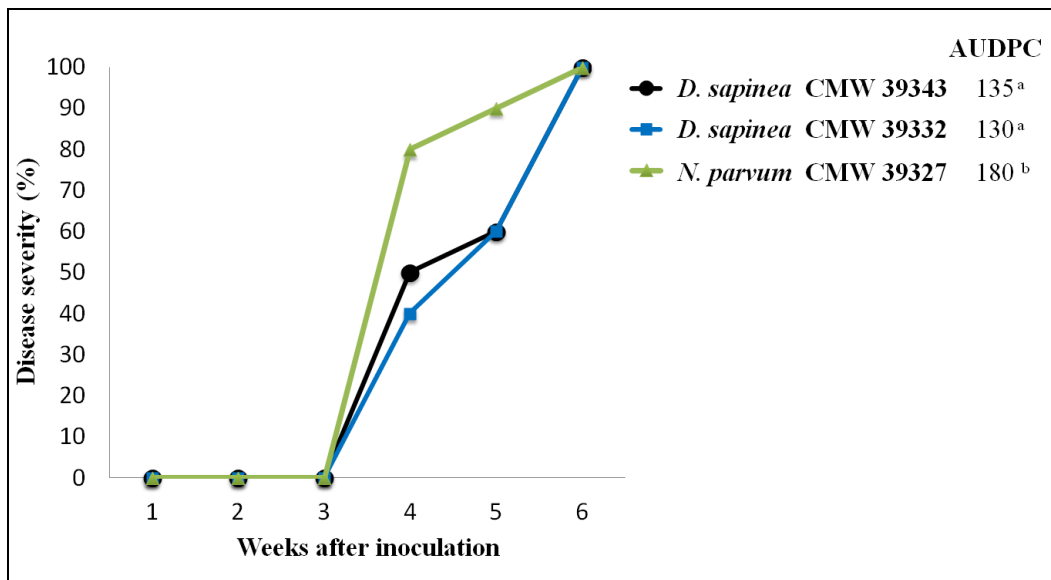
**Figura 22.** Krive razvoja bolesti i Područje Ispod Krive Razvoja Bolesti (AUDPC) sadnica *Thuja occidentalis* inokuliranih različitim *Botryosphaeriaceae* vrstama \* AUDPC vrednosti izolata iste vrste bile su značajno različite ( $p < 0.05$ ). Srednje vrednosti sa istim slovom nisu se značajno razlikovale koristeći LSD test pri  $p < 0.05$ .



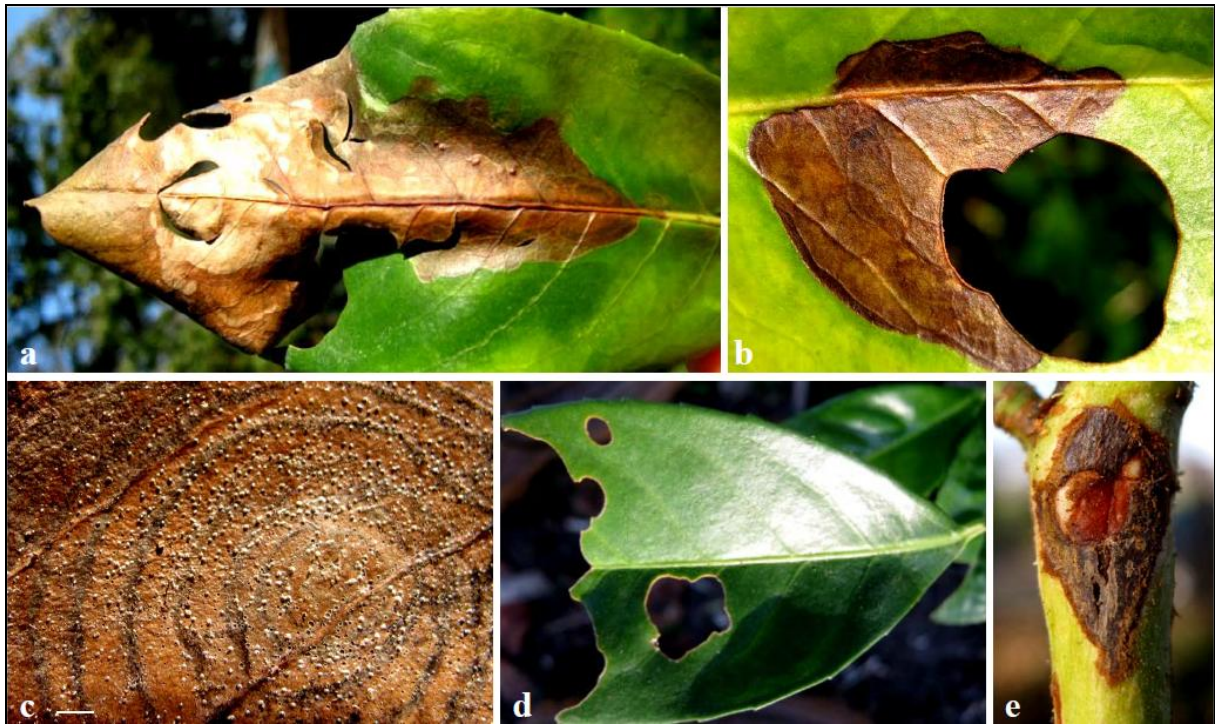
**Figura 22.** Krive razvoja bolesti i Područje Ispod Krive Razvoja Bolesti (AUDPC) sadnica *Abies concolor* inokuliranih različitim *Botryosphaeriaceae* vrstama \* AUDPC vrednosti izolata iste vrste bile su značajno različite ( $p < 0.05$ ). Srednje vrednosti sa istim slovom nisu se značajno razlikovale koristeći LSD test pri  $p < 0.05$ .



**Figura 24.** Krive razvoja bolesti i Područje Ispod Krive Razvoja Bolesti (AUDPC) sadnica *Cupressus sempervirens* inokuliranih različitim *Botryosphaeriaceae* vrstama\* AUDPC vrednosti izolata iste vrste bile su značajno različite ( $p < 0.05$ ). Srednje vrednosti sa istim slovom nisu se značajno razlikovale koristeći LSD test pri  $p < 0.05$ .



**Figura 25.** Krive razvoja bolesti i Područje Ispod Krive Razvoja Bolesti (AUDPC) sadnica *Picea omorika* inokuliranih različitim *Botryosphaeriaceae* vrstama\* AUDPC vrednosti izolata iste vrste bile su značajno različite ( $p < 0.05$ ). Srednje vrednosti sa istim slovom nisu se značajno razlikovale koristeći LSD test pri  $p < 0.05$ .

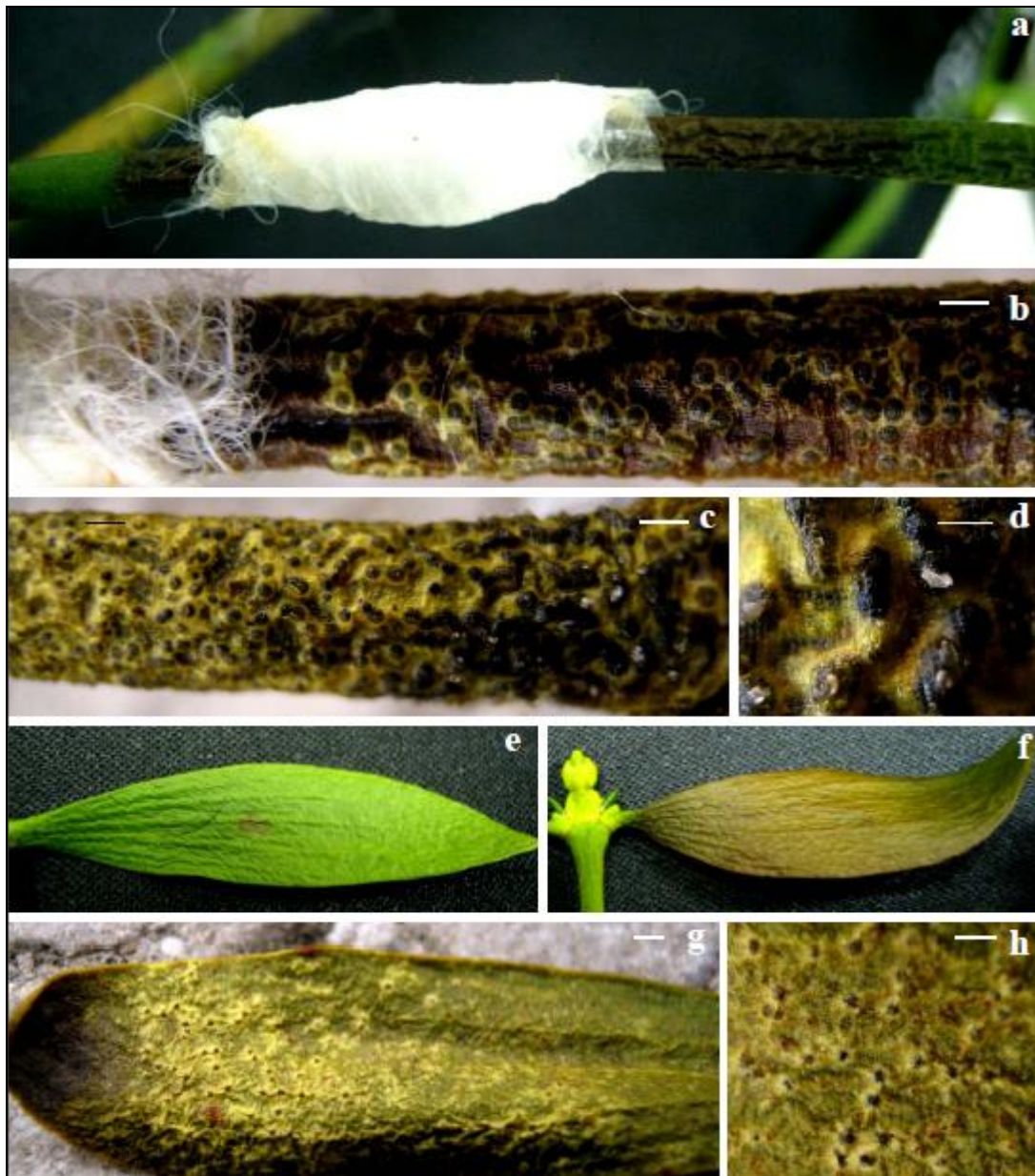


**Figure 26.** Simptomi zapaženi na *Prunus laurocerasus* listovima i stabljikama nakon inokulacije sa mediteranskim izolatom *Neofusicoccum parvum* CMW 39317. **a.** Bolest rupičavosti lišća u uznapredovaloj fazi bolesti- nekrotična lezija koja se širi od peteljke lista naniže; **b.** Lezija sa rupom koja se širi dalje u tkivo lista; **c.** Piknidi *N. parvum* koji se formiraju unutar suvih nekrotičnih lezija pre njenog ispadanja iz lista; **d.** List sa simptomom rupičavosti; **e.** Crvenkasto-braon elipsoidna rak rana sa pukotinama unutar rane i oko oboda rane. Razmera: c=1cm.

#### 6.4.6. Inokulacije izbojaka i listova

*Botryosphaeria dothidea*, *D. mutila* izolovana iz *C. sempervirens*, *Do. sarmentorum* izolovana iz *C. lawsoniana* i *N. parvum* bile su najagresivnije gljive nakon inokulacije izbojaka *A. hippocastanum*. Izolat *Do. sarmentorum* iz *T. occidentalis* bio je najmanje agresivan (Tabele 18, 19). Na izbojcima i listovima žbunova *V. album* pojavile su se nekrotične lezije pet dana nakon inokulacije. Dve nedelje nakon inokulacije, izbojci i listovi su postali hlorotični; izbojci su prstenovani i piknidi *S. visci* su bili uronjeni u ubijena tkiva. Kontrolni izbojci i listovi imali su samo minimalnu diskoloraciju oko rana (Tabela 18, Fig. 27). Listovi *P. laurocerasus* bili su sa nekrotičnim lezijama pet dana nakon inokulacije. *N. parvum* izolovan iz *E. globulus* bio je najagresivnija gljiva i *D. mutila* izolovana iz *T. plicata* nije mogla da inficira listove *P. laurocerasus*. Nakon dve nedelje u lezijama su se formirali piknidi. (Tabele 18, 19; Fig. 26). Lezije se nisu pojavile na listovima kontrolnih biljaka.

Ponovne izolacije iz piknida gljiva i diskolorisanih tkiva bile su uspješne i Kohovi postulati su bili ispunjeni u svim eksperimentima.



**Figura 27.** Patogenost *Sphaeropsis visci* na *Viscum album* izbojcima i listovima. **a.** Nekrotične lezije pet dana nakon inokulacije; **b-d, g-h.** Piknidi i zreli piknidi *S. visci* koji oslobađaju spore dve nedelje nakon inokulacije; **e.** Reakcija kontrolnog lista inokulisanog sterilnom MEA podlogom; **f.** Isušeni list pet dana nakon inokulacije. Razmera: b-d, g-h=1 cm.

**Tabela 19.** Srednje vrednosti lezija (dužine diskolorisanog/smolavog područja na mestu inokulacije) sadnica i izbojaka inokulisanih *Botryosphaeriaceae* vrstama. Srednje vrednosti lezija (cm) date su u zagradama.

| Domaćin                         | <i>Botryosphaeriaceae</i> vrste  |  |  |  |  |                          |                  |                              |                          |                 |
|---------------------------------|--|--|--|--|--|--------------------------|------------------|------------------------------|--------------------------|-----------------|
|                                 | <i>Botryosphaeria dothidea</i>   | <i>Neofusicoccum parvum</i>  | <i>Diplodia seriata</i>  | <i>D. mutila</i>   | <i>Dothiorella sarmentorum</i>                       | <i>Dothiorella</i> sp. 2 | <i>Do. sp. 1</i> | <i>Phaeobotryon cupressi</i> | <i>Sphaeropsis visci</i> | Control         |
| <i>Chamaecyparis lawsoniana</i> | 0.9-1.2 (1.1) <sup>1/</sup> / <b>1.4-2.1 (1.9)</b> <sup>2</sup>        | 0.9-1.3 (1.1)  | 0.9-1.2 (1.1)  | 0.9-1.3 (1.1)  | 0.9-1.5 (1.2)  | 0.9-1.2 (1)              | 0.9-1.4 (1.2)    | <b>2.7-8.3 (4.7)</b>         | 0.9-1.3 (1.1)            | 0.8-1 (0.9)     |
| <i>Cedrus atlantica</i>         | 0.5-0.8 (0.6)  | <b>1.9-2.6 (2.4)</b> <sup>3/</sup> / 0.5-0.6 (0.6) <sup>4</sup>  | 0.5-0.6 (0.6)  | 0.5-0.6 (0.6)  | 0.5-0.8 (0.6)  | /                        | 0.4-0.7 (0.6)    | /                            | /                        | 0.4-0.5 (0.5)   |
| <i>C. deodara</i>               | /  | 0.5-0.6 (0.6) <sup>3/</sup> -  | /  | /  | /  | /                        | /                | /                            | /                        | 0.4-0.5 (0.5)   |
| <i>Prunus laurocerasus</i>      | /  | <b>1.6-2 (1.8)</b> <sup>3,n/</sup> / <b>1.8-2.2 (2)</b> <sup>4,n/</sup> / <b>1-2.5 (2.1)</b> <sup>o,3/</sup> / <b>2.9-3.5 (3.3)</b> <sup>o,4</sup> | /  | 0.9-1.7 (1.4) <sup>5/</sup> / <b>1.5-2.2 (1.9)</b> <sup>6,n/</sup> / - <sup>o,5/</sup> / <b>0.6-0.9 (0.8)</b> <sup>o,6</sup> | /  | /                        | /                | /                            | /                        | 0.6-0.8 (0.7)/- |
| <i>Pseudotsuga menziesii</i>    | 0.5-0.7 (0.6)  | /  | /  | /  | /  | /                        | /                | /                            | /                        | 0.4-0.5 (0.5)   |
| <i>Juniperus horizontalis</i>   | <b>(1.2-2.7) 2</b>   | /  | /  | /  | /  | /                        | /                | /                            | /                        | -               |
| <i>Cupressus arizonica</i>      | <b>(1.3-1.7) 1.6</b> <sup>1/</sup> / <b>(4.2-9.8) 7.6</b> <sup>2</sup> | /  | /  | <b>(1.3-1.7) 1.5</b>   | /  | /                        | /                | /                            | /                        | -               |
| <i>Liriodendron tulipifera</i>  | <b>(6-30) 16.3</b> <sup>1/</sup> / <b>(5.4-8.3) 6.5</b> <sup>2</sup>   | /  | /  | /  | /  | /                        | /                | /                            | /                        | 0.9-1.1 (1)     |
| <i>Magnolia grandifolia</i>     | <b>(1.3-2.5) 1.8</b> <sup>1/</sup> / <b>(1.7-1.9) 1.8</b> <sup>2</sup> | /  | /  | /  | /  | /                        | /                | /                            | /                        | 0.4-0.5 (0.4)   |
| <i>Ligustrum vulgare</i>        | /  | /  | <b>(1.4-2) 1.7</b> <sup>7/</sup> / <b>(1.7-2) 1.9</b> <sup>8</sup> | /  | /  | /                        | /                | /                            | /                        | -               |
| <i>Quercus robur</i>            | /  | /  | <b>(1.9-7.5) 4.7</b> <sup>7</sup>                                  | /  | /  | /                        | /                | /                            | /                        | -               |
| <i>Pittosporum tobira</i>       | /  | <b>(1.2-1.5) 1.4</b> <sup>3/</sup> / <b>(1.7-2.1) 2</b> <sup>4</sup>   | /  | /  | /  | /                        | /                | /                            | /                        | -               |
| <i>Aesculus hippocastanum</i> * | x  | x  | /  | x  | <b>(1.5-3.5) 2.3</b> <sup>9/</sup> / x <sup>10</sup> | /                        | /                | /                            | /                        | -               |

**Tabela 19.** Hastavak.

| Domaćin                     | <i>Botryosphaeriaceae</i> vrste                                       |  |                         |                  |                                |                          |                  |                              |                          | Control          |
|-----------------------------|---|--|-------------------------|------------------|--------------------------------|--------------------------|------------------|------------------------------|--------------------------|------------------|
|                             | <i>Botryosphaeria dothidea</i>  | <i>Neofusicoccum parvum</i>  | <i>Diplodia seriata</i> | <i>D. mutila</i> | <i>Dothiorella sarmentorum</i> | <i>Dothiorella</i> sp. 2 | <i>Do.</i> sp. 1 | <i>Phaeobotryon cupressi</i> | <i>Sphaeropsis visci</i> |                  |
| <i>Pinus patula</i> #       | <b>(10-25) 16.5</b> <sup>1/</sup><br>(13-33) <b>20.3</b> <sup>2</sup> | <b>(18-90) 36.8</b> <sup>3/</sup><br>(32-80) <b>52.4</b> <sup>4</sup>  | /                       | /                | /                              | /                        | /                | /                            | /                        | 6 (6-7)          |
| <i>Eucalyptus grandis</i> # | <b>(11-27) 15.4</b> <sup>1/</sup><br>(10-17) <b>12.3</b> <sup>2</sup> | <b>27.3 (12-48)</b> <sup>3/</sup><br><b>80.5 (37-140)</b> <sup>4</sup> | /                       | /                | /                              | /                        | /                | /                            | /                        | 6 (6-7)          |
| <i>Picea abies</i>          | <b>(4-7.5) 5.8</b> <sup>1/</sup><br><b>(2.5-4.3) 3.4</b> <sup>2</sup> | × <sup>3/</sup> (2.5-6.5) <b>3</b> <sup>4</sup>                        | /                       | /                | /                              | /                        | /                | /                            | /                        | 0.6-0.8<br>(0.8) |

/ Vrsta nije izolovana iz biljke i/ili inokulisana u biljku. Lezije statistički veće od kontrolnih su boldovane (p<0.05). Vrednosti lezija statistički veće od onih koje je proizveo drugi korišćeni izolat iste vrste predstavljene su kosim brojevima (p<0.05). ° Inokulacije listova, × Izbojci/sadnice su prstenovani <sup>1</sup> CMW 39301, <sup>2</sup> CMW 39315, <sup>3</sup> CMW 39327, <sup>4</sup> CMW 39317, <sup>5</sup> CMW 39358, <sup>6</sup> CMW 39348, <sup>7</sup> CMW 39382, <sup>8</sup> CMW 39376, <sup>9</sup> CMW 39365, <sup>10</sup> CMW 39364, <sup>n</sup> Rak rane.



#### 6.4.7. Inokulacije u stakleniku

*Diplodia sapinea* izolovana iz *C. atlantica* iz CR bila je najagresivnija i *B. dothidea* bila je najmanje agresivna nakon inokulacije u *P. patula*. Lezije su bile natopljene smolom, na inokulisanim stablima je povremeno bilo zapaženo curenje smole i gljiva *N. parvum* je obrazovala piknide unutar lezija. Gljiva *N. parvum* izolovana iz *E. globulus* bila je najagresivnija i *B. dothidea* iz CR bila je najmanje agresivna nakon inokulacije u *E. grandis*. *B. dothidea* izolat iz MR proizveo je lezije koje se nisu vidno razlikovale od onih proizvedenih na kontrolnim biljkama. Lezije formirane na kontrolnim sadnicama bile su značajno manje u poređenju sa onim proizvedenim od strane *Botryosphaeriaceae* vrsta (Tabele 18, 19). *Botryosphaeriaceae* su uspešno ponovo izlovene i identifikovane iz svih sadnica sem iz kontrolnih.

#### 6.5. Diskusija

U ovom istraživanju, deset *Botryosphaeriaceae* vrsta (*B. dothidea*, *N. parvum*, *D. sapinea*, *D. mutila*, *D. seriata*, *Do. sarmentorum*, *Dothiorella* sp. 1, *Dothiorella* sp. 2, *P. cupressi* i *S. visci*) identifikovano je iz 42 vrste drveća i pet žbunastih vrsta iz urbanih sredina, šumskih plantaža, šumskih sastojina i rasadnika ukrasnog bilja. *P. cupressi* i *S. visci* su gljive koje su se javile na samo jednom domaćinu, *Dothiorella* sp. 1 je izolovana iz dva domaćina a ostale *Botryosphaeriaceae* su bile izolovane iz više od pet domaćina. *Botryosphaeriaceae* su većinom bile patogene prema domaćinima iz kojih su bile izolovane, ali su bile sposobne i da recipročno inficiraju druge vrste. Rezultati ovog istraživanja, na osnovu velikog broja domaćina i sposobnosti *Botryosphaeriaceae* da inficiraju i biljke domaćine i one koji to nisu, ilustrovali su generalističku prirodu većine vrsta.

Nekoliko *Botryosphaeriaceae* vrsta se pokazalo specifičnim prema određenom domaćinu. Izolacija *S. visci* iz jedino hemi-parasitičnih *V. album* žbunova mogla bi biti interpretirana tako da je gljiva specifična prema ovom domaćinu. Gljiva *S. visci* je i u drugim istraživanjima bila izolovana jedino iz *V. album* (Phillips i sar. 2013; Zlatković i sar. 2016). Takođe, Varga i sar. (2011) su pokazali da *S. visci* izaziva bolest na *V. album* žbunovima. *Phaeobotryon cupressi* je gljiva koja je u ovom istraživanju izolovana jedino iz *C. sempervirens*, ali je u istraživanju Phillips i sar. 2013 bila izolovana i iz *J. scopulorum* (obe vrste su iz familije Cupressaceae). U našim eksperimentima inokulacije, gljiva *P. cupressi* je mogla inficirati *C. lawsoniana*, i proizvela je duge lezije. Nasuprot, gljiva *P. cupressi* nije proizvela lezije na *C. sempervirens*. To je verovatno zbog toga što je gljiva *P. cupressi* bila

izolovana kao endofit iz zdravih tkiva *C. sempervirens* u ovom istraživanju i istraživanju Abdollahzadeh i sar. (2009) i možda nije patogena prema ovom domaćinu. *Dothiorella* sp. 1 je isto tako izolovana iz malog broja domaćina u ovom istraživanju, i to iz *T. plicata* i *C. atlantica*. Izgleda da ova gljiva pokazuje privrženost određenom domaćinu jer nije mogla da proizvede lezije na *C. lawsoniana* uprkos tome što je bila izolovana iz *C. atlantica* kao endofit.

*Botryosphaeria dothidea* i *N. parvum* su gljive poznate po tome što imaju širok spektar domaćina (Phillips i sar. 2013). U ovom istraživanju, *B. dothidea* je izolovana iz najvećeg broja domaćina (22) i mogla je da proizvede lezije na mnogima (11, Tabele 18, 19). Izolacije i eksperimenti inokulacije pokazali su da je ova gljiva značajan patogen ukrasnog drveća i žbunja. Pored toga što proizvodi rak rane na inokulisanim sadnicama, patogen je bio sposoban da ubije *S. giganteum*, *T. occidentalis*, *A. concolor*, *P. abies* biljke i da prstenuje izbojke *A. hippocastanum*. *B. dothidea* je mogla da inficira *P. patula* i *E. grandis* iz kojih nije bila izolovana. U istraživanju Pavlic i sar. (2007), *B. dothidea* je bila patogenija prema *E. grandis* nego prema jednoj od autohtonih biljaka (*Syzygium cordatum*) iz kojih je bila izolovana. Ipak, u ovom istraživanju, izolat *B. dothidea* proizveo je lezije na *E. grandis* značajno manje od onih uzrokovanih sa *N. parvum*. *Neofusicoccum parvum* je važan patogen *Eucalyptus* spp. (Slippers i sar. 2009) i agresivnost ove gljive na ovom domaćinu stoga nije iznenađujuća. *Neofusicoccum parvum* je takođe patogen ukrasnog drveća i žbunja (npr. Begoude i sar. 2010; Varela i sar. 2011) i u ovom istraživanju gljiva je mogla da inficira osam ukrasnih vrsta drveća. Gljiva *N. parvum* je izolovana iz 16 biljaka uključujući deset golosemenica i šest skrivenosemenica. Slično, Sakalidis i sar. (2013) su pokazali nedostatak specifičnosti prema domaćinu za ovu gljivu i smatrali da sposobnost gljive *N. parvum* da postoji asimptomatično kao endofit i da kolonizuje širok spektar domaćina može objasniti pojavu ove gljive u različitim državama i na različitim kontinentima.

Većina (sedam od 10) *Botryosphaeriaceae* vrsta identifikovanih u ovom istraživanju izolovano je iz više vrsta drveća i otkriveni su novi domaćini za većinu vrsta. Ovo nije iznenađujuće za *Botryosphaeriaceae* vrste kakve su predhodno spomenute *B. dothidea* i *N. parvum*, za koje se zna da se javljaju na velikom broju drvenastih vrsta (Sakalidis i sar. 2013; Phillips i sar. 2013). Ipak, spektar domaćina gljive *D. sapinea*, patogena borova bio je neočekivano širok i vrsta je izolovana iz 16 vrsta drveća i žbunja u predhodnom istraživanju (Poglavlje 4).

U ovom istraživanju, pokazalo se da su *Botryosphaeriaceae* vrste sposobne da inficiraju vrste drveća velike ekološke, društvene i ekonomske vrednosti. To samo doprinosi pretnji kojoj su ove vrste drveća već izložene. Na primer, pokazano je da *B. dothidea*, *D. seriata* i *D. mutila* doprinose sušenju *C. sempervirens*, vrednom ukrasnom drvetu koje se smatra ključnim elementom mediteranskog pejzaža (Xenopoulos i sar. 1990). Bolest “rak čempresa” uzrokovana sa *Seiridium* spp. poznata je kao jedna od najvećih pretnji opstanku *C. sempervirens* (Graniti 1998; Danti i sar. 2014) i ovo istraživanje pokazuje da ima i drugih gljiva uključenih u proces sušenja ovog drveta. *D. seriata* je takođe mogla da inficira i na kraju ubije *Q. robur*, koji predstavlja ekonomski vredno stablo ugroženo promenom režima plavljenja i klime u severnoj Srbiji (Stojanović i sar. 2015). Slično, gljive *D. sapinea* i *N. parvum* su mogle da inficiraju i ubiju *P. omorika*, drvo čiji je opstanak ugrožen zbog ograničene distribucije, klimatskih promena i gubitka genetičkog diverziteta (Alberto i sar. 2013). Više *Botryosphaeriaceae* vrsta moglo je da inficira *A. hippocastanum*, endemičnu vrstu ugroženu lisnim minerom *Cameraria ohridella* (Stojanović i Marković 2004; Valade i sar. 2009). Takođe, *N. parvum* je mogao inficirati *P. tobira* i *B. dothidea* je izolovana iz žbunova *Q. ilex*. Ove vrste su predstavnici tipične mediteranske sklerofilne vegetacije i trenutno se smatraju ugroženim promenom klime koja vodi do dezertifikacije (Bussoti i sar. 2014).

Više *Botryosphaeriaceae* vrsta je često izolovano iz istog domaćina, stabla ili čak lezije. Slično, u istraživanju Pavlic i sar. (2008) osam *Botryosphaeriaceae* vrsta je izolovano iz asimptomatičnih tkiva autohtone vrste *S. cordatum* i mnoge vrste su dobijene iz iste biljke. Luchi i sar. (2013) su zabeležili kompleksan proces kolonizacije osam četinarara u Italiji, pri čemu je jedanaest *Botryosphaeriaceae* vrsta nađeno u simptomatičnim i asimptomatičnim tkivima. Slično, Jami i sar. (2014) su potvrdili da *Botryosphaeriaceae* vrste nisu specifične prema određenim tkivima. Rezultati testova patogenosti u ovom istraživanju pokazali su da *Botryosphaeriaceae* vrste izolovane iz istog domaćina mogu igrati različite uloge u procesu sušenja stabala. Na primer, sedam vrsta je izolovano iz *C. atlantica* i *C. lawsoniana*, ali od ovih samo su *N. parvum* i *B. dothidea* mogle da izazovu simptome bolesti na ovim domaćinima.

Rezultati ovog istraživanja potvrđuju činjenicu da je distribucija *Botryosphaeriaceae* vrsta uzrokovana biljkom domaćinom i spoljašnjom sredinom u kojoj se dati domaćin javlja (Burgess i sar. 2005; Slippers i Wingfield 2007; Fabre i sar. 2011; Jami i sar. 2014). Faktor domaćina verovatno je uticao na distribuciju *S. visci* jer se žbunovi *V. album* javljaju samo u

CR. Nasuprot, *Do. sarmentorum* i *Dothiorella* sp. 1 nisu bile prisutne u MR, iako su njihovi domaćini *C. lawsoniana* i *C. atlantica*, prisutni u oba područja. Slično, Burgess i sar. (2006) pokazali su da je *N. australe* dominantan u Zapadnoj Australiji, ali se retko kada može naći u Istočnoj Australiji, iako je domaćin ove gljive *Eucalyptus* prisutan u oba područja. Gljiva *P. cupressi* je nađena samo u MR gde je njen domaćin *C. sempervirens* autohton, iako se ovo stablo povremeno sadi i u CR. Razlike u genetičkim karakteristikama domaćina i činjenica da autohtone vrste sadrže drugačije zajednice endofita u poređenju sa introdukovanim stablima (Slippers i Wingfield 2007) mogle bi objasniti različite zajednice *Botryosphaeriaceae* vrsta na ovom domaćinu. Ipak, ne treba donositi generalne zaključke na osnovu trenutnih podataka o razlici u distribuciji *Botryosphaeriaceae* vrsta jer je broj uzoraka iz MR u ovom istraživanju bio ograničen.

Sušenje stabala uzorkovanih u ovom istraživanju moglo bi biti povezano sa stresom uzrokovanim ekstremnim vremenskim uslovima, "efektom toplog ostrva", ostalim stresovima koji pogađaju stabla u gradovima, ili stresom uzrokovanim sađenjem vrsta na staništa koja nisu optimalna za njihov razvoj (Allen i sar. 2010; Zlatković i sar. 2016). Četinari kakvi su *P. abies* i *P. sylvestris* uzorkovani u ovom istraživanju javljaju se na granici njihove južne distribucije, što je možda pospešilo pojavu simptoma stresa. Takođe, *P. abies* je vrsta sa plitkim korenovim sistemom, te je osetljiva na sušu, koja već dovodi do sušenja ovog stabla u Centralnoj i Severnoj Evropi. Slično, *C. atlantica* je stablo koje trenutno podleže masovnom sušenju u svom autohtonom arealu u Severnoj Africi što je uzrokovano promenom klime (Allen i sar. 2010). Dodatno, izvesni postupci u urbanom šumarstvu mogli su doprineti tome da ova stabla budu pod stresom. Na primer, ukrasna stabla se u Srbiji često razmnožavaju uz pomoć semena koje se često sakuplja sa stabala nepoznate provenijencije u urbanim sredinama ([www.minpolj.gov.rs](http://www.minpolj.gov.rs)) i ovo seme nije bilo adekvatno testirano za sadnju u datoj sredini. Isto tako, *P. laurocerasus* je vrsta senke, ali se u gradovima Srbije ova vrsta često sadi na otvorenim prostorima.

U urbanim sredinama, egzote se često sade u neposrednoj blizini autohtonih vrsta koje su mogle biti izvor inokuluma za recipročne infekcije. Rezultati testova inokulacije su potvrdili da izolati *Botryosphaeriaceae* vrsta iz introdukovanih stabala mogu inficirati autohtona stabla i *vice versa*. Na primer, izolati *B. dothidea* iz *C. lawsoniana* mogli su inficirati sadnice autohtone *P. abies*. Slično, pretpostavlja se da je neposredna blizina autohtonih vrsta i egzota bila razlog pojave *N. eucalyptorum*, patogena *Eucalyptus* spp. na

autohtonim domaćinima iz porodice Myrtaceae u Urugvaju (Perez i sar. 2010) i za infekciju plantaža *Eucalyptus* vrsta podignutih u neposrednoj blizini autohtone vegetacije u Južnoj Africi (Burgess i Wingfield 2001; Pavlic i sar. 2007).

*Botryosphaeriaceae* vrste su bile najraznovrsnije na golosemenicama u ovom istraživanju. Sa izuzetkom *A. hippocastanum* i *S. caprea*, iz kojih su izlovene četiri i tri *Botryosphaeriaceae*, sve druge skrivenosemenice su bile domaćini jednoj ili dvema vrstama. Ovo je iznenađujuće i u suprotnosti sa rezultatima većine predhodnih istraživanja. Na primer, prema De Wet i sar. (2008), Sakalidis i sar. (2013) i Slippers i sar. (2013) *Botryosphaeriaceae* su najčešće i najraznovrsnije na skrivenosemenicama. Nasuprot, Alves i sar. (2013) zabeležili su veliki diverzitet ovih vrsta na četinarima u Portugalu, ali četinari su bili jedina stabla uzorkovana u istraživanju i nije napravljena komparacija sa diverzitetom na skrivenosemenicama. Teško je objasniti privrženost određenim domaćinima, jer uzorkovanje, diverzitet domaćina, klima i drugi faktori nisu konstantni u ovim studijama. Ipak, rezultati su pokazali da se i golosemenice i skrivenosemenice odlikuju značajnim diverzitetom *Botryosphaeriaceae* vrsta u različitim sredinama i okolnostima.

## 6.6. Zaključci

Ovo istraživanje je pokazalo da različita stabla i žbunovi na području Zapadnog Balkana imaju veliki diverzitet *Botryosphaeriaceae* vrsta, i sa izuzetkom gljive *S. visci* koja je izolovana samo iz *V. album*, najveći broj ovih gljiva odlikuje širok spektar domaćina. Ipak, izgleda da se neke *Botryosphaeriaceae* vrste javljaju predominantno na određenim domaćinima i to sugeriše da te vrste drveća poseduju neke karakteristike povoljne za razvoj ovih gljiva. Rezultati isto tako sugerišu to da i drugi faktori koji deluju u malim ekološkim nišama (npr., edafski faktori) utiču na strukturu zajednica *Botryosphaeriaceae*. Činjenica da su neke *Botryosphaeriaceae* vrste bile sposobne da recipročno inficiraju taksonomski daleke domaćine i da na kraju ubiju biljke naglašava važnost ove grupe gljiva. Očito je da postoji potreba za daljim istraživanjem s obzirom na puteve unošenja i širenja ovih vrsta, kao i metode kontrole bolesti čiji su ove gljive uzročnici.

## 7. Genetička uniformnost karakteriše invazivno širenje gljiva *Neofusicoccum parvum* i *Diplodia sapinea* na području Zapadnog Balkana

### 7.1. Uvod

Biološke invazije “stranim” patogenima predstavljaju najvažniji uzrok epidemije bolesti drveća širom sveta i smatraju se važnom komponentom globalne promene sredine (Desprez-Loustau i sar. 2007; Brasier 2008; Santini i sar. 2013; Wingfield i sar. 2015). Santini i sar. (2013) definisali su alohtone ili invazivne šumaske patogene kao patogene koji su “introdukovani u zemlju u kojoj predhodno nisu bili poznati, i ugrožavaju biološki diverzitet autohtonih šumskih stabala, žbunja i egzota”. Klasični primeri uključuju epidemiju bolesti kestena na *Castanea* spp. u SAD i Evropi uzrokovanu sa *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Bar; epidemiju holandske bolesti bresta na američkim i evropskim *Ulmus* spp. uzrokovanu sa *Ophiostoma ulmi* (Buisman) Nannf. i *O. novo-ulmi* (Brasier); rak platana u Evropi na *Platanus* spp. uzrokovan sa *Ceratocystis platani* (Walter) Engelbrecht & Harrington, širenje smolastog raka bora uzrokovanog sa *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell iz centra pojave u Meksiku, *Phytophthora* spp. epidemije u SAD i Evropi i nedavna pojava sušenja jasena izazvana patogenom *Hymenoscyphus pseudoalbidus* (T. Kowalski) Baral, Queloz & Hosoya u Evropi (Anagnostakis 1987; Brasier 2008; Wingfield i sar. 2008; Grunwald i sar. 2012; Pautasso i sar. 2013; Gross i sar. 2014).

Sve intenzivnija međunarodna trgovina i putovanja smatraju se glavnim izvorom invazivnih alohtonih patogena (Desprez-Loustau 2008; Vannini i sar. 2012). Trgovina proizvodima od drveta, oblim drvetom, strugotinom (naročito ako se koristi za malčiranje), ogrevno drvo, sadnice (pogotovo ukrasne sadnice uključujući bonsai), cvetovi i listovi smatraju se najčešćim sredstvom introdukcije alohtonih gljivičnih patogena (Liebhold i sar. 2012; Vannini i sar. 2012; Migliorini i sar. 2015). Među njima, oblovina i velika stabla (“instant stabla”) koja se uvoze sa korom i korenovim sistemom sa zemljom smatraju se najvećim rizikom unošenja invazivnih patogena (Brasier 2008; Santini i sar. 2013). Na primer, smatra se da su *C. platani*, *O. ulmi*, *O. novo-ulmi* i *Heterobasidion annosum* s.l. P grupa dospeli u Evropu trgovinom drveta (Gonthier i sar. 2004; Brasier 2008). Takođe, smatra se da se *Cronartium ribicola* J. C. Fisch., *H. pseudoalbidus*, *F. circinatum* i nekoliko *Phytophthora* vrsta šire iz zemlje u zemlju trgovinom sadnicama (Ivors i sar. 2006; Liebhold i sar. 2012).

Patogeni koji putuju sa svojim domaćinima kao “autostoperi” u saprofitskoj, endofitskoj formi ili kao spore koje preživljavaju nepovoljne uslove spoljašnje sredine u zemljištu posebno je teško detektovati i sprečiti njihovu introdukciju (Santini i sar. 2013; Migliorini i sar. 2015). Tipični primer su *Botryosphaeriaceae* vrste, koje su poznate kao endofiti koji ostaju latentni u asimptomatičnom biljnom tkivu u odsustvu uslova sredine nepovoljnih po biljku domaćina. Kada do takvih uslova dođe (npr. visoke temperature, suša), endofiti nevažni u njihovom prirodnom arealu mogu postati izuzetno bitni patogeni nakon introdukcije (Burgess i sar. 2004; Slippers i Wingfield 2007; Wingfield i sar. 2015).

Rizik od infekcije novih domaćina introdukovanog patogena smatra se najvećim u urbanim sredinama u kojima privatni vrtovi i parkovi predstavljaju zajednice autohtonih biljaka i egzota. Ipak, stabla u urbanim sredinama koja rastu u “toplim ostrvima”, doživljavaju stres od npr. zagađenja, kompakcije zemljišta i takvi uslovi mogu predispozirati stabla napadu patogena, povećavajući verovatnoću da se strani patogeni uspešno nasele na datoj teritoriji (Walther i sar. 2009; Santini i sar. 2013). Nakon što se nasele, invazivni patogeni mogu izazvati velike ekološke, sociološke i ekonomske promene i destabilizirati celi ekosistem utičući na npr. hidrologiju, rekreaciju, cikluse ugljenika i azota (Brasier 2008; Stenlid i sar. 2011; Mitchell i sar. 2014). Na invazivne patogene utiču i drugi pokretači globalne promene npr. klimatske promene, koje mogu povećati njihov invazioni potencijal (Walther i sar. 2009).

Uprkos brojnim fitosanitarnim merama i propisima (npr. biljni pasoš, ISPM-15, 36, “EU crna lista”, EPPO A1 i A2 liste, biljke stražari-sentinel plantings), problem invazivnih patogena naročito je prisutan u Evropi. Tako su Santini i sar. (2013) pronašli 60 stranih invazivnih šumskih patogena u Evropi u poređenju sa samo 17 koji su pronađeni u SAD od strane Aukema i sar. (2010). Duga istorija kolonijalizma i intenzivna sadnja alohtonih stabala smatra se razlogom naseljavanja velikog broja stranih patogena na ovom kontinentu (Brasier 2008; Santini i sar. 2013).

*Neofusicoccum parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips i *Diplodia sapinea* (Fr.) Fuckel su biljni patogeni koji se često javljaju u uslovima umerene, mediteranske i tropske klime širom sveta (Slippers i Wingfield 2007; Phillips i sar. 2013). *Neofusicoccum parvum* je gljiva izolovana iz velikog broja biljnih vrsta, uključujući vinovu lozu, voćkarice i šumsko drveće, dok je *D. sapinea* poznata kao patogen četinara, većinom borova, ali isto tako inficira i smrču i jelu (Swart i Wingfield 1991; Phillips i sar. 2013;

Poglavlje 4). Ove gljive su latentni patogeni, koji izazivaju bolest kada su stabla pod stresom (npr. klimatski ekstremi) (Slippers i Wingfield 2007; Mehl i sar. 2014). Smatra se da je gljiva *D. sapinea* autohtona u Severnoj Americi i Evroaziji i introdukovana je u zemlje južne hemisfere gde su borovi egzotične vrste (Smith i sar. 2000; Burgess i sar. 2001a, 2004; Bihon i sar. 2012). *Neofusicoccum parvum* je gljiva koja je najverovatnije autohtona u Južnoj Africi, gde su populacije sa velikim genetičkim diverzitetom (Sakalidis i sar. 2013).

## 7.2. Ciljevi istraživanja

Nedavno se pokazalo da su gljive *N. parvum* i *D. sapinea* odgovorne za pojavu epidemije bolesti na različitim stablima na teritoriji Zapadnog Balkana (Poglavlja 3, 4, 5, 6), ali ništa se ne zna o populacionoj biologiji ovih vrsta na teritoriji Zapadnog Balkana. U ovom istraživanju cilj nam je bio da utvrdimo genetički diverzitet i diferencijaciju različitih populacija gljiva *N. parvum* i *D. sapinea*. To je postignuto uz pomoć DNA sekvenci internog transkribovanog spejsera (ITS) rDNA, translacionog elongacionog faktora 1-alpha (TEF 1- $\alpha$ ),  $\beta$ -tubulin-2 (BT2) i mikrosatelitskih markera. Izolati *D. sapinea* poreklom iz različitih domaćina proučavani su na nivou populacija iz *Cedrus* spp. i *Pinus* spp. Proučavani su i izolati iz kontinentalnog (CR) i mediteranskog (MR) regiona, kao i izolati iz urbanih sredina, plantaža, rasadnika i šumskih sastojina.

## 7.3. Materijal i metode

### 7.3.1. Izolati gljiva

Izolati korišćeni u ovom istraživanju sakupljeni su tokom potrage za stablima koja pokazuju simptome bolesti kakvi su sušenje stabala sa vrha i curenje smole kao što je predhodno opisano (Poglavlje 3) u Srbiji i Crnoj Gori u periodu od 2009 do 2014. godine. Simptomatični uzorci su većinom sakupljeni u gradovima, ali isto tako i u plantažama, šumskim sastojinama, rasadnicima ukrasnog bilja i dva izolata *D. sapinea* dobijena su iz *Pinus radiata* stabala koja rastu na planini Athos u Grčkoj (Tabela S5; Poglavlje 3, 4, 5, 6).

Sa svakog stabla izolacije su urađene iz simptomatičnih i asimptomatičnih tkiva kako je bilo opisano u Poglavlju 3. Četrdeset i šest izolata *N. parvum* i 85 izolata *D. sapinea* identifikovano je u predhodnim istraživanjima na osnovu DNA sekvenci ITS regiona, TEF-1- $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin, large ubunit (LSU) i RNA polymerase II gena (RPB2) (Poglavlja 3, 4, 5, 6). Haploidne kulture dobijene su uz pomoć transfera vrhova hifa i čuvaju se u kolekciji kultura



(CMW) Instituta za Šumarstvo, Poljoprivredu i Biotehnologiju (FABI), Univerziteta u Pretoriji, Južna Afrika.

### **7.3.2. DNA ekstrakcija, amplifikacija mikrosatelitskim-PCR i genotipovanje**

Kulture gljiva uzgajane su na MEA podlozi u Petri šojlama tokom sedam dana i DNA je ekstrahovana iz micelije kako je predhodno opisano (Poglavlje 3). Pre mikrosatelitskih analiza identitet vrsta svih izolata potvrđen je sekvenciranjem ITS regiona kako je predhodno opisano u Poglavlju 3. Šest od sedam fluorescentnih parova prajmera predhodno dizajniranih za vrste *Neofusicoccum* spp. (Slippers i sar. 2004) uspešno je amplifikovalo izolate *N. parvum*. Locus BotF21 nije mogao biti amplifikovan i stoga je isključen iz daljih analiza. Locus BotF15 nije bio analiziran zbog brojnih vrhova niže visine-lažnih alela što bi onemogućilo pouzdanu interpretaciju genotipova. Trinaest mikrosatelitskih lokusa gljive *D. sapinea* amplifikovano je koristeći parove prajmera specijalno dizajniranih za ovu gljivu od strane Burgess i sar. (2001b) i Bihon i sar. (2011). Ipak, lokusi SS5, SS9 i SS12 su izbačeni iz daljih analiza zbog pojave velikog broja lažnih alela (Tabela 20).

PCR reakciona smeša od 25 µl sadržala je 2.5 µl od 10 mM PCR bufera (PCR bufer sa MgCl<sub>2</sub>), 1 µl od 100 mM svake dNTPs, 0.25 µl od 10 mM svakog prajmera, 2 µl razređene genomičke DNA, 0.2 µl (1U) Fast Start Taq polimeraze (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis) i 18.8 µl sterilne destilovane Sabax vode. U određenim slučajevima, PCR reakciona smeša sadržala je dodatnih 1-3 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>. PCR reakcije su urađene koristeći sledeći protokol: 95°C 3-6 min inicijalne denaturacije što je praćeno sa deset ciklusa 95°C u trajanju od 30 s, 52-65°C u trajanju od 45 s, 72°C u trajanju od 1 min; zatim 20-30 ciklusa 95°C u trajanju od 30 s, 52-65°C u trajanju od 45 s, 72°C u trajanju od 1 min +0.05s/povećanje ciklusa na 60°C u trajanju od 30 min konačne ekstenzije (da bi se smanjila pojava lažnih alela). U slučajevima gde predhodno spomenuti PCR protokol nije uspeo da amplificira neke izolate, PCR reakcije su urađene uz pomoć touchdown thermal cycling programa (Don i sar. 1991) uz promenu annealing temperature u rasponu od šest do deset °C, od 68 do 62 °C ili 65 do 55 °C. Amplifikacije su rađene koristeći kontrolu sa sterilnom vodom umesto DNA. Detalji parametara ciklusa i PCR uslovi za svaki set prajmera dati su u Tabeli 20.

**Tabela 20.** Prajmeri i PCR uslovi korišćeni u ovom istraživanju.

| Lokus                       | Par prajmera   | Sekvenca prajmera (5'-3')  | Br. ciklusa | Dodatni Mg (mM) | Početna denturacija                     | Annealing temperatura | TD*             |
|-----------------------------|----------------|--|-------------|-----------------|---|-----------------------|-----------------|
| <i>Neofusicoccum parvum</i> |                |  |             |                 |   |                       |                 |
| BotF11                      | BOT<br>11, 12  | F: CGGCATGGTCTGCCGCTCC<br>R: GCATCTCCGGCTACCAACCG                | 30-35       | –               | 95°C for 3 min                          | 60/62/64°C            | TD1/TD2         |
| BotF17                      | BOT<br>17, 18  | F: GGCGCAATCTCGATTTCGAGC<br>R: CCACGATGTCCGTTTCATCG              | 35-40       | –/ 2.5          | 95°C for 3 min                          | 54/60°C               | TD1             |
| BotF18                      | BOT<br>19, 20  | F: GGCGGTCGCAGATGCGGTC<br>R: GCCCTATTCTGCGTGCCTCC                | 30-40       | –               | 95°C for 3 min                          | 64°C                  | TD1/TD2/<br>TD3 |
| BotF23                      | BOT<br>23, 24  | F: CATCGCACAGGAGCCGATTCT<br>R: CATACATCGAGCTTTCTTGAGGG           | 40          | –               | 95°C for 3 min                          | 54°C for 45 s         | –               |
| BotF35                      | BOT<br>35, 36  | F: CTCCATCCTGATCCAGGGTCC<br>R: GACGAATCAAGCGGGCTGCC              | 40          | –               | 95°C for 3 min                          | 60/62°C               | –               |
| <i>Diplodia sapinea</i>     |                |  |             |                 |   |                       |                 |
| SS1                         | TB<br>1, 2-2   | F: CAT GCA TCG ATC CTG TAG AGC<br>R: CCA AGT GAT GAC CCT ATA GAG | 38-40       | 1/2             | 95°C for 3 min/<br>95°C for 5 min (TD1) | 58°C                  | TD1             |
| SS2                         | TB<br>5, 6     | F: TGT GGT GAG AGA CTA CTG GAC<br>R: CGC TCA TTT GCT GGA ACT TGG | 30          | –/ 1            | 95°C for 3 min                          | 52°C                  | –               |
| SS7                         | TB<br>23, 24   | F: GAC AGA CAT CTA GGC CCT GC<br>R: GAT CAG TCG GTC GAG ACG AG   | 30-35       | –/ 1            | 95°C for 3 min                          | 60°C                  | –               |
| SS8                         | TB<br>35-2, 36 | F: CCA CGA ATA ACG CCC CCA CC<br>R: GCA TGG CAT CAG TGT CTG GC   | 30          | –               | 95°C for 3 min                          | 62°C                  | –               |
| SS10                        | TB<br>41, 42   | F: GCC AAC CCT AAT GCT TCC ATG<br>R: CAG CGG CGA TTG CGG TAT GG  | 40          | –/ 1            | 95°C for 3 min                          | –                     | TD1             |

**Tabela 20.** Nastavak.

| Lokus                   | Par prajmera | Sekvenca prajmera (5'-3')  | Br. ciklusa | Dodatni Mg (mM) | Početna denaturacija | Annealing temperatura | TD* |
|-------------------------|--------------|--|-------------|-----------------|----------------------|-----------------------|-----|
| <i>Diplodia sapinea</i> |              |  |             |                 |                      |                       |     |
| SS11                    | TB<br>43, 44 | F: GTA ACA TTT CCC CAC GTC AGC<br>R: GGA AGT ACT ACA TGG TCT TCG | 35          | 1               | 95°C for 3 min       | 50°C                  | –   |
| SS13                    | WB<br>2a, b  | F: GGC GTG TGT GAT GAG ATG AG<br>R: GTC CTT TGT GTG TTG GGT TG   | 35-40       | 1/2             | 95°C for 3 min       | 55°C                  | –   |
| SS14                    | WB<br>4a, b  | F: CAC CAC CAC CAA CAC CTT G<br>R: CGT GTT GGA AGC GAC GAC       | 30-40       | –/ 1/1.5        | 95°C for 3 min       | 52°C/55°C             | –   |
| SS15                    | WB<br>7a, b  | F: GAA TCA CTG GCC GGT TTG<br>R: GAG TCC AGC CTT TCC TCC TC      | 30-40       | –/ 1-3          | 95°C for 3-6 min     | 55°C                  | –   |
| SS16                    | WB<br>8a, b  | F: GGG GAA AAG ACG TGT TGT TGT<br>R: CAG CAT CGT CGT CCC ATT AG  | 40          | –/ 3            | 95°C for 3/5 min     | –                     | TD1 |

TD-TouchDown thermal cycling program (Don i sar. 1991): TD1- prvih 10 ciklusa: annealing temperatura od 65°C sa smanjenjem od 1°C po ciklusu praćeno sa 25 do 30 ciklusa od 55°C; TD2: prvih 20 ciklusa: annealing temperatura od 65°C sa smanjenjem od 1°C svakog drugog ciklusa praćeno sa 15-20 ciklusa od 55°C; TD3: prvih 12 ciklusa: annealing temperatura od 68°C sa smanjenjem od 1°C svakog drugog ciklusa praćeno sa 28 ciklusa od 62°C.

PCR produkti su razdvojeni elektroforezom na 2 % agaroznom gelu, obojeni sa GelRed (Biotium, Hayward, California, USA) i vizualizovani pod ultravioletnim svetlom. Veličine PCR produkata procenjene su poređenjem sa DNA markerom molekularne težine 100 bp (Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder, Fermentas). Fluorescentno obojeni PCR produkti su multipleksirani za svaku vrstu posebno i 1 µl ovih multipleksiranih PCR produkata razdvojen je uz pomoć ABI Prism 3500 genetičkog analizera. Veličine alela fluorescentno obojenih mikrosatelitskih-PCR produkata poređene su sa LIZ-500 internim standardom veličine i analizirane uz pomoć GeneScan 2.1 i GeneMapper 3.7 programa (Applied Biosystems).

### 7.3.3. Molekularno kloniranje

Tokom mikrosatelitskih analiza gljive *N. parvum* primećeno je da su dva alela slične visine bila stalno prisutna u lokusu BotF18 i dati lokus je zatim kloniran kako bi se dobile sekvence jednog alela. PCR produkti su najpre očišćeni koristeći Sephadex G-50 kolone (Sigma, Steinheim, Germany), prateći uputstva proizvođača. Očišćeni PCR produkti su zatim klonirani u vektor pGEM-T-Easy i transformisani u *Escherichia coli* JM109 kompetentne ćelije uz pomoć pGEM-T-Easy Vector System II (Promega, Madison, USA) kita za kloniranje, prateći uputstva proizvođača. Nekoliko pozitivnih klonova je verifikovano uz pomoć PCR kolonija i sekvencirano koristeći T6 i SP7 par prajmera (Invitrogen, Life technologies, Johannesburg, SA). Amplifikaciona reakciona smeša ukupno je sadržala 25 µl, od čega 5 µl 5 × MyTaq™ bufera (5 mM dNTPs, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 0.5 µl MyTaq™ DNA polimeraze (Bioline Ltd.UK), 1 µl DNA, 0.5 µl svakog prajmera i 17.5 µl destilovane H<sub>2</sub>O (Sabax). PCR ciklusni program sastojao se od 94°C za 5 min praćeno sa 35 ciklusa od 94°C za 30 s, 55°C za 30 s, 72°C za 1 min i finalnom ekstenzijom od 72°C za 5 min. PCR smeša za sekvenciranje i uslovi sekvenciranja bili su kao oni opisani u Poglavlju 3. Produkti su očišćeni uz pomoć Sephadex-a i separisani uz pomoć ABI PRISM 3500 genetičkog analizera (Applied Biosystems). Sekvenciranje je urađeno u oba smera, sa istim prajmerima korišćenim za PCR reakcije kolonija.

Sekvence pojedinačnih alela pokazale su da je veći alel sadržao dodatni 12 bp DNA fragment koji je odgovarao 3' kraju prednje sekvence prajmera i stoga je smatrano da predstavlja alelu slični artifakt dobijen tokom lančane reakcije polimerazom. Veći vrh je stoga prepoznat kao pravi alel i uključen u naredne analize (Tabela 21).

#### 7.3.4. Mikrosatelitske analize

Multilokusni genotipovi (MLG) za svaki lokus dobijeni su kodiranjem alela na različitim lokusima koristeći slova alfabeta za svaki pojedinačni alel (npr. AAAAAABBAA). Pre analiza, izolati svake vrste podeljeni su u dve kolekcije pri čemu je svaka kolekcija predstavljala klimatski region iz kog izolati potiču (kontinentalni i mediteranski). Dodatno, izolati gljive *D. sapinea* podeljeni su u dve populacije koje su bile poreklom iz domaćina *Cedrus* spp. ili *Pinus* spp. Frekvence alela utvrđene su za cele populacije, kao i za predhodno definisane geografske i sub-populacije poreklom iz različitih domaćina (Tabela 21). Za svaku populaciju, određeni su broj alela, broj jedinstvenih alela, broj multilokusnih genotipova (MLG) i procenat polimorfnih lokusa (P). Podaci su klon-korigovani odstranjivanjem duplikata MLG, ali su mikrosatelitske analize urađene samo na originalnom setu podataka jer je broj individua nakon korekcije klonova bio manji od deset.

Genetički diverzitet svake populacije procenjen je izračunavanjem Nei diverziteta gena (korigovanog na veličinu uzorka) (Hnb, Nei 1978). Diverzitet populacije je određen koristeći Shannon indeks diverziteta (H) koji je izračunat uz pomoć formule:

$$H = -\sum P_i \ln P_i$$

i normalizovan da bi korigovao razlike u broju izolata sa  $H' = H / \ln N$ , gde je  $P_i$  frekvencija multilokusnog genotipa u datoj populaciji i  $N$  je broj izolata u svakoj populaciji. Komplement Simpsonovog indeksa diverziteta (D) korigovan na konačnu veličinu uzorka izračunat je uz pomoć formule:

$$D = 1 - [\sum n_i (n_i - 1) / N (N - 1)]$$

gde je  $n_i$  broj izolata sa genotipom  $i$ ,  $N$  je ukupan broj izolata (Pielou 1969). Vrednosti za  $D$  i  $H'$  kreću se od 0 (prisutan jedan genotip) do 1 (svaki izolat poreklom iz određene populacije imao je različit genotip). Genotipski diverzitet (G) procenjen je uz pomoć jednačine:

$$G = 1 / \sum P_i^2$$

gde je  $p_i$  frekvencija  $i^{\text{th}}$  genotipa u populaciji (Stoddart i Taylor 1988). Maksimalni genotipski diverzitet ( $\hat{G}$ ) u populaciji izražen kao procenat (%) izračunat je uz pomoć formule:

$$\hat{G} = G / n * 100$$

pri čemu je  $n$  veličina uzorka ili manja veličina uzorka. Ovaj “rarefaction” pristup podstiče direktnu komparaciju populacija sa malim genotipskim diverzitetom uprkos njihovim različitim, malim ili srednjim veličinama uzorka (Grünwald i sar. 2003). Genotipska podjednakost ( $E_5$ , Grünwald i sar. 2003) izračunata je pomoću formule:

$$E_5 = (G - 1) / (e^{H'} - 1)$$

Vrednosti  $E$  cmogu se kretati u rasponu od 0 do 1, sa manjim vrednostima koje ukazuju na to da je određeni genotip dominantan u kolekciji izolata sa određene populacije domaćina. Korekcije klonova, procene genetičkog diverziteta, genotipski diverzitet i indeksi diverziteta populacija izračunati su u programu R v. 3.2.3 (R Core Team 2015) koristeći program za populaciono genetičke analize “poppr” v. 2.1.0 (Kamvar i sar. 2014). Bogatstvo alela ( $A_r$ ) utvrđeno je uz pomoć programa R koristeći paket “hierfstat” v. 004-22 (Goudet i Jombart 2015). Paket uključuje rarefaction pristup koji omogućava komparaciju vrednosti za standardizovani uzorak koji se odnosi na najmanji uzorak u populacijama. Druge analize nisu urađene zbog klonalne strukture i male veličine uzoraka svake populacije.

### 7.3.5. Statističke analize

Statističke analize urađene su uz pomoć programa Statistica 8.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) i IBM SPSS Statistics 20.0 (New York, USA). Normalnost seta podataka koji predstavlja broj *D. sapinea* MLG ispitana je uz pomoć Kolmogorov-Smirnov testa, a homogenost varijansi uz pomoć Levenovog testa. Analize su zatim rađene uz pomoć jednosmerne analize varijansi (ANOVA) praćene post-hock testom najmanjih značajnih razlika (LSD) i vrednosti od  $p < 0.05$  su smatrane značajnim. Vrednosti maksimalnog genetičkog diverziteta za dva para *D. sapinea* populacija poređene su uz pomoć Studentovog t-testa pri faktoru značajnosti od 0.05.

### 7.3.6. Haploidne mreže

Setovi podataka koji sadrže sekvence ITS, TEF-1- $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin i RPB2 za 56 izolata *N. parvum* i ITS i TEF-1- $\alpha$  za 87 izolata *D. sapinea* poravnani su zasebno kako je opisano u Poglavlju 3. Zbog toga što nije bilo nekogruentnosti između proučavanih gena nakon testa homogenosti particija (Farris i sar. 1995) koristeći PAUP v. 4 (Swofford 2003), u naredne analize uključeni su kombinovani setovi podataka za svaku vrstu. Haplotipovi su određeni

koristeći poravnati set podataka u programu DnaSP 5.10.1 (Librado i Rozas 2009). Jedinstveni haplotipovi su zatim spojeni sa jedinstvenim haplotipovima *N. parvum* i *D. sapinea* dobijenih iz Banke Gena vodeći računa o tome da bude pokriven veliki deo poznatog geografskog areala svake vrste (Tabele S5, S7). Evolucione veze između haplotipova svakog genskog regiona pojedinačno, kao i za kombinovani set podataka dobijene su pomoću median-joining mreže napravljene u programu NETWORK 4.6.1.2 (<http://www.fluxus-engineering.com>).

## 7.4. Rezultati

### 7.4.1. Genetički i genotipski diverzitet *N. parvum*

Svih pet mikrosatelitskih lokusa bilo je monomorfno u *N. parvum* CR populaciji i tri lokusa su bila polimorfna u MR populaciji (Tabele 21, 22). Kada je u pitanju celi set podataka od 46 *N. parvum* izolata, uočeno je 11 alela u okviru pet ispitanih lokusa. Pet alela je detektovano u CR populaciji i 11 alela je pronađeno u MR populaciji. Pet alela je deljeno između dve populacije i bilo je šest privatnih alela u MR populaciji. Mali genetički diverzitet konstatovan je kod svih izolata *N. parvum* ( $H_{nb}=0.083$ ). CR populacija je bila potpuno klonalna ( $H_{nb}=0$ ).

U okviru pregledanih 46 izolata *N. parvum*, pronađeno je ukupno šest MLG (Fig. 28, Tabela 22). Od ovih, jedan MLG je detektovan u CR populaciji i pet MLG je detektovano u MR populaciji. MLG nisu deljeni između dve populacije. Genotipski diverzitet ( $G$ ) i odgovarajući maksimalni genotipski diverzitet ( $\hat{G}$ ) bili su veći za celu kolekciju izolata *N. parvum* nego za CR populaciju.

MLG S1 delio je najveći broj domaćina (deset), MLG S4 delila su dva domaćina, dok su svi preostali MLG bili nađeni na samo jednom domaćinu. Dva MLG su nađena na *Cedrus atlantica*, *Prunus laurocerasus* i *Eucalyptus globulus*, dok je jedan MLG nađen na preostalim deset domaćina. Sa izuzetkom *Pittosporum tobira*, svi domaćini su imali jedan MLG deljen sa najmanje jednim domaćinom. Deset domaćina je delilo MLG sa dva domaćina i dva domaćina su delila MLG sa jednim domaćinom (Fig. 29, Tabela S6). Šest MLG je nađeno na domaćinima u urbanim sredinama i jedan je isto tako nađen na sadnicama u rasadnicama ukrasnog bilja (Tabela S6, Fig. 30).

**Tabela 21.** Veličina alela (bp) i njihova frekvencija za pet lokusa *Neofusicoccum parvum* i deset lokusa *Diplodia sapinea*.

| Lokus                         | Alel (bp) | Pop 1 (Kontinental) | Pop 2 <sup>1</sup> (Mediterranska) | Pop 3 ( <i>Cedrus</i> spp.) | Pop 4 ( <i>Pinus</i> spp.) | Total |
|-------------------------------|-----------|---------------------|------------------------------------|-----------------------------|----------------------------|-------|
| <i>Neofusicoccum parvum</i> * |           |                     |                                    |                             |                            |       |
| BotF11                        | 429       | 1.000               | +                                  |                             |                            | 1.000 |
|                               | 232       | 1.000               | +                                  |                             |                            | 0.935 |
| BotF17                        | 248       | –                   | +                                  |                             |                            | 0.043 |
|                               | 260       | –                   | +                                  |                             |                            | 0.022 |
|                               | 244       | –                   | +                                  |                             |                            | 0.022 |
| BotF18                        | 245       | 1.000               | +                                  |                             |                            | 0.913 |
|                               | 247       | –                   | +                                  |                             |                            | 0.022 |
|                               | 250       | –                   | +                                  |                             |                            | 0.043 |
| BotF23                        | 423       | 1.000               | +                                  |                             |                            | 0.065 |
|                               | 424       | –                   | +                                  |                             |                            | 0.065 |
| BotF35                        | 223       | 1.000               | +                                  |                             |                            | 1.000 |
| <i>Diplodia sapinea</i> *     |           |                     |                                    |                             |                            |       |
| SS1                           | 411       | 1.000               | 1.000                              | 1.000                       | 1.000                      | 1.000 |
| SS2                           | 195       | 1.000               | 1.000                              | 1.000                       | 1.000                      | 1.000 |
| SS7                           | 384       | 1.000               | 1.000                              | 1.000                       | 1.000                      | 1.000 |
| SS8                           | 280       | 1.000               | 1.000                              | 1.000                       | 1.000                      | 1.000 |
| SS10                          | 313       | 1.000               | 1.000                              | 1.000                       | 1.000                      | 1.000 |
| SS11                          | 173       | 1.000               | 1.000                              | 1.000                       | 1.000                      | 1.000 |
|                               | 149       | 0.078               | –                                  | 0.091                       | 0.040                      | 0.059 |
| SS13                          | 151       | 0.094               | –                                  | 0.023                       | 0.160                      | 0.071 |
|                               | 157       | 0.828               | 1.000                              | 0.886                       | 0.800                      | 0.129 |
|                               | 149       | 0.125               | –                                  | 0.091                       | 0.040                      | 0.094 |
| SS14                          | 161       | 0.797               | 0.762                              | 0.795                       | 0.160                      | 0.788 |
|                               | 164       | 0.047               | 0.238                              | 0.120                       | 0.091                      | 0.094 |
|                               | 171       | 0.031               | –                                  | 0.023                       | –                          | 0.024 |
| SS15                          | 68        | 0.938               | 0.714                              | 0.795                       | 0.040                      | 0.882 |
|                               | 71        | 1.000               | 1.000                              | 0.205                       | 0.040                      | 1.000 |
| SS16                          | 108       | 1.000               | 1.000                              | 1.000                       | 1.000                      | 1.000 |

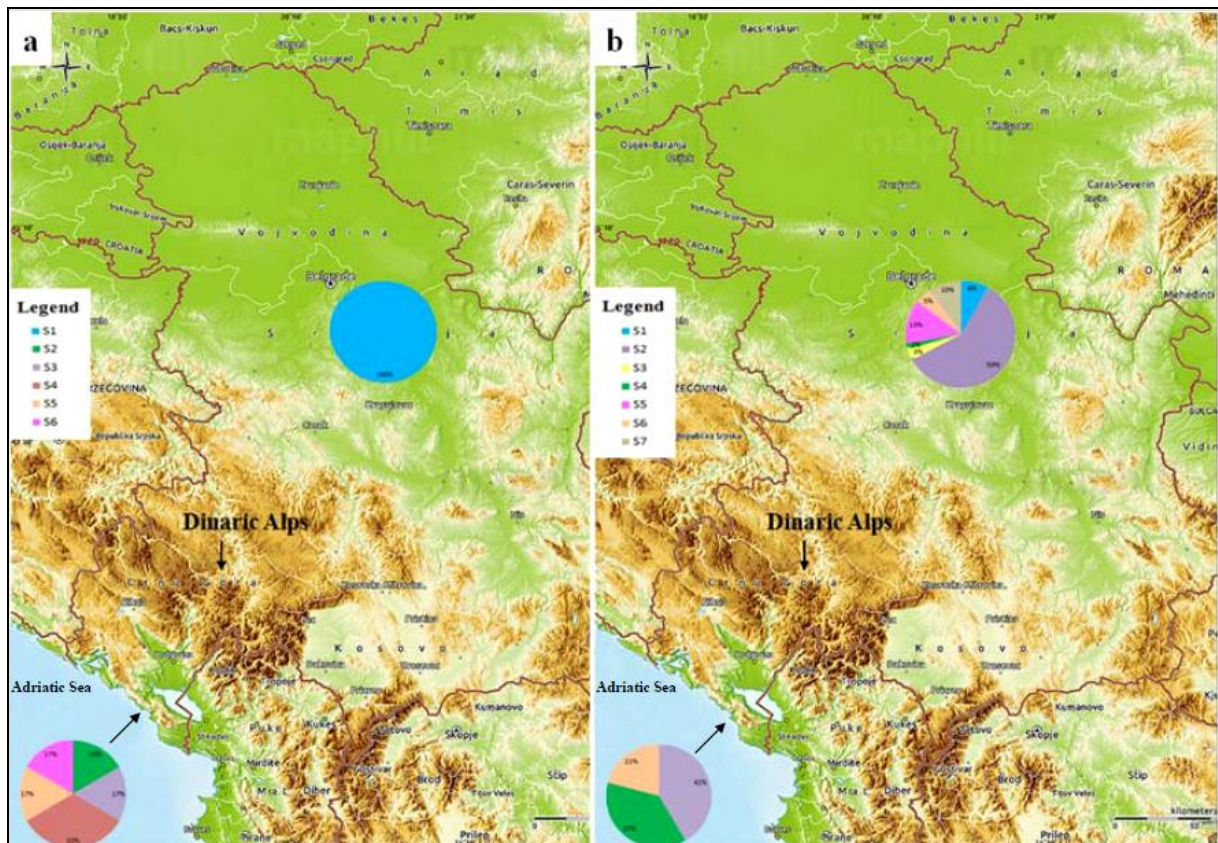
\*Populacije 1 and 2=Geografski definisane populacije *N. parvum* i *D. sapinea* iz kontinentalnog i mediteranskog regiona i svi izolati *N. parvum* i *D. sapinea*; Populacije 3 i 4= izolati *D. sapinea* poreklom sa *Cedrus* spp. i *Pinus* spp. <sup>1</sup> Frekvence alela za populaciju 2 *N. parvum* nisu izračunate zbog male veličine uzoraka. + Alel je bio prisutan u populaciji.



**Tabela 22.** Mere genetičkog diverziteta zasnovane na analizama pet mikrosatelitskih lokusa za *Neofusicoccum parvum* i deset lokusa za *Diplodia sapinea*.

|  | Br. izolata | Br. alela | Br. privatnih alela | Br. MLG | P (%) | Ar  | H'    | D'    | E <sub>5</sub> | Hnb   | G    | Ĝ     | Stat. signif. |
|--|-------------|-----------|---------------------|---------|-------|---|-------|-------|----------------|-------|------|-------|---------------|
| <b><i>Neofusicoccum parvum</i></b>       |             |           |                     |         |       |   |       |       |                |       |      |       |               |
| Pop 1 <sup>1</sup> (Kontinentalna)       | 40/1 *      | 5         | 0                   | 1       | 0     | 2/2 <sup>7</sup>                          | 0     | 0     | N/A            | 0     | 1    | 2.5   |               |
| Pop 2 <sup>2</sup> (Meditranska)         | 6/5 *       | 11        | 6                   | 5       | 60    |   |       |       |                |       |      |       |               |
| Svi izolati                              | 46/6 *      | 11        | N/A                 | 6       | 60    | 2.78/2.7 <sup>7</sup>                     | 0.154 | 0.245 | 0.392          | 0.083 | 1.32 | 2.87  |               |
| <b><i>Diplodia sapinea</i></b>           |             |           |                     |         |       |   |       |       |                |       |      |       |               |
| Pop 1 <sup>1</sup> (Kontinentalna)       | 64/7 *      | 16        | 4 <sup>5</sup>      | 7       | 30    | 2.55/2.33 <sup>8</sup>                    | 0.344 | 0.656 | 0.574          | 0.078 | 2.82 | 13.43 | p>0.05        |
| Pop 2 <sup>2</sup> (Meditranska)         | 21/3 *      | 12        | 0                   | 3       | 20    | 2.2/2.2 <sup>8</sup>                      | 0.345 | 0.667 | 0.932          | 0.081 | 2.74 | 13.05 |               |
| Pop 3 <sup>3</sup> ( <i>Cedrus</i> spp.) | 44/7 *      | 16        | 1 <sup>6</sup>      | 7       | 30    | 2.48/2.38 <sup>9</sup>                    | 0.397 | 0.721 | 0.682          | 0.09  | 3.38 | 13.52 | p>0.05        |
| Pop 4 <sup>4</sup> ( <i>Pinus</i> spp.)  | 25/6 *      | 15        | 0                   | 6       | 30    | 2.28/2.28 <sup>9</sup>                    | 0.385 | 0.620 | 0.598          | 0.072 | 2.47 | 9.88  |               |
| Svi izolati                              | 85/7 *      | 16        | N/A                 | 7       | 30    | 2.57/2.33 <sup>8</sup> /2.37 <sup>9</sup> | 0.331 | 0.675 | 0.596          | 0.081 | 3    | 3.53  |               |

<sup>1</sup> Izolati dobijeni iz kontinentalnog regiona, <sup>2</sup> Izolati dobijeni iz mediteranskog regiona, <sup>3</sup> Izolati dobijeni iz *Cedrus* spp., <sup>4</sup> Izolati dobijeni iz *Pinus* spp., <sup>5</sup> U poređenju sa kolekcijom izolata iz mediteranskog regiona <sup>6, 7</sup> Standardizovano za 40 izolata, <sup>8</sup> Standardizovano za 20 izolata, <sup>9</sup> Standardizovano za 20 izolata. U poređenju sa kolekcijom izolata iz *Pinus* spp., P: Broj polimorfnih lokusa, Ar: Bogatstvo alela, H': Normalizovani Shannon indeks diverziteta, D': Korigovani Simpson indeks diverziteta, E<sub>5</sub>: Podjednakoš-Evenness, Hnb: Nei nepristrasni diverzitet gena, G: Genotipski diverzitet. Ĝ: % teoretskog maksimalnog genotipskog diverziteta, \* Klon korigovani set podataka. Većina populaciono genetičkih parametara nije izračunata za mediteransku populaciju *N. parvum* zbog male veličine uzorka.

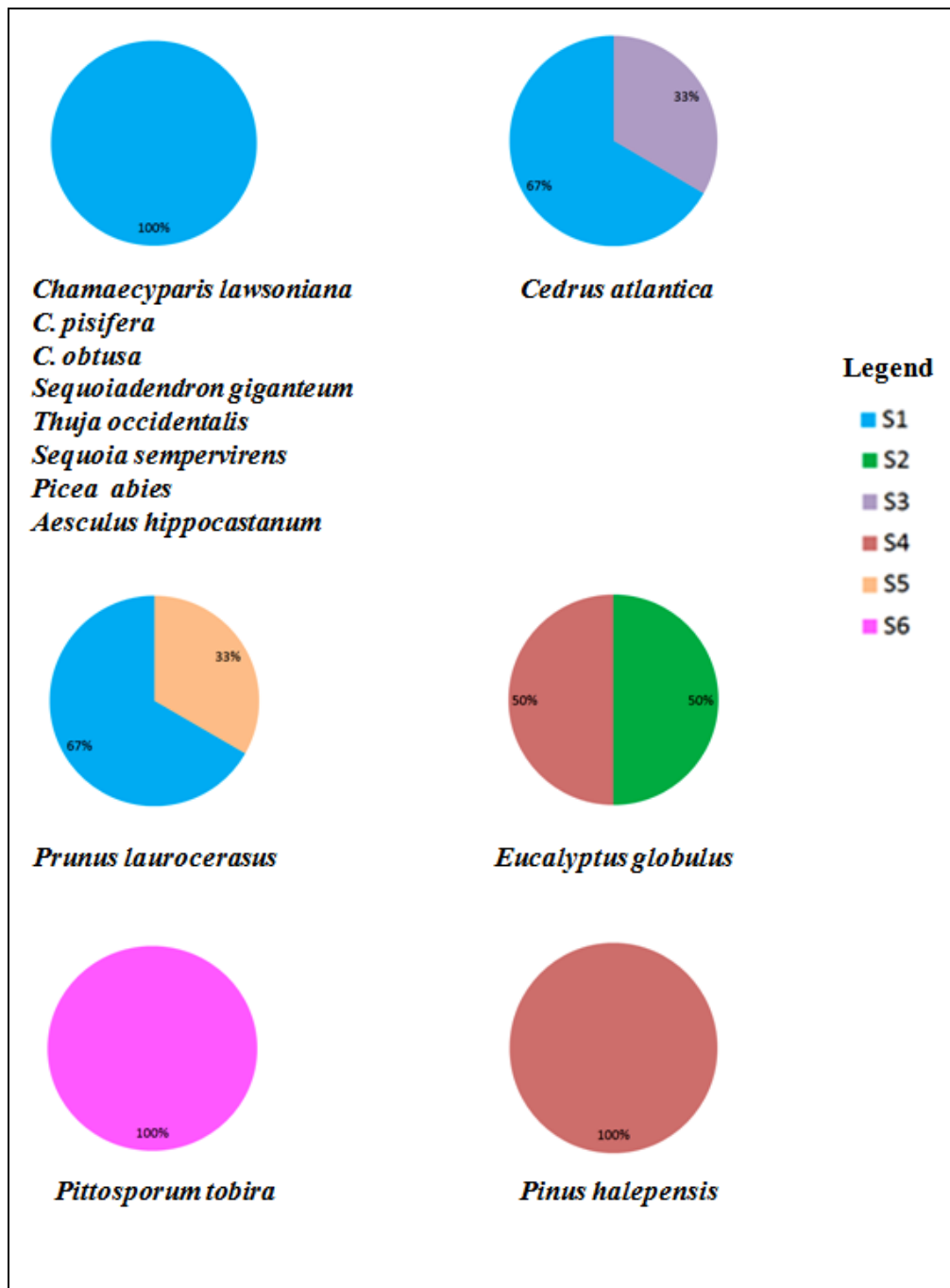


**Fig. 28.** Pite koje predstavljaju genotipski diverzitet *N. parvum* i *D. sapinea* populacija iz kontinentalnog i mediteranskog regiona duž obale Jadranskog mora. **a.** *N. parvum*; **b.** *D. sapinea*. Različiti multilokusni genotipovi prikazani su kao S1-S6 za *N. parvum* i S1-S7 za *D. sapinea*. Topografska mapa preuzeta je sa web sajta Maphill ([www.maphill.com](http://www.maphill.com)).

#### 7.4.2. Genetički i genotipski diverzitet *D. sapinea*

Dva lokusa su bila polimorfna u MR populaciji *D. sapinea* i tri lokusa su bila polimorfna u preostalim analiziranim populacijama (Tabela 22). U okviru *D. sapinea* seta podataka od 85 izolata i deset pregledanih lokusa, nađeno je ukupno 16 alela (Tabela 21). Šesnaest alela je detektovano i u CR populaciji, kao i u populaciji sa *Cedrus* spp. Petnaest alela je identifikovano u populaciji sa *Pinus* spp. i 12 alela je detektovano u MR populaciji. Dvanaest alela je deljeno između dve geografski definisane populacije i 15 alela je deljeno između populacija sa *Cedrus* spp. i *Pinus* spp. Samo je jedan privatni alel bio prisutan u CR populaciji sa *Cedrus* spp. Diverzitet alela ( $A_r$ ) bio je niži u slučaju MR populacije (2.2) u poređenju sa CR populacijom (2.33) i u slučaju populacije sa *Pinus* spp. (2.28) u poređenju sa kolekcijom izolata iz *Cedrus* spp. (2.38) (Tabela 22). Niski genetički diverzitet uočen je među svim izolatima *D. sapinea* ( $H_{nb}=0.081$ ). Genetički diverzitet je bio niži kada je u

pitanju CR populacija (0.078) u poređenju sa MR populacijom (0.081) i u slučaju populacije sa *Pinus* spp. (0.072) u poređenju sa kolekcijom izolata sa *Cedrus* spp. (0.09).

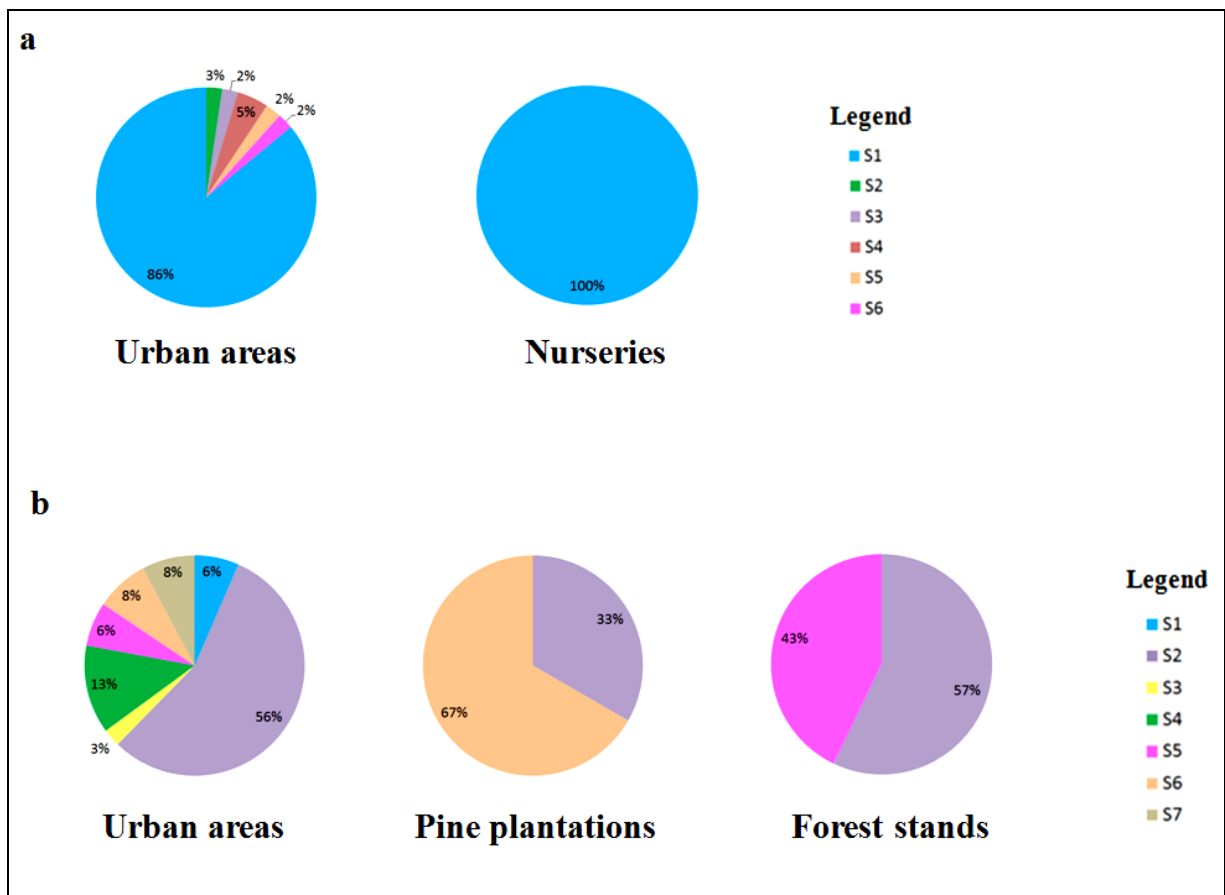


**Figura 28.** Multilokusni genotipovi različitih izolata *Neofusicoccum parvum*

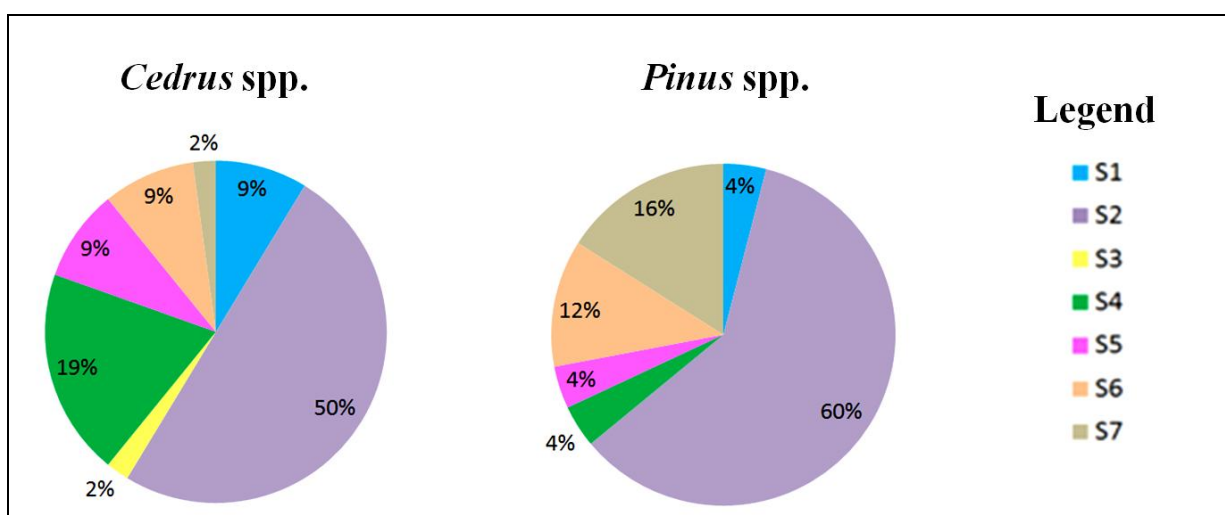
Sedam MLG je dobijeno iz 85 izolata *D. sapinea* iz CR i iz *Cedrus* spp. (Fig. 28, 31; Tabela 22). Šest MLG je detektovano među izolatima iz *Pinus* spp. i tri MLG je detekovano među

izolatima poreklom iz MR. Populacije iz CR i MR delile su tri MLG i populacije sa *Cedrus* spp. i *Pinus* spp. delile su šest MLG.  $E_5$  vrednosti su pokazale da učestalost MLG u kolekcijama izolata nije bila ravnomerno raspoređena. Na primer, u populaciji iz CR MLG S2 činio je 60 % populacije ( $E_5=0.574$ ). Jedini izuzetak je bila populacija iz MR koju je karakterisala visoka  $E_5$  vrednost ( $E_5=0.932$ ), a time i ravnomernija distribucija MLG unutar populacije. Maksimalni genotipski diverzitet ( $\hat{G}$ ) (korigovan za veličinu uzorka) iznosio je od 3.53 među svim *D. sapinea* izolatima do 13.52 za populaciju sa *Cedrus* spp.

Kada su u pitanju izolati sa različitih domaćina, MLG S2 je deljen između najvećeg broja domaćina (11), MLG S7 je deljen između četiri domaćina, MLG S4, S5 i S6 su deljeni između tri domaćina, MLG S1 i S3 su deljeni između dva domaćina. Stabla *C. atlantica* imala su najveći broj MLG (7), *P. pungens*, *P. nigra* i *P. sylvestris* su svaki imali tri MLG, *P. omorika* i *P. halepensis* imali su dva MLG i pet drugih domaćina imalo je jedan MLG. Svaki domaćin imao je najmanje jedan MLG deljen sa još najmanje jednim domaćinom. Stabla *C. atlantica* delila su svih sedam MLG sa drugim domaćinima, tri domaćina su delila tri MLG sa drugim domaćinima, dva domaćina su delila dva MLG sa drugim domaćinima i ostatak domaćina imao je jedan MLG deljen sa ostalim domaćinima. Stabla *C. atlantica* delila su MLG sa svim ostalim domaćinima (15), deset domaćina je delilo MLG sa pet ili šest drugih domaćina i pet domaćina je delilo MLG sa dva ili jednim drugim domaćinom. (Fig. 32, Tabela S7). Sedam MLG nađeno je na domaćinima u urbanim sredinama. Među njima, jedan MLG je isto tako detektovan u plantažama bora i šumskim sastojinama i dva druga MLG deljena su sa ili plantažama bora ili šumskim sastojinama (Tabela S7, Fig. 30). Do tri *D. sapinea* genotipa nađeno je u ustom domaćinu i u istoj leziji ili delu stabla. Svi sem jednog stabla i dela drveta imali su genotip S2 zajedno sa drugim genotipovima (Tabela 23).



**Figura 30.** Multilokus genotipovi *Neofusicoccum parvum* i *Diplodia sapinea* nađeni na stablima u urbanim sredinama, plantažama, šumskim sastojinama i sadnicama u rasadnicima ukrasnog bilja. **a.** *N. parvum* izolovan iz domaćina u urbanim sredinama i rasadnicima; **b.** *D. sapinea* izolovana iz domaćina u urbanim sredinama, plantažama bora i šumskim sastojinama.



**Figura 31.** Pite koje predstavljaju genotipski diverzitet *D. sapinea* populacija iz *Cedrus* spp. i *Pinus* spp. Različiti multilokusni genotipovi označeni su sa S1-S7.

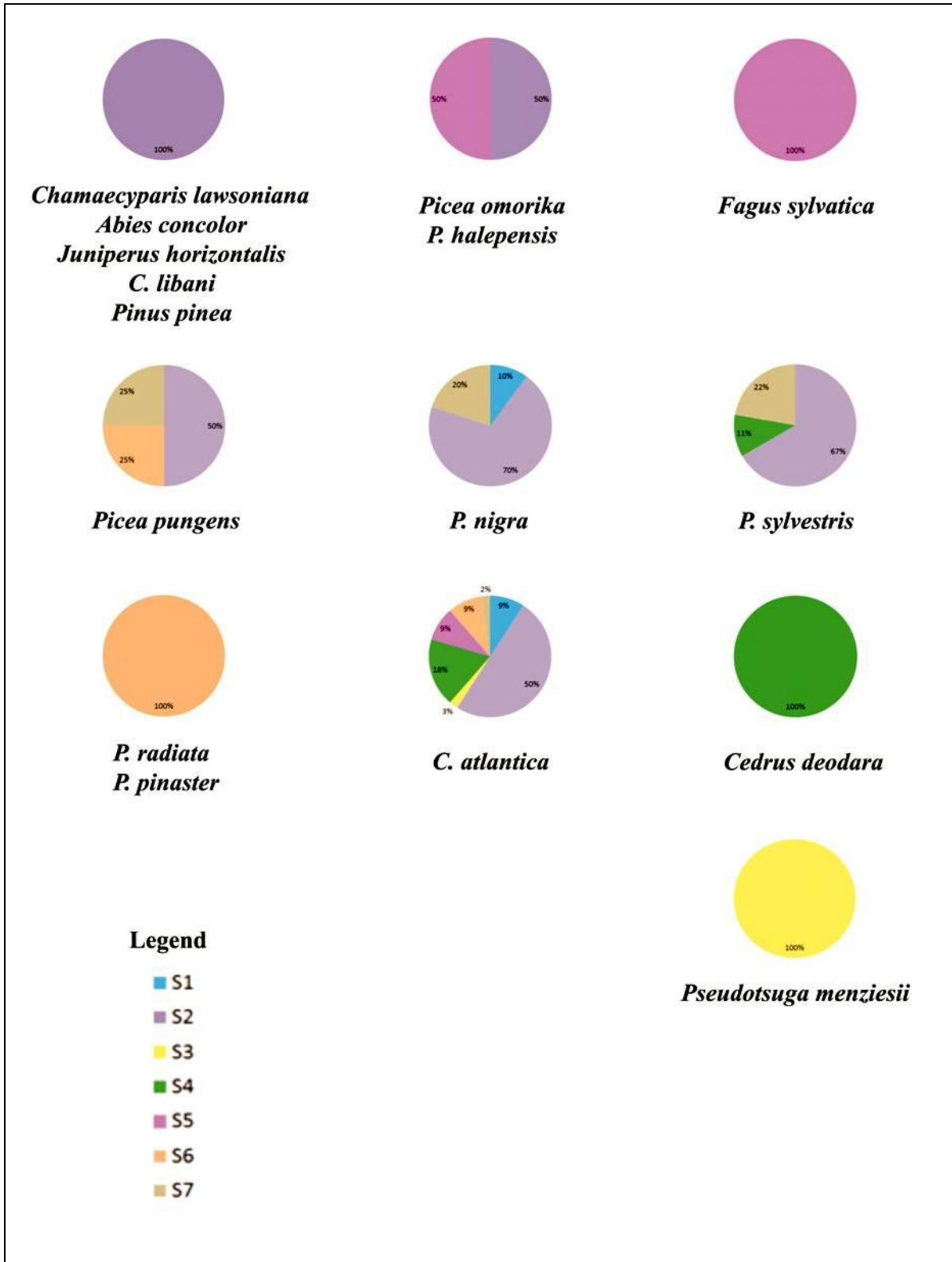


Figura 32. Multilokusni genotipovi nađeni na razliĉitim domaĉinima *Diplodia sapinea*.

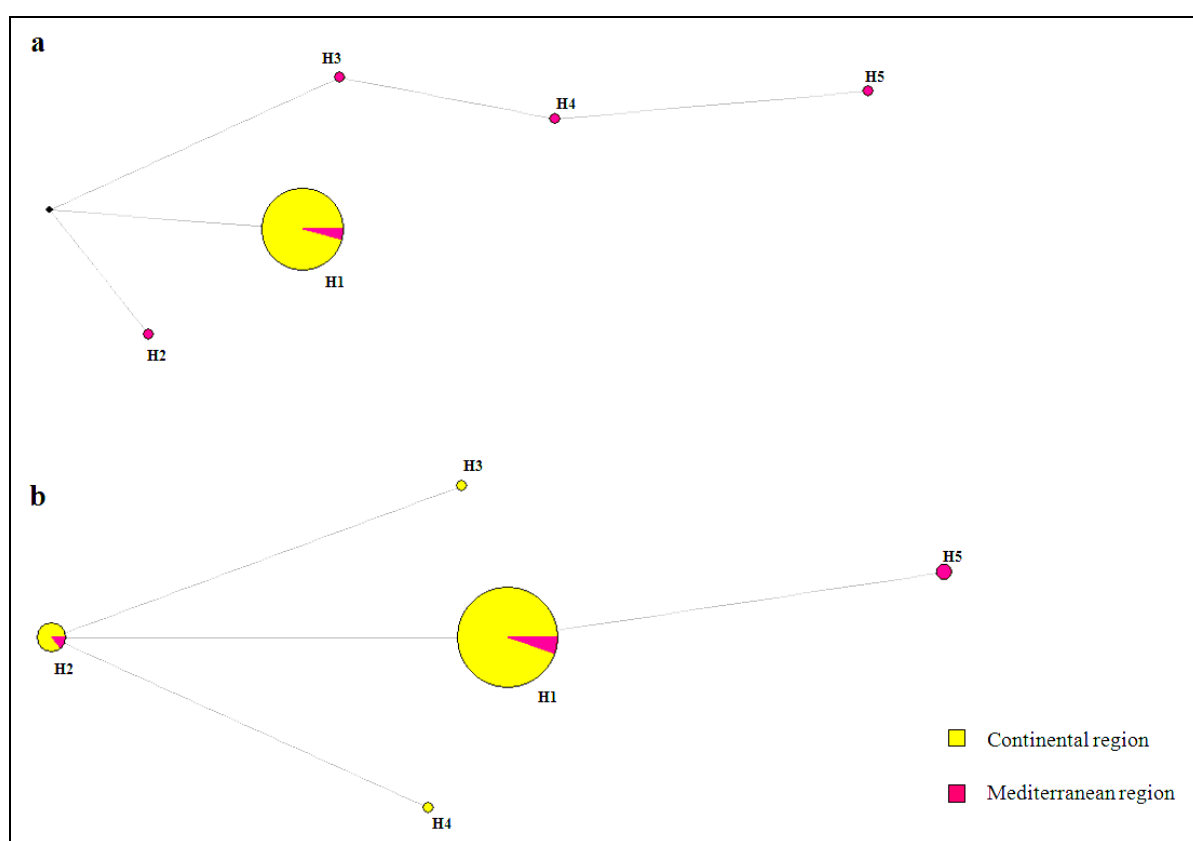
**Tabela 23.** Višestruki *Diplodia sapinea* genotipovi koji postoje u istom stablu ili delu stabla. **a.** Višestruki genotipovi u istom stablu. **b.**

Višestruki genotipovi u istom delu stabla/leziji.

| Vrsta drveta (a)        | Izolat                  | Genotip | Vrsta drveta (b)     | Izolat           | Genotip | Deo stabla/lezija |
|-------------------------|-------------------------|---------|----------------------|------------------|---------|-------------------|
|                         | BOT 98, BOT 33, BOT 227 | S2      |                      | BOT 227          | S2      |                   |
|                         | BOT 101, BOT 148        | S5      |                      | BOT 101, BOT 148 | S5      | necrotic stem     |
|                         | BOT 150                 | S1      |                      | BOT 150          | S1      |                   |
|                         | BOT 157, BOT 133        | S2      | <i>C. atlantica</i>  | BOT 187          | S4      | resinous stem     |
|                         | BOT 197                 | S4      |                      | BOT 201          | S6      |                   |
| <i>Cedrus atlantica</i> | BOT 187                 | S4      |                      | BOT 20           | S1      | resinous branch   |
|                         | BOT 201                 | S6      |                      | BOT 203          | S2      |                   |
|                         | BOT 20                  | S1      |                      |                  |         |                   |
|                         | BOT 203                 | S2      |                      | BOT 128, BOT 97  | S2      | pycnidia on cones |
|                         |                         |         | <i>P. sylvestris</i> | BOT 277          | S7      |                   |
|                         | BOT 128, BOT 97         | S2      |                      |                  | BOT 115 | S2                |
|                         | BOT 277                 | S7      |                      | BOT 95           | S7      |                   |
| <i>Pinus sylvestris</i> | BOT 115                 | S2      |                      |                  |         |                   |
|                         | BOT 95                  | S7      |                      |                  |         |                   |
| <i>P. nigra</i>         | BOT 266, BOT 199        | S2      |                      |                  |         |                   |
|                         | BOT 104                 | S7      |                      |                  |         |                   |

### 7.4.3. Haploidne mreže

Pet multilokusnih genotipova je detektovano u populaciji *N. parvum* (Fig. 33, Tabela S6). Haplotip 1 (H1) bio je najčešći i prisutan u 52 od 56 izolata. H1 je bio jedini haplotip detektovan u CR i svih pet haplotipova je nađeno u MR. Tri od pet MR haplotipova je bilo odvojeno jednom tačkastom mutacijom što je haploidnoj mreži dalo izled lanca. H1 je bio deljen između najvećeg broja domaćina u oba regiona (14 od 15) i četiri druga haplotipa su nađeni na po jednom domaćinu. Među domaćinima, *P. laurocerasus*, *E. globulus* i *C. atlantica* delili su dva haplotipova i svi ostali domaćini su imali po jedan haplotip.



**Figura 33.** Median joining mreža za multilokusne haplotipove: **a.** ITS, TEF-1- $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin i RPB2 za *Neofusicoccum parvum*; **b.** ITS i TEF-1- $\alpha$  za *Diplodia sapinea*. Svaki krug predstavlja haplotip i veličina kruga data je proporcionalno frekvenciji haplotipa. Boje naglašavaju geografsko poreklo haplotipova. Median vektori (male crne tačke) predstavljaju haplotipove koji nedostaju ili nisu uzorkovani. Dužine grana odgovaraju broju mutacionih koraka. Detalji o haplotipovima prikazanim u ovoj mreži dati su u Tabeli S6.

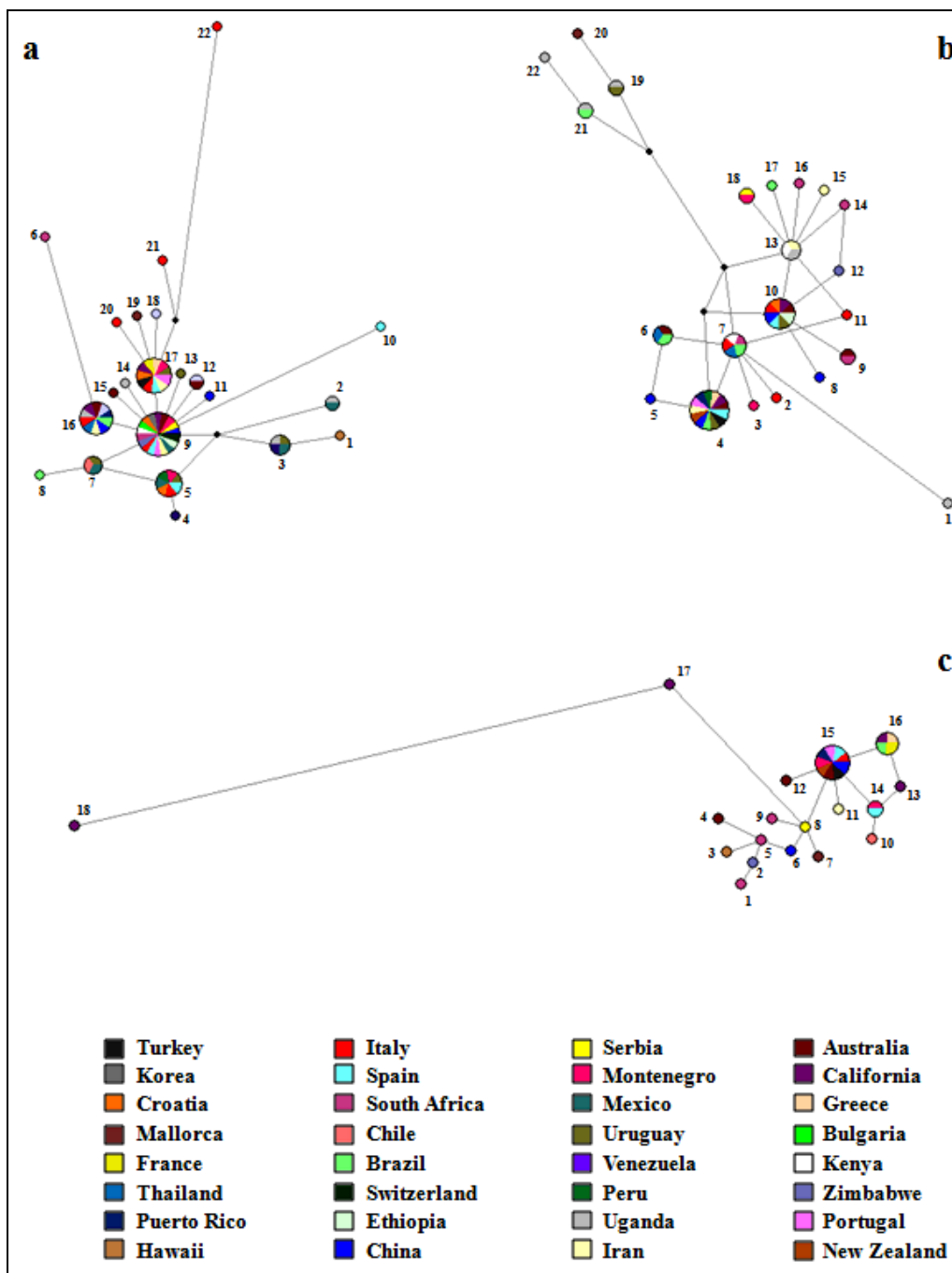


Pet multilokusnih haplotipova nađeno je u *D. sapinea* populaciji (Fig. 33, Tabela S6). Među njima, tri haplotipa nađeno je u MR i četiri haplotipa nađeno je u CR. Dva haplotipa deljeno je između regiona. H1 je bio najčešći i bio je prisutan kod 76 od 87 izolata. Ovaj haplotip je bio deljen između najvećeg broja domaćina (14 od 16), dok su H3 i H4 nađeni na jednom domaćinu. Stablo *C. atlantica* imalo je najveći broj haplotipova (4 od 5), *P. omorika* je imala dva haplotipa a svi ostali domaćini imali su samo jedan haplotip.

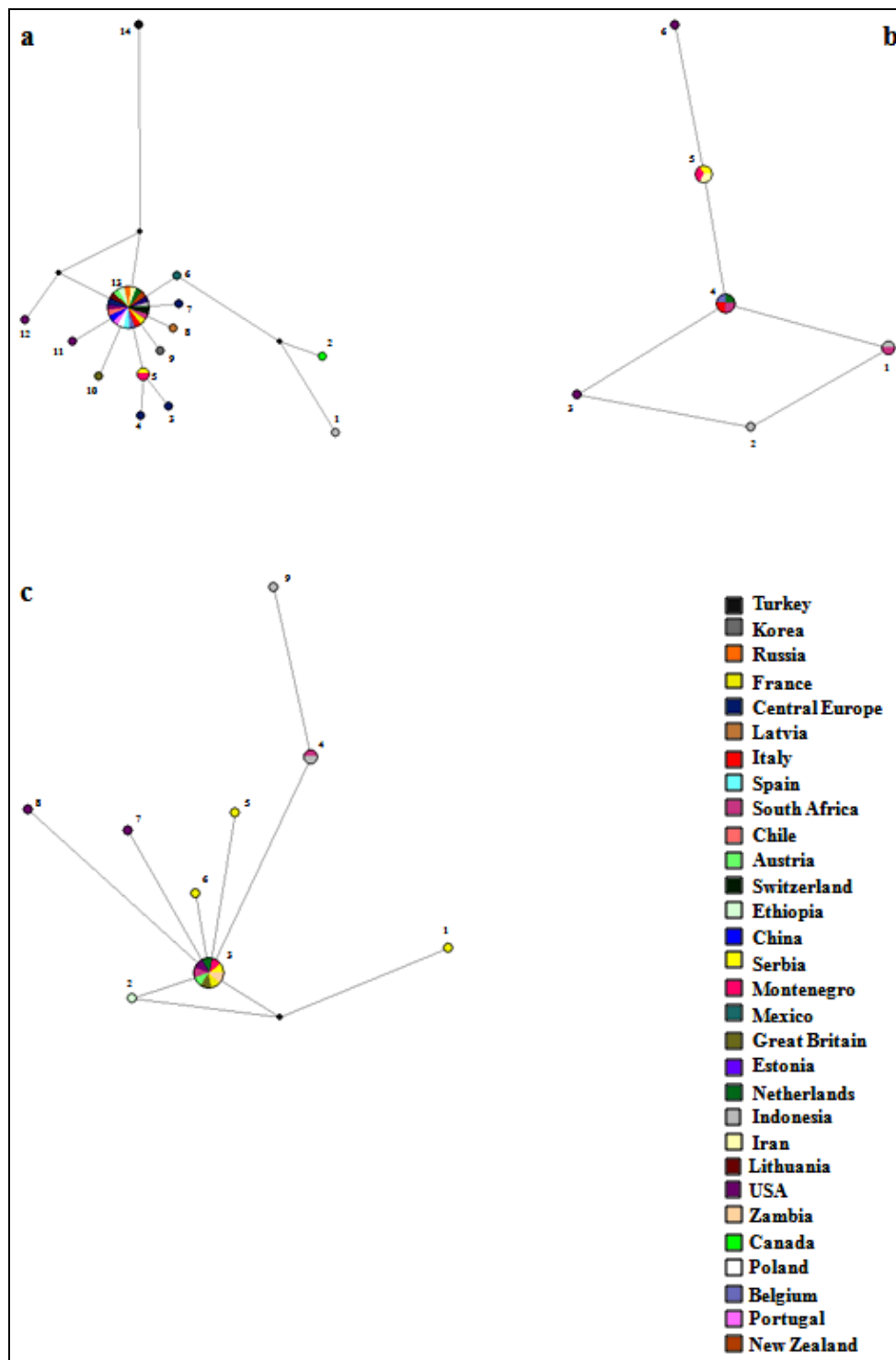
#### 7.4.4. Filogeografske veze sa haplotipovima izvan teritorije Zapadnog Balkana

Haploidne mreže *N. parvum* imale su zvezda-slični oblik sa 1-3 dominantna haplotipova i većim brojem manje čestih haplotipova sa većinom kratkim granama i samo jednom ili više dužih grana (Fig. 34). U ITS mreži izolati iz Srbije i Crne Gore pripadali su H9, koji je bio najčešći haplotip nađen u 18 zemalja i na četiri kontinenta (Fig. 34a). U mreži TEF-1- $\alpha$  izolati iz Srbije i Crne Gore predstavljali su haplotip H19, koji je bio udaljen dva mutaciona koraka od svog najbližeg rođaka (H13) koji je bio nađen u Iranu, Keniji i Ugandi. U  $\beta$ -tubulin mreži haplotipova izolati iz Srbije pripadali su potomku H8 koji je bio u bliskoj vezi sa dominantnim H15 i njihovu udaljenost je činilo četiri mutaciona koraka. Izolati iz Crne Gore pripadali su dominantnom H15, koji je bio nađen u devet zemalja i na četiri kontinenta i H14 koji je takođe bio nađen u Španiji. H14 je bio dva mutaciona koraka udaljen od H15, tri mutaciona koraka udaljen od H13 koji je bio nađen u Kaliforniji i jedan mutacioni korak daleko od H10 koji je bio nađen u Čileu.

Nije bilo uočljive geografske strukture u mreži *D. sapinea* haplotipova (Fig. 35). Sa izuzetkom TEF-1- $\alpha$  mreže, haploidne mreže *D. sapinea* imale su zvezdi-slični oblik sa brojnim rođaćkim haplotipovima koji su bili u vezi sa jednim dominantnim haplotipom. U ITS mreži izolati iz Srbije i Crne Gore pripadali su H5 koji je bio rođaćki haplotip udaljen jedan mutacioni korak od najčešćeg H13 koji je bio nađen u 21 zemlji i na pet kontinenta. H5 je bio jedan i dva mutaciona koraka udaljen od H4 i H3 koji su bili nađeni u Centralnoj Evropi i jedan mutacioni korak udaljeni od H13. U TEF-1- $\alpha$  mreži izolati iz Srbije i Crne Gore pripadali su H5 koji je takođe bio nađen u Iranu. Ovaj haplotip je bio jedan mutacioni korak udaljen od svojih najbližih rođaka, npr. H4 koji je bio nađen u Holandiji, Belgiji, Italiji i Južnoj Africi i H6 koji je bio nađen u SAD. U mreži  $\beta$ -tubulin, izolati iz Srbije i Crne Gore pripadali su H3, koji je bio najčešći i dominantan haplotip nađen u devet zemalja i na tri kontinenta.



**Figura 34.** Median joining mreže za haplotipove: **a.** ITS; **b.** TEF-1- $\alpha$ ; **c.**  $\beta$ -tubulin za *Neofusicoccum parvum*. Svaki krug predstavlja haplotip i veličina kruga data je proporcionalno frekvenciji haplotipa. Boje naglašavaju geografsko poreklo haplotipova. Median vektori (male crne tačke) predstavljaju haplotipove koji nedostaju ili nisu uzorkovani. Dužine grana odgovaraju broju mutacionih koraka.



**Figura 35.** Median joining mreža za multilokusne haplotipove: **a.** ITS; **b.** TEF-1- $\alpha$ ; **c.**  $\beta$ -tubulin za gljivu *Diplodia sapinea*. Svaki krug predstavlja haplotip i veličina kruga data je proporcionalno frekvenciji haplotipa. Boje naglašavaju geografsko poreklo haplotipova. Median vektori (male crne tačke) predstavljaju haplotipove koji nedostaju ili nisu uzorkovani. Dužine grana odgovaraju broju mutacionih koraka.

## 7.5. Diskusija

Ovo je prvo istraživanje koje razmatra genetički diverzitet i protok genotipova *N. parvum* i *D. sapinea* na području Zapadnog Balkana. Mikrosatelitski markeri pokazali su da postoji mali genetički i genotipski diverzitet ovih gljiva u regionu. Mali diverzitet i pojava *N. parvum* i *D. sapinea* većinom na introdukovanom drveću nagoveštava da su ove gljive verovatno bile introdukovane na područje Zapadnog Balkana. Deljeni genotipovi između autohtonih i introdukovanih vrsta drveća nagoveštavaju da su se gljive *N. parvum* i *D. sapinea* veovatno kretale sa introdukovanih na autohtone vrste drveća i *vice versa* i to je od posebne važnosti za *D. sapinea* populacije sa *Cedrus* spp. i *Pinus* spp. Nedostatak specifičnosti prema domaćinima kod ovih gljiva je potvrđen, sa istim genotipovima nađenim na različitim domaćinima. Rezultati ovog istraživanja su pokazali da su genotipovi deljeni između stabala u urbanim sredinama, plantažama borova, šumskim sastojinama i rasadnicima. Takođe, pokazalo se da više genotipova *D. sapinea* postoji na jednom inficiranom stablu i unutar jedne lezije.

Bogatstvo alela, broj privatnih alela, broj MLG i procenat polimorfnih lokusa reflektovani su niski nivo genskog i genotipskog diverziteta za *N. parvum* i *D. sapinea* na području Zapadnog Balkana. Nei (1978) nepristrasni genski diverzitet ( $H'$ ) za sve geografske i populacije definisane na osnovu domaćina, kao i za populacije *N. parvum* i *D. sapinea* sa područja Zapadnog Balkana kao celine je bio nizak, i kretao se od 0 to 0.083 za *N. parvum* i 0.072 do 0.09 za *D. sapinea*. Slično, niski nivo genotipskog diverziteta karakterisao je sve populacije *N. parvum* i *D. sapinea*, krećući se od 2.5 % do 2.8 % za *N. parvum* i 3.5 % do 13.5 % za *D. sapinea*. Ovaj rezultat nije iznenađujući jer se veruje da se populacije *N. parvum* i *D. sapinea* većinom razmnožavaju aseksualno i *D. sapinea* ima kriptični seksualni ciklus (Slippers i Wingfield 2007; Bihon i sar. 2012; Mehl i sar. 2014). Iako veće osnivačke populacije i višestruke introdukcije iz različitih genetičkih izvora mogu povećati genetički diverzitet aseksualnih populacija, one tipično imaju nizak genotipski diverzitet (Dlugosch i Parker 2008; Gladieux i sar. 2015). U ovom istraživanju, dokaz o klonalnoj reprodukciji je zapažen u formi identičnih MLG među nekoliko izolata, naročito onih koji potiču sa istog stabla. Slično, Burgess i sar. (2004) dobili su rezultat od samo 5 % genotipskog diverziteta *D. sapinea* populacije u šumama i plantažama Francuske i Švajcarske. Takođe, Luchi i sar. (2014) su koristeći DAMD-PCR markere pokazali da je *D. sapinea* populacija u Italiji skoro potpuno klonalna.

Mala genetička varijacija u populacijama *N. parvum* i *D. sapinea* zapažena u ovom istraživanju mogla bi se objasniti efektom osnivača pri čemu manji broj individua sa samo delom diverziteta originalne populacije, osniva novu populaciju u novom području (Dlugosch i Parker 2008; Barres i sar. 2008). Takođe, pojava *N. parvum* i *D. sapinea* na većinom introdukovanom ukrasnom i šumskom drveću nagoveštava to da su ove gljive verovatno bile introdukovane u područje Zapadnog Balkana, ili direktno iz Severne Amerike, gde je većina domaćina autohtona, ali mnogo verovatnije iz intermedijarnih zemalja tzv. "mostova" (Lombaert i sar. 2010). U ovom smislu, sadnice ukrasnih biljaka importuju se u zemlje Zapadnog Balkana iz Holandije i drugih zemalja re-eksportera Centralne Evrope decenijama (Glavendekić 2013). Moguće je da je ova trgovina omogućila gljivama *N. parvum* i *D. sapinea* da iz Centralne Evrope dospeju u Srbiju i Crnu Goru. Kretanje ovih patogena između zemalja povezano sa ekspanzijom globalne trgovine proizvodima od drveta i sadnim materijalom dodatno je podržana njihovom širokom geografskom distribucijom, i zvezdi sličnim oblikom haploidnih mreža koji ukazuje na populaciju koja se brzo širi na nova područja (Posada i Crandall 2001).

Izolati *N. parvum* iz Srbije i Crne Gore pripadali su dominantnom ITS haplotipu (H5, H9 i H17) i deljeni su između više zemalja i kontinenata. Ovi dominantni haplotipovi nagoveštavaju nedavnu introdukciju vrste i, s obzirom na intenzitet trgovine ukrasnim biljem u Srbiji, najverovatnije je reč o više introdukcija koje su se odigrale u različito vreme (Glavendekić 2013). Slično, Sakalidis i sar. (2011) su zaključili da je trenutna pojava gljive *N. parvum* u različitim delovima sveta verovatno uzrok ponovljenih introdukcija biljnog materijala u nova područja. Do introdukcije *N. parvum* na područje Zapadnog Balkana najverovatnije je došlo nakon duge komercijalne izolacije Jugoistočne Evrope uzrokovane Jugoslovenskim ratovima završenim 2000-ih godina. U skladu sa tim, *N. parvum* je nedavno bio zabeležen po prvi put u obližnjoj Hrvatskoj (Kaliterna 2013).

Sličnost u pogledu frekvenci gena i deljeni genotipovi između *D. sapinea* izolata iz *Cedrus* spp. i *Pinus* spp. mogli bi se protumačiti time da se patogen kretao sa asimptomatičnih *C. atlantica* sadnica ka autohtonoj vrsti *P. nigra* nakon introdukcije od strane čoveka. U ovom smislu, ekspanzija sadnje alohtonih četinara i egzota, uključujući *C. atlantica* u Srbiji i Crnoj Gori je započeta otprilike u isto vreme kada je *D. sapinea* po prvi put zabeležena na *P. nigra* 1980-ih godina (Karadžić 1987). Ova hipoteza je dalje podržana činjenicom da se gljiva *D. sapinea* ponaša kao endofit u stablima *C. atlantica*, ali je veoma

agresivna prema *P. nigra* (Poglavlje 4). Stabla *C. atlantica* često se sade u neposrednoj blizini stabala borova u urbanim sredinama i mogla su služiti kao rezervoari inokuluma za infekcije *Pinus* spp. i *vice versa* (Poglavlje 4, 6). Ipak, to otvara pitanje o tome zašto je gljivi *D. sapinea* trebalo tako dugo da “skoči” sa smrče i jele ako je po prvi put zabeležena u ovom području pre nekoliko decenija. Potencijalni odgovor možemo naći u latentnoj prirodi ovog patogena i činjenici da su nedavni klimatski ekstemi doveli do toga da stabla u ovom regionu budu pod stresom, što je bilo povoljno po proces infekcije (Poglavlja 3, 4, 6). Takođe, nakon što su introdukovane, sadnice se u Srbiji često razmnožavaju reznicama i čuvaju u kontejnerima pre distribucije i sadnje u parkovima i baštama. Genetički uniformna stabla nastala na ovaj način (Hartmann i Kester 1983) mogu naročito doprineti širenju potencijalno opasnih patogena (Wingfield i sar. 2015).

Mikrosatelitski markeri i haploidne mreže pokazali su delimičnu geografsku izolaciju između populacija *N. parvum* i *D. sapinea* iz CR i MR. Ovaj rezultat je bio iznenađujući uzimajući u obzir široku geografsku distribuciju patogena i porast globalne trgovine (Phillips i sar. 2013; Santini i sar. 2013). Ipak, Srbija je odvojena od mediteranskog dela Crne Gore skoro 3000m visokim Dinarskim planinama i ovaj planinski lanac se već pokazao kao efektivna prirodna geografska barijera koja dovodi do redukcije protoka gena i izolacije prirodnih populacija (npr. Temunović i sar. 2012; Lacković i sar. 2014). Takođe, trgovina sadnicama između dva regiona je ograničena jer se sadnice većine mediteranskih vrsta ne proizvode u Srbiji (Glavendekić 2013). Crna Gora uvozi mediteranske biljke pretežno iz obližnje Italije, trgovinskim putem koji čini Jadransko more ili, alternativno iz Holandije koja je najveći re-eksporter sadnica u Evropi ([www.minpolj.gov.me](http://www.minpolj.gov.me)). U ITS haploidnoj mreži, MR haplotipovi gljive *N. parvum* bili su većinom deljeni sa zemljama sa mediteranskom i tropskom klimom npr. Italijom, Grčkom, Španijom. Takođe, u testovima patogenosti pokazano je da MR genotipovi gljive *N. parvum* mogu inficirati domaćine koji tipično rastu u CR, ali se njihova agresivnost često razlikuje od CR genotipova i MR genotip nije mogao inficirati *C. atlantica* (Poglavlje 6, Tabela S9). Ipak, imajući u obzir ograničeni broj izolata dobijen iz MR i mali broj molekularnih markera primenjenih na *N. parvum* populaciju moguće je da je genetički diverzitet podcenjen i dodatno uzorkovanje bi bilo neophodno kako bi se izveo validni zaključak.

## 7.6. Zaključci

Naša istraživanja su u skladu sa predhodno iznetim sugestijama (Slippers i Wingfield 2007; Wingfield i sar. 2015) da trgovina sadnicama ukrasnih vrsta može biti značajan izvor širenja *Botryosphaeriaceae* vrsta. Povećana potražnja za egzotama i već zrelim stablima, naročito četinara, porudžbine internetom, efikasni i jeftini transport i slobodnija trgovina nakon jugoslovenskih ratova doprineli su povećanom uvozu ukrasnog bilja u Srbiju, uglavnom iz drugih evropskih zemalja npr. Holandije, Belgije, Italije i Slovenije (Glavendekić 2013). Međunarodne regulacije u oblasti zdravlja bilja, uključujući srpski zakon o zdravlju bilja pretežno se oslanjaju na vizuelnu inspekciju sadnica (Slippers i Wingfield 2007; Zakon o zdravlju bilja Republike Srbije 2009; Santini i sar. 2013). To omogućava latentnim patogenima, kakve su gljive iz familije *Botryosphaeriaceae* da budu importovane sa asimptomatičnim sadnicama. Nedostatak specifičnosti u pogledu domaćina za gljive *N. parvum* i *D. sapinea* je potvrđen, sa istim genotipovima nađenim na različitim domaćinima. Multilokusne analize sekvenci i mikrosatelitski markeri pokazali su da su ove gljive introdukovane i uz podatke iz prethodnih istraživanja (Poglavlja 3, 4, 5, 6) to sugeriše da se agresivni genotipovi *N. parvum* i *D. sapinea* šire područjem Zapadnog Balkana. Ovo istraživanje takođe naglašava potrebu za merama opreza tokom međunarodne trgovine ukrasnim biljem.

## 8. Generalni zaključci

- ❖ U ovom istraživanju, deset *Botryosphaeriaceae* vrsta i to *Botryosphaeria dothidea*, *Neofusicoccum parvum*, *Diplodia sapinea*, *Diplodia mutila*, *Diplodia seriata*, *Dothiorella sarmentorum*, *Dothiorella* sp. 1, *Dothiorella* sp. 2, *Phaeobotryon cupressi* i *Sphaeropsis visci* izolovano je i identifikovano iz 42 vrste drveća i pet žbunastih vrsta u urbanim sredinama, šumskim plantažama, šumskim sastojinama i rasadnicima ukrasnog bilja.
- ❖ Najveći broj izolata identifikovan je kao *B. dothidea*, *D. sapinea* i *N. parvum*.
- ❖ Na osnovu biljaka domaćina i geografske distribucije, većina *Botryosphaeriaceae* vrsta predstavlja nove nalaze.
- ❖ Neke *Botryosphaeriaceae* vrste javljaju se prvenstveno na određenim domaćinima i to nagoveštava da te drvenaste vrste poseduju određene karakteristike koje odgovaraju ovim gljivama.
- ❖ Izolacije i eksperimenti inokulacije pokazali su da *Botryosphaeriaceae* vrste predstavljaju značajne patogene ukrasnog drveća i žbunja. Osim toga što proizvode rak rane na inokulisanim sadnicama, ovi patogeni su bili sposobni i da ubiju sadnice *Sequoiadendron giganteum*, *Thuja occidentalis*, *Abies concolor*, *Picea abies*, *Picea omorika*, *Picea pungens*, *Pseudotsuga menziesii*, *Pinus sylvestris*, *Pinus nigra*, *Cupressus sempervirens* i *Quercus robur*, žbunove *Viscum album* i da prstenuju izbojke *Aesculus hippocastanum*.
- ❖ Pokazalo se da *Botryosphaeriaceae* vrste mogu inficirati vrste drveća značajne ekološke, socijalne i ekonomske vrednosti i to samo doprinosi pretnji sa kojom se ova stabla već suočavaju. Na primer, *D. seriata* je bila sposobna da inficira i na kraju ubije *Q. robur*. Gljive *D. sapinea* i *N. parvum* su mogle inficirati i ubiti *P. omorika*; *N. parvum* i *D. sapinea* su bile sposobne da inficiraju i ubiju *P. abies*.
- ❖ Rezultati ovog istraživanja, na osnovu velikog broja domaćina i sposobnosti *Botryosphaeriaceae* da inficiraju i biljke domaćine i one koje to nisu, ukazali su na generalističku prirodu većine ovih gljiva.
- ❖ Recipročne inokulacije su pokazale da *D. sapinea* nije specifični patogen i izaziva bolest i na vrstama drveća iz kojih nije izolovana. Ipak, patogen je najagresivniji prema nekim vrstama iz familije *Pinaceae*.
- ❖ Sušenje satabala sa vrha moglo bi biti rezultat stresa koje drveće doživljava usled ekstremnih vremenskih prilika (npr. visoke temperature, suša), “efekta toplotnog ostrva”,



drugih stresova koji pogađaju stabla u urbanim sredinama, sadnje četinara na staništa lišćara i drugih neadekvatnih postupaka gazdovanja stablima u urbanim sredinama.

- ❖ Visok pritisak propagula i neposredna blizina autohtonih vrsta i egzota u urbanim sredinama mogli bi takođe biti uzrok epidemije *Botryosphaeriaceae* vrsta u Srbiji.
- ❖ Rezultati ovog istraživanja potvrđuju da su diverzitet, distribucija i ko-infektivnost *Botryosphaeriaceae* vrsta uslovljeni domaćinom i sredinom u kojoj se dati domaćin javlja.
- ❖ Mali genetički diverzitet i dominacija *N. parvum* i *D. sapinea* na alohtonim stablima nagoveštava da su ove vrste najverovatnije introdukovane u Srbiju i to uvozom zaraženog sadnog materijala ukrasnih vrsta.
- ❖ *N. parvum* populacije najverovatnije su nastale nedavnim efektom osvajača poreklom iz nepoznate izvorne populacije.
- ❖ *D. sapinea* populacije najverovatnije su nastale ranijom kolonizacijom, sa individuama koje najverovatnije potiču iz Centralne Evrope ili Severne Amerike. Patogen se najverovatnije kretao od asimptomatičnih *C. atlantica* sadnica do autohtonih *P. nigra* nakon introdukcije od strane čoveka.
- ❖ Rezultati ovog istraživanja pokazali su da trgovina sadnicama ukrasnog bilja može biti važan izvor širenja *Botryosphaeriaceae* vrsta.
- ❖ Rezultati ovog istraživanja proširili su naše znanje o distribuciji *Botryosphaeriaceae*, njihovoj privrženosti određenim domaćinima i šteti koje ove gljive pričinjavaju stablima u urbanim sredinama.

## 9. Literatura

- Abdollahzadeh J, Goltapeh EM, Javadi A, Shams-Bakhsh M, Zare R, Phillips AJL (2009) *Barriopsis iraniana* and *Phaeobotryon cupressi*: two new species of the Botryosphaeriaceae from trees in Iran. *Persoonia*: 23: 1–8
- Abdollahzadeh J, Javadi A, Zare R, Phillips AJL (2014) A phylogenetic study of *Dothiorella* and *Spencermatinsia* species associated with woody plants in Iran, New Zealand, Portugal and Spain. *Persoonia* 32: 1–12
- Abdollahzadeh J, Zolfaghari S (2014) Efficiency of rep-PCR fingerprinting as a useful technique for molecular typing of plant pathogenic fungal species: *Botryosphaeriaceae* species as a case study. *FEMS microbiology letters* 361: 144–157
- Adamson K, Klavina D, Drenkhan R, Gaitnieks T, Hanso M (2015) *Diplodia sapinea* is colonizing the native Scots pine (*Pinus sylvestris*) in the northern Baltics. *Eur J Plant Pathol* 143: 343–350
- Alameda D, Anten NPR, Villar R (2012) Soil compaction effects on growth and root traits of tobacco depend on light, water regime and mechanical stress. *Soil Till Res* 120: 121–129
- Alberto FJ, Aitken SN, Alía R et al (2013) Potential for evolutionary responses to climate change-evidence from tree populations. *Glob Change Biol* 19: 1645–1661
- Allen CD, Macalady AK, Chenchouni H et al (2010) A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *Forest Ecol Manag* 259: 660–684
- Alves A, Barradas C, Phillips AJL, Correia A (2013) Diversity of *Botryosphaeriaceae* species associated with conifers in Portugal. *Eur J Plant Pathol* 135: 791–804
- Alves A, Correia A, Phillips AJL (2006) Multi-gene genealogies and morphological data support *Diplodia cupressi* sp. nov., previously recognized as *D. pinea* f. sp. *cupressi*, as a distinct species. *Fungal Diversity* 23: 1–15
- Alves A, Linaldeddu BT, Deidda A, Scanu B, Phillips AJL (2014) The complex of *Diplodia* species associated with *Fraxinus* and some other woody hosts in Italy and Portugal. *Fungal Divers* 67: 143–156

- Alves A, Phillips AJL, Henriques I, Correia A (2005) Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis as a method for the identification of *Botryosphaeria* species. *FEMS Microbiol Lett* 245: 221–229
- Alves A, Phillips AJL, Henriques I, Correia A (2007) Rapid differentiation of species of *Botryosphaeriaceae* by PCR fingerprinting. *Res Microbiol* 158: 112–121
- Anagnostakis S (1987) Chestnut blight: the classical problem of an introduced pathogen. *Mycologia* 79: 23–37
- Arx JA, Müller E (1975) A re-evaluation of the bitunicate ascomycetes with keys to families and genera. *Stud Mycol* 9: 1–159
- Arx JA, Muller E (1954) Die Gattungen der amersporen Pyrenomyceten. *Beitrage zur kryptogamenflora der Schweiz* 11: 1-434
- Aukema JE, McCullough DG, Von Holle B, Liebhold AJ, Britton KO, Frankel SJ (2010) Historical accumulation of non-indigenous forest pests in the continental United States. *BioScience* 60: 886–897
- Barber PA, Burgess TJ, Hardy GESTJ, Slippers B, Keane PJ, Wingfield MJ (2005) *Botryosphaeria* species from *Eucalyptus* in Australia are pleoanamorphic, producing *Dichomera* synanamorphs in culture. *Mycol Res* 109: 1347–1363
- Barrès B, Halkett F, Dutech C, Andrieux A, Pinon J, Frey P (2008) Genetic structure of the poplar rust fungus *Melampsora larici-populina*: evidence for isolation by distance in Europe and recent founder effects overseas. *Infect Genet Evol* 8: 577–587
- Baskarathevan J, Jaspers MV, Jones EE, Ridgway HJ (2013) Development of isolate-specific markers for *Neofusicoccum parvum* and *N. luteum* and their use to study rainwater splash dispersal in the vineyard. *Plant Path* 62: 501–509
- Begoude BAD, Slippers B, Wingfield MJ, Roux J (2010) Botryosphaeriaceae associated with *Terminalia catappa* in Cameroon, South Africa and Madagascar. *Mycol Prog* 9: 101–123
- Berlocher SH (1998) Origins: A brief history of research on speciation. In: Howard DJ, Berlocher SH. (eds.) *Endless forms: Species and Speciation*. Oxford University Press, New York, pp. 3–15

- Bettucci L, Alonso R, Tiscornia S (1999) Endophytic mycobiota of healthy twigs and the assemblage of species associated with twig lesions of *Eucalyptus globulus* and *E. grandis* in Uruguay. *Mycol Res* 103: 468–472
- Bettucci L, Simento S, Alonso R, Lupo S (2004) Endophytic fungi of twigs and leaves of three native species of *Myrtaceae* in Uruguay. *Sydowia* 56: 8–23
- Bihon W, Burgess T, Slippers B, Wingfield MJ, Wingfield BD (2011a) Distribution of *Diplodia pinea* and its genotypic diversity within asymptomatic *Pinus patula* trees. *Australas Plant Path* 40: 540–548
- Bihon W, Slippers B, Burgess T, Wingfield MJ, Wingfield BD (2011b) Sources of *Diplodia pinea* endophytic infections in *Pinus patula* and *P. radiata* seedlings in South Africa. *Forest Path* 41: 370–375
- Bihon W, Slippers B, Burgess T, Wingfield MJ, Wingfield BD (2012) Diverse sources of infection and cryptic recombination revealed in South African *Diplodia pinea* populations. *Fungal Biol* 116: 112–120
- Blaschke M, Cech T (2007) Absterbende Weisskiefern – eine langfristige Folge des Trockenjahres 2003. *Forstschutz Aktuell* 40: 32–34
- Bobev SG, Lopes J, Phillips AJL (2008) First Report of *Diplodia seriata* causing shoot blight and cankers of *Cotoneaster salicifolius* in Bulgaria. *Plant Dis* 92: 976
- Böhm A (1959) *Diplodia pinea* (Desm.) Kickx-uzročnik sušenja sadnica bora. *Šumarski list* 1-3: 48–50
- Brasier CM (2008) The biosecurity threat to the UK and global environment from international trade in plants. *Plant Path* 57: 792–808
- Brookhouser LW, Peterson GW (1970) Infection of Austrian, Scots, and ponderosa pines by *Diplodia pinea*. *Phytopathology* 61: 409–414
- Brown EA, Hendrix FF (1981) Pathogenicity and histopathology of *Botryosphaeria dothidea* on apple stems. *Phytopathology* 71: 375–379

- Burgess T, Wingfield BD, Wingfield MJ (2001a) Comparison of genotypic diversity in native and introduced populations of *Sphaeropsis sapinea* isolated from *Pinus radiata*. *Mycol Res* 105: 1331–1339
- Burgess T, Wingfield MJ, Wingfield BD (2001b) Simple sequence repeat markers distinguished among morphotypes of *Sphaeropsis sapinea*. *Appl Environ Microbiol* 67: 354–362
- Burgess TI, Barber PA, Hardy GSJ (2005) *Botryosphaeria* spp. associated with eucalypts in Western Australia, including the description of *Fusicoccum macroclavatum* sp. nov. *Australas Plant Path* 34: 557–567
- Burgess TI, Sakalidis ML, Hardy GE (2006) Gene flow of the canker pathogen *Botryosphaeria australis* between *Eucalyptus globulus* plantations and native eucalypt forests in Western Australia. *Austral Ecol* 31: 559–566
- Burgess TI, Wingfield MJ, Wingfield BD (2004) Global distribution of *Diplodia pinea* genotypes revealed using simple sequence repeat (SSR) markers. *Austral Plant Path* 33: 513–519
- Bussotti F, Ferrini F, Pollastrini M, Fini A (2014) The challenge of Mediterranean sclerophyllous vegetation under climate change: from acclimation to adaptation. *Environ Exp Bot* 103: 80–98
- Butin H (1993) Morphological adaptation and spore pleomorphism in the form-complex *Dichomera-Camarosporium* and *Fusicoccum-Dothiorella*. *Sydowia* 45: 161–166
- Butin H (2003) The shot-hole disease of Cherry laurel (*Prunus laurocerasus*)-old and new pathogens. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* 55: 51–53
- Capretti P, Dorworth CE (1989) Differential reaction in *Pinus* spp. to inoculation by various isolates of *Ascocalyx (Gremmeniella) abietina*. *Eur J Forest Path* 19: 407–413
- Carbone I, Kohn LM (1999) A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91: 553–556

- Cech T, Capretti P (1995) Epidemic occurrence of *Sphaeropsis sapinea* in eastern Austria. Shoot and foliage diseases in forest trees. In: Proc. of a Joint Meeting of the IUFRO Working Parties Vallombrosa, Firenze, Italy 6–11 June 1994, pp. 263–269
- Cesati V, Notaris G de (1863) Schema di classificazione degli sferiacei italici aschigeri piu' o meno appartenenti al genere *Sphaeria* nell'antico significato attribuitogli da Persoon. Commentario della Società Crittogamologica Italiana 4: 177–240
- Chen SF, Li G, Liu F, Michailides TJ (2015) Novel species of *Botryosphaeriaceae* associated with shoot blight of pistachio. *Mycologia* 107: 780–792
- Chen SF, Morgan DP, Hasey JK, Anderson K, Michailides TJ (2014) Phylogeny, morphology, distribution, and pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* and *Diaporthaceae* from English walnut in California. *Plant Dis* 98: 636–652
- Chou CKS (1976) A shoot dieback in *Pinus radiata* caused by *Diplodia pinea*. I. Symptoms, disease development and isolation of the pathogen. *New Zeal J For Sci* 6: 72–79
- Cloete M, Fourie PH, Damm U, Crous PW, Mostert L (2011) Fungi associated with dieback symptoms of apple and pear trees with a special reference to grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathol Mediterr* 50 (supplement): 176–190
- Crous PW, Groenewald JZ, Wingfield MJ, Phillips AJL (2007) *Neofusicoccum mediterraneum*. *Fungal Planet* 19. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, the Netherlands
- Crous PW, Müller MM, Sánchez RM, Giordano L, Bianchinotti MV, Anderson FE, Groenewald JZ (2015) Resolving *Tiarosporella* spp. allied to *Botryosphaeriaceae* and *Phacidiaceae*. *Phytotaxa* 202: 73–93
- Crous PW, Slippers B, Wingfield MJ, Rheeder J, Marasas WFO, Phillips AJL, Alves A, Burgess T, Barber P, Groenewald JZ (2006) Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. *Stud Mycol* 55: 235–253
- Dam BC van, de Kam (1984) *Sphaeropsis sapinea* (= *Diplodia pinea*), oorzaak van het afsterven van eindscheuten bij *Pinus* in Nederland. *Ned. Boschbouw. Tijdschr* 56: 173–177

- Damm U, Crous PW, Fourie PH (2007) *Botryosphaeriaceae* as potential pathogens of *Prunus* species in South Africa, with descriptions of *Diplodia africana* and *Lasiodiplodia plurivora* sp. nov. *Mycologia* 99: 664–680
- Danti R, Barberini S, Pecchioli A, Di Lonardo V, Della Rocca G (2014) The Epidemic Spread of *Seiridium cardinale* on leyland cypress severely limits its use in the Mediterranean. *Plant Dis* 98: 1081–1087
- de Wet J, Burgess T, Slippers B, Preisig O, Wingfield BD, Wingfield MJ (2003) Multiple gene genealogies and microsatellite markers reflect relationships between morphotypes of *Sphaeropsis sapinea* and distinguish a new species of *Diplodia*. *Mycol Res* 107: 557–566
- de Wet J, Slippers B, Preisig O, Wingfield BD, Wingfield MJ (2008) Phylogeny of the *Botryosphaeriaceae* reveals patterns of host association. *Mol Phylogenet Evol* 46: 116–126
- Dean MD, Ballard JWO (2004) Linking phylogenetics with population genetics to reconstruct the geographic origin of a species. *Mol Phylogenet Evol* 32: 998–1009
- Deng TJ, Li QL, Chen XL et al (2015) First Report of *Lasiodiplodia theobromae* associated with stem canker of *Cassia fistula* in Guangxi, South China. *Plant Dis* 99: 288
- Denman S, Crous PW, Taylor JE, Kang JC, Pascoe I, Wingfield MJ (2000) An overview of the taxonomic history of *Botryosphaeria* and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. *Stud Mycol* 45: 129–140
- Desprez-Loustau ML (2008) Alien fungi of Europe. In: DAISIE (ed) *Handbook of alien species in Europe*. Springer, Berlin, pp 15–28
- Desprez-Loustau ML, Marçais B, Nageleisen LM, Piou D, Vannini A (2006) Interactive effects of drought and pathogens in forest trees. *Ann For Sci* 63: 597–612
- Desprez-Loustau ML, Robin C, Buee M, Courtecuisse R, Garbaye J, Suffert F, Sache I, Rizzo DM (2007) The fungal dimension of biological invasions. *Trends Ecol Evol* 22: 472–480

- Diminić D, Jurc M (1999) Some aspects of *Sphaeropsis sapinea* presence on Austrian pine in Croatia and Slovenia. *Phyton - Annales Rei Botanicae* 39: 231–234
- Dlugosch KM, Parker IM (2007) Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Mol Ecol* 17: 431–449
- Doğmuş-Lehtijärvi HT, Lehtijärvi A, Karaca G, Aday AG, Oskay F (2009) Susceptibility of different coniferous seedlings inoculated with *Diplodia pinea*. In: Proc. Int. Conf. Foliage, Shoot and Stem Diseases of Forest Trees, Eğirdir, Turkey, 11–15 May 2009. Ed. by Doğmuş-Lehtijärvi, H. T. Isparta: Süleyman Demirel Univ., Faculty of For. J. Ser. A, Special Issue, pp. 48–57
- Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS (1991) ‘Touchdown’ PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res* 19: 4008
- Drenkhan R, Hanso M (2009) Recent invasion of foliage fungi of pines (*Pinus* spp.) to the Northern Baltics. *Forestry Studies* 51: 49–64
- Dutech C, Barres B, Bridier J, Robin C, Milgroom MG, Ravigne V (2012) The chestnut blight fungus world tour: successive introduction events from diverse origins in an invasive plant fungal pathogen. *Mol Ecol* 21: 3931–3946
- Ennos RA (2015) Resilience of forests to pathogens: an evolutionary ecology perspective. *Forestry* 88: 41–52
- Fabre B, Piou D, Desprez-Loustau M, Marcais B (2011) Can the emergence of pine *Diplodia* shoot blight in France be explained by changes in pathogen pressure linked to climate change? *Glob Change Biol* 17: 3218–3227
- Farris J, Kallersjo M, Kluge A, Bult C (1995) Testing significance of incongruence. *Cladistics* 10: 315–319
- Felsenstein J (1985) Confidence intervals on phylogenetics: an approach using bootstrap. *Evolution* 39: 783–791
- Fitt BDL, McCartney HA (1986) Spore dispersal in splash droplets. In: Ayres, P.G. and Boddy, L. (eds) *Water, Fungi and Plants*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 87–104



- Gardes M, Bruns TD (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol* 2: 113–118
- Geiser DM (2004) Practical molecular taxonomy of fungi. In: Tkacz, J.S., Lange, L. (eds.). *Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture, and Medicine*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA. pp. 3–14
- Gibson IAS (1979) Diseases of forest trees widely planted as exotics in the tropics and southern hemisphere. Part II. The genus *Pinus*. *Commonw. Mycol. Inst. Kew, Surrey, England*. 135 pp.
- Gladieux P, Feurtey A, Hood ME et al. (2015) The population biology of fungal invasions. *Mol Ecol* 24: 1969–1986
- Glass NL, Donaldson GC (1995) Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl Environ Microbiol* 61: 1323–1330
- Glavendekić M (2013) Proizvodnja i promet ukrasnih biljaka u Srbiji. *Biljni lekar* 41: 605–610
- Gonthier P, Warner R, Nicolotti G, Mazzaglia A, Garbelotto MM (2004) Pathogen introduction, as a collateral effect of military activity. *Mycol Res* 108: 468–470
- Goudet J, Jombart T (2015) Hierfstat: Estimation and tests of hierarchical F-statistics. R package version 0.04-15. <http://github.com/jgxm65/hierfstat>
- Graniti A (1998) Cypress canker: a pandemic in progress. *Annu Rev Phytopathol* 36: 91–114
- Gross A, Hosoya T, Queloz V (2014) Population structure of the invasive forest pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. *Mol Ecol* 23: 2943–2960
- Gruenwald NJ, Garbelotto M, Goss EM, Heungens K, Prospero S (2012) Emergence of the sudden oak death pathogen *Phytophthora ramorum*. *Trends Microbiol* 20: 131–138
- Grünwald NJ, Goodwin SB, Milgroom MG, Fry WE (2003) Analysis of genotypic diversity data for populations of microorganisms. *Phytopathology* 93: 738–746

- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O (2010) New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* 59: 307–321
- Harrington TC, Rizzo DM (1999) Defining species in the fungi. In: *Structure and dynamics of fungal populations*. Springer Netherlands. pp. 43-71
- Hartman JR, Vaillancourt LJ, Flowers JL, Bateman AM (2009) Managing *Diplodia* tip blight of landscape Austrian pines. *Arboriculture and Urban Forestry* 35: 27–32
- Hartmann HT, Kester DE (1983) *Plant propagation, principles and practices*. Prentice-Hall, Inc.
- Heath RN, Roux J, Slippers B, Drenth A, Pennycook SR, Wingfield BD, Wingfield MJ (2011) Occurrence and pathogenicity of *Neofusicoccum parvum* and *N. mangiferae* on ornamental *Tibouchina* species. *Forest Path* 41: 48–51
- Hepting HG (1971) *Diseases of forest and shade trees of the United States*. US Department of Agriculture. Forest Service. Agriculture hand book no. 386
- Hershkovitz MA, Lewis LA (1996) Deep-level diagnostic value of the rDNA-ITS region. *Mol Biol Evol* 13: 1276–1295
- Inderbitzin P, Bostock RM, Trouillas FP, Michailides TJ (2010) A six locus phylogeny reveals high species diversity in *Botryosphaeriaceae* from California almond. *Mycologia* 102: 1350–1368
- IPCC (2014) *Climate change 2014: impacts, adaptation, and vulnerability. Part A: global and sectoral aspects. Contribution of the working group II to the fifth assessment report of Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC)*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1132 pp
- Iturrutxa E, Ganley RJ, Raposo R, García-Serna I, Mesanza N, Kirkpatrick SC, Gordon TR (2013) Resistance levels of Spanish conifers against *Fusarium circinatum* and *Diplodia pinea*. *Forest Path* 43: 488–495
- Ivors KL, Garbelotto M, Vries IDE et al. (2006) Microsatellite markers identify three lineages of *Phytophthora ramorum* in US nurseries, yet single lineages in US forest and European nursery populations. *Mol Ecol* 15: 1493–1505

- Jacobs K, Bergdahl DR, Wingfield MJ, Halik S, Seifert KA, Bright DE, Wingfield BD (2004) *Leptographium wingfieldii* introduced into North America and found associated with exotic *Tomicus piniperda* and native bark beetles. *Mycol Res* 108: 411–418
- Jacobs KA, Rehner SA (1998) Comparison of cultural and morphological characters and ITS sequences in anamorphs of *Botryosphaeria* and related taxa. *Mycologia* 90: 601–610.
- Jami F, Slippers B, Wingfield MJ, Gryzenhout M (2012) Five new species of the *Botryosphaeriaceae* from *Acacia karroo* in South Africa. *Cryptogamie Mycol* 33: 245–266
- Jami F, Slippers B, Wingfield MJ, Gryzenhout M (2014) *Botryosphaeriaceae* species overlap on four unrelated, native South African hosts. *Fungal Biol* 118: 168–179
- Jankovský L, Palovčíková D (2003) Dieback of Austrian pine – the epidemic occurrence of *Sphaeropsis sapinea* in southern Moravia. *J Forest Sci* 49: 389–394
- Jovanović B (1967) Fitocenoza sa zeleničetom na Ostrozubu (*Lauroceraso-Fagetum*), in: Josifović M (eds.) Pančičev zbornik u spomen 150. godišnjice njegovog rođenja, pp. 127–137
- Kaliterna J, Milicevic T, Bencic D, Duralija B (2013) First Report of *Neofusicoccum parvum* associated with grapevine trunk diseases in Croatia. *Plant Dis* 97: 1656
- Kaliterna J, Milicevic T, Ivic D, Bencic D, Mesic A (2012) First report of *Diplodia seriata* as causal agent of olive dieback in Croatia. *Plant Dis* 96: 290
- Kamvar ZN, Tabima JF, Grünwald NJ (2014) Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *Peer J* 2: e281
- Karadžić D, 1987: Uticaj patogene mikoflore na propadanje i susenje stabala u kulturama *Pinus* vrsta. *Forestry* 5: 89–106 (in Serbian)
- Karadžić D, Lazarev V, Milenković M (2004) The most significant parasitic and saprophytic fungi on common mistletoe (*Viscum album* L.) and their potential application in biocontrol. *Bulletin of the Faculty of Forestry* 89: 115–126 (in Serbian with English summary)

- Karadžić D, Milijašević T (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 (in Serbian with English summary)
- Karadžić D, Milijašević T, Keča N (2000) Contribution to the study of the fungus *Botryosphaeria dothidea* agent of canker and tree dying. *Bulletin of the Faculty of Forestry* 83: 87–97 (in Serbian with English summary)
- Karadžić D, Stojadinović B (1988) Prilog poznavanju gljive *Sphaeropsis sapinea* Dyko & Sutton sa posebnim osvrtom na životni ciklus. *Šumarstvo* 5-6: 17–27
- Karadžić D, Vujanović V (1992) Prilog poznavanju patogene mikoflore bora (*Pinus halepensis* Mil.) u mediteranskom delu Crne Gore. *Glasnik Šumarskog fakulteta* 74: 31–41
- Karadžić, D (1987) Uticaj patogene mikoflore na propadanje i susenje stabala u kulturama *Pinus* vrsta. *Šumarstvo* 5: 89–106
- Kaya AGA, Lehtijärvi A, Kaya Ö, Dogmus-Lehtijärvi T (2014) First Report of *Diplodia pinea* on *Pseudotsuga menziesii* in Turkey. *Plant Dis* 98: 689–689
- Keča N, Klopfenstein NB, Kim MS, Solheim H, Woodward S (2014) Initial characterization of unidentified *Armillaria* isolate from Serbia using LSU-IGS1 and TEF-1a genes. *Forest path* 45: 120–126
- Kim KW, Park EW, Ahn KK (1999) Pre-penetration behavior of *Botryosphaeria dothidea* on apple fruits. *Plant Path J* 15: 223–227
- Köppen W (1936) Das geographische system der klimate. In W. Köppen & G. Geiger (Eds.), *Handbuch der klimatologie* (p. 44). Berlin: Gebrüder Borntraeger
- Kumar DSS, Hyde KD (2004) Biodiversity and tissue-recurrence of endophytic fungi in *Tripterygium wilfordii*. *Fungal Div* 17: 69–90
- Lacković N, Bertheau C, Stauffer C, Pernek M, Avtzis D (2015) Genetic split between coastal and continental populations of gypsy moth separated by Dinaric Alps. *J Appl Entomol* 139: 721–726

- Latinović J, Mazzaglia A, Latinović N, Ivanović M, Gleason ML (2013) Resistance of olive cultivars to *Botryosphaeria dothidea*, causal agent of olive fruit rot in Montenegro. *Crop Prot* 48: 35–40
- Law on plant health 2009: Official Gazette of the Republic of Serbia 41/09 (in Serbian)
- Lazzizzera C, Frisullo S, Alves A, Phillips AJL (2008) Morphology, phylogeny and pathogenicity of *Botryosphaeria* and *Neofusicoccum* species associated with drupe rot of olives in southern Italy. *Plant Path* 57: 948–956
- Leslie JF (1995) *Gibberella fujikuroi*: Available populations and variable traits. *Can J Bot* 73: 282–291
- Li W, Liu J, Bhat DJ, Camporesi E, Xu J, Hyde KD (2014) Introducing the novel species, *Dothiorella symphoricarposicola*, from snowberry in Italy. *Cryptogamie Mycol* 35: 257–270
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451–1452
- Liebhold AM, Brockerhoff EG, Garrett LJ, Parke JL, Britton KO (2012) Live plant imports: the major pathway for forest insect and pathogen invasions of the US. *Front Ecol Environ* 10: 135–143
- Ligoxigakis EK, Markakis EA, Papaioannou IA, Typas MA (2013) First report of palm rot of *Phoenix* spp. caused by *Neodeightonia phoenicum* in Greece. *Plant Dis* 97: 286
- Linaldeddu BT, Scanu B, Maddau L, Franceschini A (2014) *Diplodia corticola* and *Phytophthora cinnamomi*: the main pathogens involved in holm oak decline on Caprera Island (Italy). *Forest Path* 44: 191–200
- Linde C, Zhan J, McDonald BA (2002) Population structure of *Mycosphaerella graminicola*: from lesions to continents. *Phytopathology* 92: 946–955
- Liu J-K, Phookamsak R, Doilom M et al. (2012) Towards a natural classification of Botryosphaerales. *Fungal Div* 57: 149–210
- Liu Y-C, Milgroom MG (2007) High diversity of vegetative compatibility types in *Cryphonectria parasitica* in Japan and China. *Mycologia* 99: 279–284

- Lombaert E, Guillemaud T, Cornuet JM, Malausa T, Facon B, Estoup A (2010) Bridgehead effect in the worldwide invasion of the biocontrol harlequin ladybird. PLoS ONE 5: e9743
- Luchi N, Longa O, Danti R, Capretti P, Maresi G (2014) *Diplodia sapinea*: the main fungal species involved in the colonization of pine shoots in Italy. Forest Path 44: 372–381
- Luley CJ, Gleason ML (1988) *Diplodia* canker (*Sphaeropsis sapinea*) of *Abies concolor* in Iowa. Plant Dis 72: 79
- Luttrell ES (1955) The ascostromatic Ascomycetes. Mycologia 47: 511–532
- Madden LV, Hughes G, van den Bosch F (2007) The Study of Plant Disease Epidemics, St. Paul, MN: APS Press
- Marchi G, Cinelli T, Surico G (2014) Bacterial leaf spot caused by the quarantine pathogen *Xanthomonas arboricola* pv. pruni on cherry laurel in central Italy. Plant Dis 98: 1600–1610
- Martín L, Sáenz de Miera LE, Martín MT (2013) Applicability of AFLP fingerprinting markers to molecular discrimination of the three main fungal species associated with grapevine decline in Spain. J Phytopath 161: 689–695
- Mayorquin JS, Eskalen A, Downer AJ, Hodel DR, Liu A (2012) First report of multiple species of the *Botryosphaeriaceae* causing bot canker disease of Indian laurel-leaf fig in California. Plant Dis 96: 459
- McDonald BA, Linde C (2002) Pathogen population genetics, evolutionary potential and durable resistance. Annu Rev Phytopathol 40: 349–379
- Mehl JWM, Slippers B, Roux J, Wingfield MJ (2013) Cankers and other diseases caused by Botryosphaeriaceae. In: Gonthier P, Nicolotti G (ed) Infectious forest diseases, CAB International, pp. 298–317
- Michailides TJ (1991) Pathogenicity, distribution, sources of inoculum, and infection courts of *Botryosphaeria dothidea* on pistachio. Phytopathology 81: 566–573

- Michailides TJ, Morgan DP (1993) Spore release by *Botryosphaeria dothidea* in pistachio orchards and disease control by altering the trajectory angle of sprinklers. *Phytopathology* 83: 145–152
- Michailides TJ, Morgan DP, Felts D (2001) Collection and characterization of *Botryosphaeria dothidea* from various hosts and pathogenicity studies on pistachio. *KAC Plant Protection Quarterly* 11: 3–8
- Migliorini D, Ghelardini L, Tondini E, Luchi N, Santini A (2015) The potential of symptomless potted plants for carrying invasive soilborne plant pathogens. *Divers Distrib* 21: 1218–1229
- Milholland RD (1972) Histopathology and pathogenicity of *Botryosphaeria dothidea* on blueberry stems. *Phytopathology* 62: 654–660
- Milijašević T (2003) The most frequent parasitic and saprophytic fungi on some species in the fam. *Cupressaceae*. *Bulletin of the Faculty of Forestry* 87: 161-173 (in Serbian with English summary)
- Milijašević T (2009) The effect of *Sphaeropsis sapinea* on conifer decline in Serbia and Montenegro. *Works of the Faculty of Forestry, University of Sarajevo* 1: 35-51 (in Serbian with English summary)
- Miller JH (1928) Biologic studies in the Sphaeriales - I. *Mycologia* 20: 187–213
- Miller JH (1938) Studies in the development of two *Myriangiium* species and the systematic position of the order Myriangiales. *Mycologia* 30: 158–181
- Mitchell RJ, Beaton JK, Bellamy PE et al. (2014) Ash dieback in the UK: a review of the ecological and conservation implications and potential management options. *Biol Conserv* 175: 95–109
- Möller EM, Bahnweg G, Sandermann H, Geiger HH (1992) A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Res* 20: 6115–6116
- Morelet M, Chandelier P (1993) A case of variability in *Sphaeropsis sapinea*. *Eur J Forest Pathol* 23: 317–320

- Munck IA, Smith DR, Sickley T, Stanosz GR (2009) Site-related influences on cone-borne inoculum and asymptomatic persistence of *Diplodia* shoot blight fungi on or in mature red pines. *Forest Ecol Manag* 257: 812–819
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583–590
- Nei M, Maruyama T, Chakraborty R (1975) The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution* 29: 1–10
- Ni HF, Yang HR, Chen RS, Hung TH, Liou RF (2012) A nested multiplex PCR for species-specific identification and detection of *Botryosphaeriaceae* species on mango. *E J Plant Path* 133: 819–828.
- Nosil P, Funk DJ, Ortiz-Barrientos D (2009) Divergent selection and heterogeneous genomic divergence. *Mol Ecol* 18: 375–402
- Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R et al. (2015) *Vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.2-1. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Orsini L, Vanoverbeke J, Swillen I, Mergeay J, Meester L (2013) Drivers of population genetic differentiation in the wild: isolation by dispersal limitation, isolation by adaptation and isolation by colonization. *Mol Ecol* 22: 5983–5999
- Palmer MA, McRoberts RE, Nicholls TH (1988) Sources of inoculum of *Sphaeropsis sapinea* in forest tree nurseries. *Phytopathology* 78: 831–835
- Palmer MA, Nicholls TH (1985) Shoot blight and collar rot of *Pinus resinosa* caused by *Sphaeropsis sapinea* in forest tree nurseries. *Plant Dis* 69: 739–740
- Palmer MA, Nicholls TH, Croghan CF (1986) Fungicidal control of shoot blight caused by *Sphaeropsis sapinea* on red pine nursery seedlings. *Plant Dis* 70: 194–196
- Palmer MA, Stewart EL, Wingfield MJ (1987) Variation among isolates of *Sphaeropsis sapinea* in the north central United States. *Phytopathology* 77: 944–948
- Paoletti E, Danti R, Strati S (2001) Pre- and post-inoculation water stress affects *Sphaeropsis sapinea* canker length in *Pinus halepensis* seedlings. *Forest Path* 31: 209–218



- Pautasso M, Aas G, Queloz V, Holdenrieder O (2013) European ash (*Fraxinus excelsior*) dieback—A conservation biology challenge. *Biol Conserv* 158: 37–49
- Pavlic D, Slippers B, Coutinho TA, Wingfield MJ (2007) Botryosphaeriaceae occurring on native *Syzygium cordatum* in South Africa and their potential threat to *Eucalyptus*. *Plant Path* 56: 624–636
- Pavlic D, Slippers B, Coutinho TA, Wingfield MJ (2009) Molecular and phenotypic characterization of three phylogenetic species discovered within the *Neofusicoccum parvum*/*N. ribis* complex. *Mycologia* 101: 636–647
- Pavlic D, Wingfield MJ, Barber P, Slippers B, Hardy G, StJ, Burgess TI (2008) Seven new species of the *Botryosphaeriaceae* from baobab and other native trees in Western Australia. *Mycologia* 100: 851–866
- Pavlic-Zupanc D, Piškur B, Slippers B, Wingfield M, Jurc D (2015) Molecular and morphological characterization of *Dothiorella* species associated with dieback of *Ostrya carpinifolia* in Slovenia and Italy. *Phytopathol Mediterr* 54: 222–231
- Pérez CA, Wingfield MJ, Slippers B, Altier NA, Blanchette RA (2009) *Neofusicoccum eucalyptorum*, a *Eucalyptus* pathogen, on native *Myrtaceae* in Uruguay. *Plant Path* 58: 964–970
- Pérez CA, Wingfield MJ, Slippers B, Altier NA, Blanchette RA (2010) Endophytic and canker-associated *Botryosphaeriaceae* occurring on non-native *Eucalyptus* and native *Myrtaceae* trees in Uruguay. *Fungal Div* 41: 53–69
- Perrings C, Williamson M, Barbier EB et al (2002) Biological invasion risks and the public good: an economic perspective. *Conserv Ecol* 6. <http://www.consecol.org/vol6/iss1/art1>. Accessed 01 October 2015
- Peterson GW (1977) Infection, epidemiology, and control of *Diplodia* blight of Austrian, ponderosa and Scots pines. *Phytopathology* 67: 511–514
- Petrak F (1923) Mycologische Notizen V. No. 200. Über die Pseudosphaeriaceen v.H und ihre Bedeutung für die spezielle Systematik der Pyrenomyzeten. *Annales Mycologici* 21: 30–69

- Petrini O, Fisher PJ (1988) A comparative study of fungal endophytes in xylem and whole stem of *Pinus sylvestris* and *Fagus sylvatica*. Transactions of the British Mycological Society 91: 233–238
- Phillips A, Alves A, Correia A, Luque J (2005) Two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella* anamorphs. Mycologia 97: 513–529
- Phillips AJL, Alves A (2009) Taxonomy, phylogeny, and epitypification of *Melanops tulasnei*, the type species of *Melanops*. Fungal Div 38: 155–166
- Phillips AJL, Alves A, Abdollahzadeh J, Slippers B, Wingfield MJ, Groenewald JZ, Crous PW (2013) The *Botryosphaeriaceae*: genera and species known from culture. Stud Mycol 76: 51–167
- Phillips AJL, Alves A, Pennycook SR, Johnston PR, Ramaley A, Akulov A, Crous PW (2008) Resolving the phylogenetic and taxonomic status of dark-spored teleomorph genera in the *Botryosphaeriaceae*. Persoonia 21: 29–55
- Phillips AJL, Lopes J, Abdollahzadeh J, Bobev S, Alves A (2012) Resolving the *Diplodia* complex on apple and other *Rosaceae* hosts. Persoonia: 29: 29–38
- Pielou EC (1969) An introduction to mathematical ecology. Wiley, New York, N.Y.
- Pillay K, Slippers B, Wingfield MJ, Gryzenhout M (2013) Diversity and distribution of co-infecting *Botryosphaeriaceae* from *Eucalyptus grandis* and *Syzygium cordatum* in South Africa. S Afr J Bot 84: 38–43
- Piou D, Chandelier P, Morelet M (1991) *Sphaeropsis sapinea* [*Diplodia pinea*], a new health problem of pines in France? Revue Forestiere Francaise 43: 203–213
- Piškur B, Pavlic D, Slippers B, Ogris N, Maresi G, Wingfield MJ, Jurc D (2011) Diversity and pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* on declining *Ostrya carpinifolia* in Slovenia and Italy following extreme weather conditions. Eur J For Res 130: 235–249
- Pitt WM, Úrbez-Torres JR, Trouillas FP (2015) *Dothiorella* and *Spencermartinsia*, new species and records from grapevines in Australia. Australas Plant Path 44: 43–56
- Pocock SJ (2006) Statistics in practice: The simplest statistical test: how to check for a difference between treatments. BMJ: British Medical Journal 332: 1256

- Posada D (2008) jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol* 25: 1253–1256
- Posada D, Crandall KA (2001) Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends Ecol Evol* 16: 37–45
- Punithalingam E, Waterston JM (1970) *Diplodia pinea*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria No. 273
- Quaglia M, Moretti C, Buonauro R (2014) Molecular characterization of *Diplodia seriata*, a new pathogen of *Prunus laurocerasus* in Italy. *Phytoparasitica* 42: 189–197
- R Core Team (2015) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>
- Ramos LJ, Lara SP, McMillan RTJr, Narayanan KR (1991) Tip dieback of mango (*Mangifera indica*) caused by *Botryosphaeria ribis*. *Plant Dis* 75: 315–318
- Rayner RW (1970) A mycological colour chart. CMI and British Mycological Society. Kew. Surrey. UK
- Ridgway HJ, Amponsah NT, Brown DS, Baskarathevan J, Jones EE, Jaspers MV (2011) Detection of botryosphaeriaceous species in environmental samples using a multi-species primer pair. *Plant Path* 60: 1118–1127
- Rodas CA, Slippers B, Gryzenhout M, Wingfield MJ (2009) *Botryosphaeriaceae* associated with Eucalyptus canker diseases in Colombia. *Forest Path* 39: 110–123
- Rodriguez RJ, White JFJr, Arnold AE, Redman RS (2009) Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist* 182: 314–330
- Rojas EI, Herre EA, Mejía LC, Arnold AE, Chaverri P, Samuels GJ (2008) *Endomelanconiopsis*, a new anamorph genus in the *Botryosphaericeae*. *Mycologia* 100: 760–775
- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572–1574
- Rossnev B, Petkov P (1994) Viability of pine seedlings versus damages by *Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyko & Sutton. Shoot and foliage diseases in forest diseases,

proceedings of a joint meeting of the working parties canker and shoot blight of conifers and foliage diseases, Vallombrosa, Firenze, Italy, June 6-11, p. 274 (abstract).

Rumbos IC, Phillips AJL (2005) A new disease of kiwifruit caused by *Botryosphaeria parva*. S Afr J Sci 101: XXII

Rushforth K (1999) Trees of Britain and Europe. Harper Collins. ISBN 0-00-220013-9

Saccardo PA (1877) Fungi veneti novi vel critici vel Mycologiae Venetae addendi. Michelia 1: 1–72

Saccardo PA (1882) Sylloge fungorum omnium hucusque cognitorum 1: 456–466

Sakai AK, Allendorf FW, Holt JS et al. (2001) The population biology of invasive species. Annu Rev Ecol Syst 32: 305–332

Sakaladis M (2004) Resolving the *Botryosphaeria ribis* - *B. parva* species complex; a molecular and phenotypic investigation, Honors thesis. School of Biological Sciences and Biotechnology, Murdoch University, Western Australia

Sakalidis ML, Hardy GESJ, Burgess TI (2011) Endophytes as potential pathogens of the baobab species *Adansonia gregorii*: a focus on the *Botryosphaeriaceae*. Fungal Ecol 4: 1–14

Sakalidis ML, Slippers B, Wingfield BD, Hardy GSJ, Burgess TI (2013) The challenge of understanding the origin, pathways and extent of fungal invasions: global populations of the *Neofusicoccum parvum*–*N. ribis* species complex. Divers Distrib 19: 873–883

Sánchez ME, Venegas J, Romero MA, Phillips AJL, Trapero A (2003) *Botryosphaeria* and related taxa causing oak canker in southwestern Spain. Plant Dis 87: 1515–1521

Santini A, Ghelardini L, De Pace C. et al. (2013) Biogeographic patterns and determinants of invasion by alien forest pathogens in Europe. New Phytol 197: 238–250

Schoch CL, Shoemaker RA, Seifert KA, Hambleton S, Spatafora JW, Crous PW (2006) A multigene phylogeny of the *Dothideomycetes* using four nuclear loci. Mycologia 98: 1041–1052

- Shannon CE, Weaver W (1949) The mathematical theory of communication. University of Illinois Press, Urbana, 144 p.
- Shochat E, Warren PS, Faeth SH, McIntyre NE, Hope D (2006) From patterns to emerging processes in mechanistic urban ecology. *Trends Ecol Evol* 21: 186–191
- Sinclair WA, Lyon HH, Johnson WT (1987) Diseases of Trees and Shrubs. Ithaca, New York: Cornell University Press, 575 p.
- Sivanesan A (1984) The bitunicate ascomycetes and their anamorphs. J. Cramer. Vduz, Germany.
- Slippers B, Boissin E, Phillips AJL, Groenewald JZ, Lombard L, Wingfield MJ, Postma A, Burgess T, Crous PW (2013) Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriales*: a systematic and evolutionary framework. *Stud Mycol* 76: 31–49
- Slippers B, Burgess T, Crous PW et al. (2004a) Development of SSR markers for *Botryosphaeria* spp. with *Fusicoccum* anamorphs. *Mol Ecol Notes* 4: 675–677
- Slippers B, Burgess T, Pavlic D, Ahumada R, Maleme H, Mohali S, Wingfield MJ (2009) A diverse assemblage of *Botryosphaeriaceae* infect *Eucalyptus* in native and non-native environments. *South Forests* 71: 101–110
- Slippers B, Crous PW, Denman S, Coutinho TA, Wingfield BD, Wingfield MJ (2004b) Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. *Mycologia* 96: 83–101
- Slippers B, Roux J, Wingfield MJ, Van der Walt FJJ, Jami F, Mehl JWM, Marais GJ (2014) Confronting the constraints of morphological taxonomy in the Botryosphaeriales. *Persoonia* 33: 155–168
- Slippers B, Smit WA, Crous PW, Coutinho TA, Wingfield BD, Wingfield MJ (2007a) Taxonomy, phylogeny and identification of *Botryosphaeriaceae* associated with pome and stone fruit trees in South Africa and other regions of the world. *Plant Path* 56: 128–139
- Slippers B, Wingfield MJ (2007b) The *Botryosphaeriaceae* as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fung Biol Rev* 21: 90–106

- Smith DR, Stanosz GR (1995) Confirmation of two distinct populations of *Sphaeropsis sapinea* in the north central United States using RAPDs. *Phytopathology* 85: 699–704
- Smith H, Wingfield MJ, de Wet J, Coutinho TA (2000) Genotypic diversity of *Sphaeropsis sapinea* from South Africa and Northern Sumatra. *Plant Dis* 84: 139–142
- Stanosz G, Smith D, LaPhillip P, Daughtrey ML (2015) Leyland cypress shoot blight and canker caused by *Diplodia cupressi* on Long Island, New York. *Plant Dis* 99: 726
- Stanosz GR, Blodgett JT, Smith DR, Kruger EL (2001) Water Stress and *Sphaeropsis sapinea* as a latent pathogen of red pine seedlings. *New Phytol* 149: 531–538
- Stanosz GR, Smith DR, Leisso R (2007) *Diplodia* shoot blight and asymptomatic persistence of *Diplodia pinea* on or in stems of jack pine nursery seedlings. *Forest Path* 37: 145–154
- Stanosz GR, Swart WJ, Smith DR (1999) RAPD marker and isozyme characterization of *Sphaeropsis sapinea* from diverse coniferous hosts and locations. *Mycol Res* 103: 1193–1202
- Stenlid J, Oliva J, Boberg JB, Hopkins AJ (2011) Emerging diseases in European forest ecosystems and responses in society. *Forests* 2: 486–504
- Stoddart JA, Taylor JF (1988) Genotypic diversity: estimation and prediction in samples. *Genetics* 118: 705–711
- Stojanović A, Marković C (2004) Parasitoid complex of *Cameraria ohridella* (Lepidoptera: Gracillariidae) in Serbia. *Phytoparasitica* 32: 132–140
- Stojanović DB, Levanič T, Matović B, Orlović S (2015) Growth decrease and mortality of oak floodplain forests as a response to change of water regime and climate. *E J For Res* 134: 555–567
- Sutton TB (1981) Production and dispersal of ascospores and conidia by *Physalospora obtusa* and *Botryosphaeria dothidea* in apple orchards. *Phytopathology* 71: 584–589
- Swart WJ, Wingfield MJ (1991) Biology and control of *Sphaeropsis sapinea* on *Pinus* species in South Africa. *Plant Dis* 75: 761–766

- Swart WJ, Wingfield MJ, Knox-Davies PS (1987a) Conidial dispersal of *Sphaeropsis sapinea* in three climatic regions of South Africa. *Plant Dis* 71: 1038–1040
- Swart WJ, Wingfield MJ, Knox-Davies PS (1987b) Factors associated with *Sphaeropsis sapinea* infection on pine trees in South Africa. *Phytophylactica* 19: 505–510
- Swart WJ, Wingfield MJ, Knox-Davies PS (1988) Relative susceptibilities to *Sphaeropsis sapinea* of six *Pinus* spp. cultivated in South Africa. *Eur J Forest Path* 18: 184–189
- Swofford DL (2003) PAUP\*: phylogenetic analyses using parsimony (\*and other methods). Version 4. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30: 2725–2729
- Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, Geiser DM, Hibbett DS, Fisher MC (2000) Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genet Biol* 31: 21–32
- Taylor K, Barber PA, Hardy GESJ, Burgess TI (2009) *Botryosphaeriaceae* from tuart (*Eucalyptus gomphocephala*) woodland, including descriptions of four new species. *Mycol Res* 113: 337–353
- Tebaldi C, Hayhoe K, Arblaster JM, Meehl GA (2006) Going to the extremes. *Climatic change* 79: 185–211
- Temunovic M, Franjic J, Satovic Z, Grgurev M, Frascaria-Lacoste N, Fernández-Manjarrés JF (2012) Environmental heterogeneity explains the genetic structure of Continental and Mediterranean populations of *Fraxinus angustifolia* Vahl. *PloS one* 7: e42764
- Theissen F (1916) Mykologische Abhandlungen. Verhandlungen der Kaiserlich-Königlichen Zoologisch-Botanischen Gesellschaft in Wien 66: 296–400
- Theissen F, Sydow H (1915) Die Dothideales. Kritisch-systematische Originaluntersuchungen (Continuatio). *Annales Mycologici* 13: 431–746
- Theissen F, Sydow H (1917) Synoptische Tafeln. *Annales Mycologici* 15: 389–491
- Theissen F, Sydow H (1918) Vorentwürfe zu den Pseudosphaeriales. *Annales Mycologici* 16: 1–34

- Thomidis T, Exadaktylou E (2010) First report of *Botryosphaeria dothidea* causing shoot blight of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) in Greece. *Plant Dis* 94:1503
- Tsopelas P, Slippers B, Gonou-Zagou Z, Wingfield MJ (2010) First report of *Diplodia corticola* in Greece on kermes oak (*Quercus coccifera*). *Plant Path* 59: 805
- Tubby KV, Webber JF (2010) Pests and diseases threatening urban trees under a changing climate. *Forestry* 83: 451–459
- Uchida J, Zhong S, Killgore E (2006) First report of a rust disease on ‘Ohi’ a caused by *Puccinia psidii* in Hawaii. *Plant Dis* 90: 524
- Urbez-Torres JR (2011) The status of *Botryosphaeriaceae* species infecting grapevines. *Phytopathol Mediterr* 50 (supplement): 5–45
- Urbez-Torres JR, Battany M, Bettiga LJ et al. (2010) *Botryosphaeriaceae* species spore-trapping studies in California vineyards. *Plant Dis* 94: 717–724.
- Valade R, Kenis M, Hernandez-Lopez A. et al. (2009) Mitochondrial and microsatellite DNA markers reveal a Balkan origin for the highly invasive horse-chestnut leaf miner *Cameraria ohridella* (Lepidoptera, Gracillariidae). *Mol Ecol* 18: 3458–3470
- Vannini A, Franceschini S, Vettraino AM (2012) Manufactured wood trade to Europe: a potential unexpected carrier of alien fungi. *Biol Invasions* 14: 1991–1997
- Varela PC, Redondo Fernández V, Mansilla Vázquez JP, Aguín Casal O (2011) First report of dieback on hybrid Rhododendrons caused by *Neofusicoccum luteum* and *N. parvum* in Spain. *Plant Dis* 95: 221
- Varga I, Poczai P, Cernák I, Hyvönen J (2014) Application of direct PCR in rapid rDNA ITS haplotype determination of the hyperparasitic fungus *Sphaeropsis visci* (*Botryosphaeriaceae*). *SpringerPlus* 3: 569.
- Varga I, Taller J, Baltazár T, Hyvönen J, Poczai P (2012) Leaf-spot disease on European mistletoe (*Viscum album*) caused by *Phaeobotryosphaeria visci*: a potential candidate for biological control. *Biotechnol Lett* 34: 1059–1065
- Vasić M, Duduk N, Vico I, Ivanović MS (2013) First Report of *Botryosphaeria dothidea* causing white rot of apple fruit in Serbia. *Plant Dis* 97: 1659



- Vilgalys R, Hester M (1990) Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* spp. *J Bacteriol* 172: 4238–4246
- Walther GR, Roques A, Hulme PE et al. (2009) Alien species in a warmer world: risks and opportunities. *Trends Ecol Evol* 24: 686–693
- White TJ, Bruns T, Lee S et al. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (ed) *PCR protocols: a guide to methods and applications*, New York, Academic Press, pp 315–322.
- Wikee S, Lombard L, Nakashima C, Motohashi K, Chukeatirote E, et al. (2013) A phylogenetic re-evaluation of *Phyllosticta* (Botryosphaerales). *Stud Mycol* 76: 1–29
- Wingfield MJ, Brockerhoff EG, Wingfield BD, Slippers B (2015) Planted forest health: The need for a global strategy. *Science* 349: 832–836
- Wingfield MJ, Hammerbacher A, Ganley RJ, Steenkamp ET, Gordon TR, Wingfield BD (2008) Pitch canker caused by *Fusarium circinatum* – a growing threat to pine plantations and forests worldwide. *Australas Plant Path* 37: 319–334
- Xenopoulos S, Andréoli C, Panconesi A, Pinto Ganhao J, Tusset JJ (1990) Importance of cypress. In: *Progress in EEC Research on Cypress Diseases*. Report EUR 12493. Ed. by Ponchet, J. Brussels, Luxembourg: Commission of the European Communities, pp. 1–13
- Xu C, Wang C, Ju L (2015) Multiple locus genealogies and phenotypic characters reappraise the causal agents of apple ring rot in China. *Fungal Div* 71: 215–231
- Zhou S, Stanosz GR (2001) Relationships among *Botryosphaeria* species and associated anamorphic fungi inferred from the analyses of ITS and 5.8S rDNA sequences. *Mycologia* 93: 516–527
- Zlatković M, Keča N, Wingfield M, Jami F, Slippers B (2016) *Botryosphaeriaceae* associated with the die-back of ornamental trees in the Western Balkans, A Van Leeuw J *Microb* 109: 543-564
- Zwolinski JB, Swart WJ, Wingfield M (1990) Economic impact of a post-hail outbreak of dieback induced by *Sphaeropsis sapinea*. *Eur J Forest Path* 20: 405–411

## 10. Prilozi

### 10.1. Prilozi: Poglavlje 3

#### 10.1.1. Tabela S1. Drveće i žbunje uzorkovano u ovom istraživanju.

|                                      | Ukrasno drveće                    | Šumska stabla/žbunovi   | Plantažno drveće    | Sadnice                       |
|--------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------------|
| <b>Vrsta</b>                         | <i>Thuja occidentalis</i>         | <i>Rubus fruticosus</i> | <i>P. nigra</i>     | <i>Magnolia grandifolia</i>   |
|                                      | <i>T. plicata</i>                 | <i>Q. robur</i>         | <i>P. menziesii</i> | <i>Chamaecyparis pisifera</i> |
| <b>(drvo/žbun)</b>                   | <i>Fraxinus excelsior</i>         | <i>P. omorika</i>       |                     | <i>T. occidentalis</i>        |
|                                      | <i>Cedrus atlantica</i>           | <i>P. nigra</i>         |                     |                               |
|                                      | <i>C. deodara</i>                 | <i>Fagus sylvatica</i>  |                     |                               |
|                                      | <i>C. libani</i>                  | <i>P. abies</i>         |                     |                               |
|                                      | <i>Abies concolor</i>             | <i>Viscum album</i>     |                     |                               |
|                                      | <i>Chamaecyparis lawsoniana</i>   | <i>Q. cerris</i>        |                     |                               |
|                                      | <i>C. obtusa</i>                  |                         |                     |                               |
|                                      | <i>Cupressus sempervirens</i>     |                         |                     |                               |
|                                      | <i>C. arizonica</i>               |                         |                     |                               |
|                                      | <i>Pinus halepensis</i>           |                         |                     |                               |
|                                      | <i>P. sylvestris</i>              |                         |                     |                               |
|                                      | <i>P. nigra</i>                   |                         |                     |                               |
|                                      | <i>P. pinea</i>                   |                         |                     |                               |
|                                      | <i>P. pinaster</i>                |                         |                     |                               |
|                                      | <i>Picea pungens</i>              |                         |                     |                               |
|                                      | <i>P. omorika</i>                 |                         |                     |                               |
|                                      | <i>P. abies</i>                   |                         |                     |                               |
|                                      | <i>Pseudotsuga menziesii</i>      |                         |                     |                               |
|                                      | <i>Aesculus hippocastanum</i>     |                         |                     |                               |
|                                      | <i>Sequoia sempervirens</i>       |                         |                     |                               |
|                                      | <i>Sequoiadendron giganteum</i>   |                         |                     |                               |
|                                      | <i>Quercus ilex</i>               |                         |                     |                               |
|                                      | <i>Platanus acerifolia</i>        |                         |                     |                               |
|                                      | <i>Liriodendron tulipifera</i>    |                         |                     |                               |
|                                      | <i>Cryptomeria japonica</i>       |                         |                     |                               |
|                                      | <i>Forsythia europaea</i>         |                         |                     |                               |
|                                      | <i>Eucalyptus globulus</i>        |                         |                     |                               |
|                                      | <i>Populus nigra var. italica</i> |                         |                     |                               |
|                                      | <i>Salix caprea</i>               |                         |                     |                               |
|                                      | <i>Q. rubra</i>                   |                         |                     |                               |
|                                      | <i>Taxus baccata</i>              |                         |                     |                               |
|                                      | <i>P. tremula</i>                 |                         |                     |                               |
|                                      | <i>Prunus cerasus</i>             |                         |                     |                               |
| <b>Br. uzorkovanog drveća/žbunja</b> | 127                               | 11                      | 3                   | 4                             |

**10.1.2. Tabela S2.** Dimenzije spermacija i hlamidospora *Botryosphaeriaceae* vrsta.

| <i>Botryosphaeriaceae</i> vrste | Spermacije<br>(preč. × visina, μm)   | Hlamidospore<br>(preč. × visina, μm)             |
|---------------------------------|--|--|
| <i>Dothiorella sarmentorum</i>  | 2.74–3.44 × 1.46–1.69<br>(av. 3.05 × 1.57)   | –  |
| <i>Dothiorella</i> sp. 2        | 2.5–4.3 × 1.1–1.2<br>(av. 3.2 × 1.1, l/w 2.9)  | 18–26 × 6–9<br>19.7–31.6 × 7.2–11.5 <sup>1</sup> |
| <i>Botryosphaeria dothidea</i>  | 1.5–2.6 × 0.7–1<br>(av. 1.7 × 0.8)   | 5–11 × 3–6                                       |
| <i>Neofusicoccum parvum</i>     | 3–5.4 × 1.1–2.8 <sup>2</sup><br>(av. 3.8 × 1.6)<br>1.4–1.8 × 0.6–0.7 <sup>3</sup><br>(av. 1.6 × 0.6) | –  |
| <i>Diplodia sapinea</i>         | 2.7–5.3 × 1.5–3.1<br>(av. 3.5 × 1.7)   | 20–26 × 10–16<br>31–40 × 12–15 <sup>3</sup>      |
| <i>D. mutila</i>                | 2.8–4.7 × 0.8–2<br>(av. 3.5 × 1.42)  | 5.5–12 × 4–9.2                                   |
| <i>D. seriata</i>               | 2.9–4.5 × 1.3–2<br>(av. 3.46 × 1.73)   | 8–12 × 7.3–11                                    |
| <i>Shaeropsis visci</i>         | 2.3–6 × 1–2.1<br>(av. 3.99 × 1.56)   | 7–10.5 × 4–9.2                                   |
| <i>Phaeobotryon cupressi</i>    | 3.1–5.5 × 1.3–2.3<br>(av. 3.81 × 1.53)   | 15–29.4 × 5–28                                   |

<sup>1</sup> U ćelijama *Dothiorella* sp. 2 konidija. <sup>2</sup> Sužene u sredini. <sup>3</sup> U ćelijama konidija *D. sapinea*.

## 10.2. Prilozi: Poglavlje 6

### 10.2.1. Tabela S3. Drveće i žbunje uzorkovano u ovom i predhodnim istraživanjima

(Poglavlja 3, 4, 5).

<sup>1</sup> Poglavlje 3, <sup>2</sup> Poglavlje 4. Žbunaste vrste su boldovane.

|                               | Ukrasno drveće/žbunje   | Šumsko drveće/žbunje  | Plantažno drveće   | Sadnice   |
|-------------------------------|---|---|--|---|
| Vrste (drvo/žbun)             | <i>Thuja occidentalis</i> <sup>1</sup><br><i>T. plicata</i> <sup>1</sup><br><i>Fraxinus excelsior</i> <sup>1</sup><br><i>Cedrus atlantica</i> <sup>1</sup><br><i>C. deodara</i> <sup>1</sup><br><i>C. libani</i> <sup>2</sup><br><i>Abies concolor</i> <sup>2</sup><br><i>Chamaecyparis lawsoniana</i> <sup>1</sup><br><i>C. obtusa</i><br><i>Cupressus sempervirens</i> <sup>1</sup><br><i>C. arizonica</i> <sup>1</sup><br><i>Pinus halepensis</i> <sup>1</sup><br><i>P. sylvestris</i> <sup>2</sup><br><i>P. nigra</i> <sup>2</sup><br><i>P. pinea</i> <sup>2</sup><br><i>P. pinaster</i> <sup>2</sup><br><i>Picea pungens</i> <sup>2</sup><br><i>P. omorika</i> <sup>1</sup><br><i>P. abies</i><br><i>Pseudotsuga menziesii</i> <sup>1</sup><br><i>Aesculus hippocastanum</i> <sup>1</sup><br><i>Sequoia sempervirens</i> <sup>1</sup><br><i>Sequoiadendron giganteum</i> <sup>1</sup><br><i>Quercus ilex</i><br><i>Platanus acerifolia</i><br><i>Liriodendron tulipifera</i><br><i>Cryptomeria japonica</i><br><i>Forsythia europaea</i><br><i>Eucalyptus globulus</i> <sup>1</sup><br><i>Populus nigra</i> var. <i>italica</i><br><i>Salix caprea</i><br><i>Q. rubra</i><br><i>Taxus baccata</i><br><i>P. tremula</i><br><i>Prunus cerasus</i><br><b><i>Juniperus horizontalis</i></b> <sup>2</sup><br><b><i>Pittosporum tobira</i></b> <sup>1</sup><br><i>P. laurocerasus</i> <sup>1</sup><br><b><i>Ligustrum vulgare</i></b> <sup>1</sup> | <b><i>Rubus fruticosus</i></b> <sup>1</sup><br><i>Q. robur</i><br><i>P. omorika</i> <sup>1</sup><br><i>P. nigra</i> <sup>2</sup><br><i>Fagus sylvatica</i> <sup>2</sup><br><i>P. abies</i><br><b><i>Viscum album</i></b> <sup>1</sup><br><i>Q. cerris</i> | <i>P. nigra</i> <sup>2</sup><br><i>P. menziesii</i> <sup>1</sup><br><i>P. radiata</i> <sup>2</sup> | <i>Magnolia grandifolia</i><br><i>Chamaecyparis pisifera</i><br><i>T. occidentalis</i> <sup>1</sup> |
| Br. uzorkovanog drveća/žbunja | 209   | 11  | 5  | 4   |

**10.2.2. Tabela S4.** Izolati korišćeni u filogenetskim analizama.

| Izolati <sup>a, b</sup> | Identitet               | Domaćin                         | Lokacija <sup>c, d</sup>            | Kolektor          | GenBank Pristupni br. |               |                  |      |
|-------------------------|-------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|-------------------|-----------------------|---------------|------------------|------|
|                         |                         |                                 |                                     |                   | ITS                   | EF1- $\alpha$ | $\beta$ -tubulin | RPB2 |
| CBS 112555              | <i>Diplodia seriata</i> | <i>Vitis vinifera</i>           | Portugal                            | A. J. L. Phillips | AY25909               | AY57322       | DQ45885          | -    |
| CMW 39385               | <i>D. seriata</i>       | <i>Rubus fruticosus</i>         | Bosnia and Herzegovina <sup>c</sup> | D. Karadžić       | KF574991              | KF575023      | KF575087         | -    |
| CMW 39384               | <i>D. seriata</i>       | <i>Thuja occidentalis</i>       | Belgrade, Serbia                    | M. Zlatković      | KF574992              | KF575024      | KF575088         | -    |
| CMW 39378               | <i>D. seriata</i>       | <i>Cedrus atlantica</i>         | Belgrade, Serbia                    | M. Zlatković      | KF574994              | KF575031      | KF575090         | -    |
| CMW 39374               | <i>D. seriata</i>       | <i>Fraxinus excelsior</i>       | Bosnia and Herzegovina              | D. Karadžić       | KF574995              | KF575026      | KF575091         | -    |
| CMW 39376               | <i>D. seriata</i>       | <i>Chamaecyparis pisifera</i>   | Belgrade, Serbia <sup>d</sup>       | M. Zlatković      | KF574996              | KF575027      | KF575092         | -    |
| CMW 39379               | <i>D. seriata</i>       | <i>Ligustrum vulgare</i>        | Belgrade, Serbia                    | M. Zlatković      | KF574997              | KF575032      | KF575093         | -    |
| <b>BOT 221</b>          | <i>D. seriata</i>       | <i>C. atlantica</i>             | Belgrade, Serbia                    | M. Zlatković      | KF729250              | -             | -                | -    |
| <b>CMW 39380</b>        | <i>D. seriata</i>       | <i>Abies concolor</i>           | Pirot, Serbia                       | M. Zlatković      | KF729251              | KT987409      | -                | -    |
| <b>CMW 39381</b>        | <i>D. seriata</i>       | <i>Chamaecyparis lawsoniana</i> | Belgrade, Serbia                    | M. Zlatković      | KF729252              | -             | -                | -    |
| <b>BOT 247</b>          | <i>D. seriata</i>       | <i>L. vulgare</i>               | Belgrade, Serbia                    | M. Zlatković      | KF729253              | -             | -                | -    |
| <b>BOT 158</b>          | <i>D. seriata</i>       | <i>C. atlantica</i>             | Belgrade, Serbia                    | M. Zlatković      | KF729254              | -             | -                | -    |
| <b>BOT 231</b>          | <i>D. seriata</i>       | <i>C. atlantica</i>             | Belgrade, Serbia                    | M. Zlatković      | KF729255              | -             | -                | -    |
| <b>CMW 39382</b>        | <i>D. seriata</i>       | <i>Quercus robur</i>            | Morović, Serbia <sup>c</sup>        | M. Zlatković      | KF729256              | KT987410      | -                | -    |
| <b>CMW 39383</b>        | <i>D. seriata</i>       | <i>Thuja pilcata</i>            | Belgrade, Serbia                    | M. Zlatković      | KF729257              | KT987411      | -                | -    |
| <b>BOT 252</b>          | <i>D. seriata</i>       | <i>T. occidentalis</i>          | Pirot, Serbia                       | M. Zlatković      | KF729258              | -             | -                | -    |
| <b>CMW 39375</b>        | <i>D. seriata</i>       | <i>Cupressus sempervirens</i>   | Bijeljina, Bosnia and               | D. Karadžić       | KF729259              | KT987412      | -                | -    |
| <b>BOT 193</b>          | <i>D. seriata</i>       | <i>F. excelsior</i>             | Bosnia and Herzegovina              | D. Karadžić       | KF729260              | -             | -                | -    |
| <b>BOT 219</b>          | <i>D. seriata</i>       | <i>T. occidentalis</i>          | Belgrade, Serbia                    | M. Zlatković      | KF729261              | -             | -                | -    |
| <b>CMW 45092</b>        | <i>D. seriata</i>       | <i>Salix caprea</i>             | Pirot, Serbia                       | M. Zlatković      | KT964308              | -             | -                | -    |
| <b>BOT 284</b>          | <i>D. seriata</i>       | <i>S. caprea</i>                | Pirot, Serbia                       | M. Zlatković      | KT964309              | -             | -                | -    |
| <b>CMW 45094</b>        | <i>D. seriata</i>       | <i>Quercus rubra</i>            | Belgrade, Serbia                    | M. Zlatković      | KT964311              | -             | -                | -    |
| <b>CMW 45099</b>        | <i>D. seriata</i>       | <i>Prunus cerasus</i>           | Pirot, Serbia                       | M. Zlatković      | KT964310              | -             | -                | -    |
| <b>BOT 304</b>          | <i>D. seriata</i>       | <i>C. sempervirens</i>          | Belgrade, Serbia                    | M. Zlatković      | KT964312              | -             | -                | -    |
| CBS 119049              | <i>D. seriata</i>       | <i>Vitis sp.</i>                | Italy                               | L. Mugnai         | DQ45888               | DQ45887       | DQ45885          | -    |
| CBS 393.84              | <i>Diplodia sapinea</i> | <i>Pinus nigra</i>              | Netherlands                         | H. A. van der Aa  | DQ45889               | DQ45888       | DQ45886          | -    |
| CMW 39341               | <i>D. sapinea</i>       | <i>Cedrus deodara</i>           | Podgorica, Montenegro               | M. Zlatković      | KF574998              | KF575028      | KF575094         | -    |
| CMW 39346               | <i>D. sapinea</i>       | <i>Picea omorika</i>            | Belgrade, Serbia                    | M. Zlatković      | KF575000              | KF575030      | KF575096         | -    |
| CMW 39338               | <i>D. sapinea</i>       | <i>C. atlantica</i>             | Belgrade, Serbia                    | M. Zlatković      | KF574999              | KF575029      | KF575095         | -    |
| CMW 39336               | <i>D. sapinea</i>       | <i>Fagus sylvatica</i>          | Mt. Rudnik, Serbia <sup>c</sup>     | N. Keča           | KF729247              | KF729481      | -                | -    |
| CMW 39335               | <i>D. sapinea</i>       | <i>Pinus halepensis</i>         | Belgrade, Serbia                    | M. Zlatković      | KF729170              | KF729404      | -                | -    |

**Tabela S4.** Nastavak.

| Izolati <sup>a, b</sup> | Identitet                    | Domaćin                       | Lokacija <sup>c, d</sup>       | Kolektor          | GenBank  |               |                  |      |
|-------------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------|----------|---------------|------------------|------|
|                         |                              |                               |                                |                   | ITS      | EF1- $\alpha$ | $\beta$ -tubulin | RPB2 |
| CMW 39330               | <i>D. sapinea</i>            | <i>Juniperus horizontalis</i> | Belgrade, Serbia               | M. Zlatković      | KF729173 | KF729407      | -                | -    |
| CMW 39343               | <i>D. sapinea</i>            | <i>P. sylvestris</i>          | Niš, Serbia                    | M. Zlatković      | KF729195 | KF729429      | -                | -    |
| CMW 39345               | <i>D. sapinea</i>            | <i>Pinus pinea</i>            | Budva, Montenegro              | M. Zlatković      | KF729188 | KF729422      | -                | -    |
| CMW 39344               | <i>D. sapinea</i>            | <i>Picea pungens</i>          | Niš, Serbia                    | M. Zlatković      | KF729190 | KF729424      | -                | -    |
| CMW 39342               | <i>D. sapinea</i>            | <i>A. concolor</i>            | Belgrade, Serbia               | M. Zlatković      | KF729199 | KF729433      | -                | -    |
| CMW 39339               | <i>D. sapinea</i>            | <i>Pinus pinaster</i>         | Miločer, Montenegro            | M. Zlatković      | KF729205 | KF729439      | -                | -    |
| CMW 39334               | <i>D. sapinea</i>            | <i>Pseudotsuga menziesii</i>  | Belgrade, Serbia               | M. Zlatković      | KF729233 | KF729467      | -                | -    |
| CMW 39332               | <i>D. sapinea</i>            | <i>P. nigra</i>               | Pirot, Serbia                  | M. Zlatković      | KF729235 | KF729469      | -                | -    |
| CMW 39331               | <i>D. sapinea</i>            | <i>Cedrus libani</i>          | Podgorica, Montenegro          | M. Zlatković      | KF729236 | KF729470      | -                | -    |
| CMW 39333               | <i>D. sapinea</i>            | <i>C. lawsoniana</i>          | Herceg Novi, Montenegro        | M. Zlatković      | KF729239 | KF729473      | -                | -    |
| CMW 39347               | <i>D. sapinea</i>            | <i>Pinus radiata</i>          | Mt. Athos, Greece <sup>e</sup> | D. Karadžić       | KT749856 | KT749858      | -                | -    |
| CBS 109725              | <i>D. sapinea</i>            | <i>Pinus patula</i>           | South Africa                   | M. J. Wingfield   | DQ458896 | DQ45888       | DQ45886          | -    |
| CBS 112556              | <i>Diplodia intermedia</i>   | <i>Malus domestica</i>        | Aveiro, Portugal               | A. Alves          | GQ923857 | GQ92385       | -                | -    |
| CBS 124462              | <i>D. intermedia</i>         | <i>Malus sylvestris</i>       | Portugal                       | A. J. L. Phillips | GQ923858 | GQ92382       | -                | -    |
| CBS 118110              | <i>Diplodia scrobiculata</i> | <i>Pinus banksiana</i>        | USA                            | M. A. Palmer      | KF766160 | AY62425       | AY62425          | -    |
| CBS 113423              | <i>D. scrobiculata</i>       | <i>Pinus greggii</i>          | Mexico                         | M. J. Wingfield   | DQ458900 | DQ45888       | DQ45886          | -    |
| CBS 136014              | <i>Diplodia mutila</i>       | <i>Populus alba</i>           | Portugal                       | A. Alves          | KJ361837 | KJ361829      | -                | -    |
| CMW 39356               | <i>D. mutila</i>             | <i>Aesculus hippocastanum</i> | Obrenovac, Serbia              | D. Karadžić       | KF575001 | KF575033      | KF57509          | -    |
| CMW 39354               | <i>D. mutila</i>             | <i>P. halepensis</i>          | Herceg Novi, Montenegro        | M. Zlatković      | KF575002 | KF575034      | KF57509          | -    |
| CMW 39353               | <i>D. mutila</i>             | <i>Cupressus arizonica</i>    | Herceg Novi, Montenegro        | M. Zlatković      | KF575003 | KF575035      | KF57509          | -    |
| <b>CMW 39349</b>        | <b><i>D. mutila</i></b>      | <i>Pittosporum tobira</i>     | Herceg Novi, Montenegro        | M. Zlatković      | KF729262 | -             | -                | -    |
| <b>CMW 39351</b>        | <b><i>D. mutila</i></b>      | <i>Chamaecyparis obtusa</i>   | Kanjža, Serbia                 | N. Keča           | KF729263 | -             | -                | -    |
| <b>CMW 39357</b>        | <b><i>D. mutila</i></b>      | <i>Sequoia sempervirens</i>   | Belgrade, Serbia               | M. Zlatković      | KF729264 | -             | -                | -    |
| <b>BOT 129</b>          | <b><i>D. mutila</i></b>      | <i>C. arizonica</i>           | Belgrade, Serbia               | M. Zlatković      | KF729265 | -             | -                | -    |
| <b>BOT 105</b>          | <b><i>D. mutila</i></b>      | <i>Prunus laurocerasus</i>    | Budva, Montenegro              | M. Zlatković      | KF729266 | -             | -                | -    |
| <b>CMW 39352</b>        | <b><i>D. mutila</i></b>      | <i>P. laurocerasus</i>        | Belgrade, Serbia               | M. Zlatković      | KF729267 | -             | -                | -    |
| <b>CMW 39350</b>        | <b><i>D. mutila</i></b>      | <i>C. lawsoniana</i>          | Belgrade, Serbia               | M. Zlatković      | KF729268 | -             | -                | -    |
| <b>BOT 116</b>          | <b><i>D. mutila</i></b>      | <i>P. laurocerasus</i>        | Belgrade, Serbia               | M. Zlatković      | KF729269 | -             | -                | -    |
| <b>BOT 161</b>          | <b><i>D. mutila</i></b>      | <i>C. lawsoniana</i>          | Herceg Novi, Montenegro        | M. Zlatković      | KF729270 | -             | -                | -    |
| <b>CMW 39355</b>        | <b><i>D. mutila</i></b>      | <i>C. atlantica</i>           | Belgrade, Serbia               | M. Zlatković      | KF729271 | -             | -                | -    |
| <b>BOT 151</b>          | <b><i>D. mutila</i></b>      | <i>P. laurocerasus</i>        | Belgrade, Serbia               | M. Zlatković      | KF729272 | -             | -                | -    |

**Tabela S4.** Nastavak.

| Izolat <sup>a, b</sup> | Identitet                      | Domaćin                       | Lokacija <sup>c, d</sup>    | Kolektor                      | GenBank  |               |                  |      |
|------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|----------|---------------|------------------|------|
|                        |                                |                               |                             |                               | ITS      | EF1- $\alpha$ | $\beta$ -tubulin | RPB2 |
| CMW 39358              | <i>D. mutila</i>               | <i>T. plicata</i>             | Belgrade, Serbia            | M. Zlatković                  | KF729273 | -             | -                | -    |
| CMW 39348              | <i>D. mutila</i>               | <i>C. sempervirens</i>        | Herceg Novi, Montenegro     | M. Zlatković                  | KF729274 | -             | -                | -    |
| BOT 218                | <i>D. mutila</i>               | <i>A. hippocastanum</i>       | Obrenovac, Serbia           | D. Karadžić                   | KF729275 | -             | -                | -    |
| BOT 217                | <i>D. mutila</i>               | <i>C. atlantica</i>           | Herceg Novi, Montenegro     | M. Zlatković                  | KF729276 | -             | -                | -    |
| CBS 112553             | <i>D. mutila</i>               | <i>V. vinifera</i>            | Portugal                    | A. J. L. Phillips             | AY259093 | AY573219      | DQ458850         | -    |
| CBS 124133             | <i>Diplodia subglobosa</i>     | <i>Lonicera nigra</i>         | Spain                       | J. Luque                      | GQ923856 | GQ923824      | -                | -    |
| CBS 124132             | <i>D. subglobosa</i>           | <i>F. excelsior</i>           | Spain                       | J. Luque                      | DQ458887 | DQ458871      | -                | -    |
| CBS 122527             | <i>Sphaeropsis visci</i>       | <i>Viscum album</i>           | Ukraine                     | Á. Akulov                     | EU673327 | -             | -                | -    |
| CMW 39386              | <i>S. visci</i>                | <i>V. album</i>               | Mt Goč, Serbia <sup>c</sup> | N. Keča                       | KF575004 | KF575036      | KF575100         | -    |
| CBS 100163             | <i>S. visci</i>                | <i>V. album</i>               | Luxemburg                   | H.A. van der Aa               | EU673324 | EU673292      | EU673127         | -    |
| CBS 110496             | <i>Sphaeropsis porosa</i>      | <i>V. vinifera</i>            | South Africa                | J. M. van Niekerk             | AY343378 | AY343339      | EU673130         | -    |
| CBS 110574             | <i>S. porosa</i>               | <i>V. vinifera</i>            | South Africa                | J. M. van Niekerk             | AY343378 | AY343339      | -                | -    |
| IRAN 1458c             | <i>Phaeobotryon cupressi</i>   | <i>Cupressus sempervirens</i> | Gorgan, Iran                | M. A. Aghajani                | FJ919671 | FJ919660      | -                | -    |
| CMW 39387              | <i>P. cupressi</i>             | <i>C. sempervirens</i>        | Podgorica, Montenegro       | M. Zlatković/<br>J. Lazarević | KF575005 | KF575037      | KF575101         | -    |
| CBS 124700             | <i>P. cupressi</i>             | <i>C. sempervirens</i>        | Gorgan, Iran                | M. A. Aghajani                | FJ919672 | FJ919661      | -                | -    |
| CBS 122980             | <i>Phaeobotryon mamane</i>     | <i>Sophora chrysophylla</i>   | Hawaii                      | W. Gams                       | EU673332 | EU673298      | EU673121         | -    |
| CPC 12445              | <i>P. mamane</i>               | <i>S. chrysophylla</i>        | Hawaii                      | W. Gams                       | EU673336 | EU673302      | EU673122         | -    |
| CMW 8000               | <i>Botryosphaeria dothidea</i> | <i>Prunus sp.</i>             | Switzerland                 | B. Slippers                   | AY236949 | AY236898      | AY236927         | -    |
| CMW 39302              | <i>B. dothidea</i>             | <i>Pseudotsuga menziesii</i>  | Belgrade, Serbia            | M. Zlatković                  | KF575006 | KF575038      | KF575102         | -    |
| CMW 39304              | <i>B. dothidea</i>             | <i>Sequoia sempervirens</i>   | Belgrade, Serbia            | M. Zlatković                  | KF575007 | KF575039      | KF575103         | -    |
| CMW 39308              | <i>B. dothidea</i>             | <i>Sequoiadendron</i>         | Valjevo, Serbia             | N. Keča                       | KF575008 | KF575040      | KF575104         | -    |
| BOT 45                 | <i>B. dothidea</i>             | <i>C. atlantica</i>           | Belgrade, Serbia            | M. Zlatković                  | KF729086 | -             | -                | -    |
| BOT 67                 | <i>B. dothidea</i>             | <i>Quercus ilex</i>           | Podgorica, Montenegro       | J. Lazarević/<br>M. Zlatković | KF729087 | -             | -                | -    |
| BOT 77                 | <i>B. dothidea</i>             | <i>Q. ilex</i>                | Podgorica, Montenegro       | J. Lazarević/<br>M. Zlatković | KF729088 | -             | -                | -    |
| BOT 48                 | <i>B. dothidea</i>             | <i>Q. ilex</i>                | Podgorica, Montenegro       | J. Lazarević/<br>M. Zlatković | KF729089 | -             | -                | -    |
| BOT 46                 | <i>B. dothidea</i>             | <i>T. plicata</i>             | Belgrade, Serbia            | M. Zlatković                  | KF729091 | -             | -                | -    |

**Tabela S4.** Nastavak.

| Izolat <sup>a, b</sup> | Identitet          | Domaćin                     | Lokacija <sup>c, d</sup>      | Kolektor                       | GenBank  |               |                  |      |
|------------------------|--------------------|-----------------------------|-------------------------------|--------------------------------|----------|---------------|------------------|------|
|                        |                    |                             |                               |                                | ITS      | EF1- $\alpha$ | $\beta$ -tubulin | RPB2 |
| BOT 19                 | <i>B. dothidea</i> | <i>C. lawsoniana</i>        | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković/<br>N. Keča       | KF729090 | -             | -                | -    |
| BOT 83                 | <i>B. dothidea</i> | <i>S. giganteum</i>         | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković                   | KF729092 | -             | -                | -    |
| CMW 39313              | <i>B. dothidea</i> | <i>J. horizontalis</i>      | Budva, Montenegro             | M. Zlatković                   | KF729093 | -             | -                | -    |
| BOT 278                | <i>B. dothidea</i> | <i>S. giganteum</i>         | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković                   | KF729094 | -             | -                | -    |
| CMW 39310              | <i>B. dothidea</i> | <i>Magnolia grandifolia</i> | Belgrade, Serbia <sup>d</sup> | N. Keča                        | KF729095 | -             | -                | -    |
| BOT 35                 | <i>B. dothidea</i> | <i>S. giganteum</i>         | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković                   | KF729096 | -             | -                | -    |
| BOT88                  | <i>B. dothidea</i> | <i>S. sempervirens</i>      | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković                   | KF729097 | -             | -                | -    |
| BOT 37                 | <i>B. dothidea</i> | <i>C. atlantica</i>         | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković                   | KF729098 | -             | -                | -    |
| CMW 39314              | <i>B. dothidea</i> | <i>Picea abies</i>          | Mt. Goč, Serbia <sup>c</sup>  | D. Karadžić                    | KF729099 | -             | -                | -    |
| BOT 74                 | <i>B. dothidea</i> | <i>P. menziesii</i>         | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković                   | KF729100 | -             | -                | -    |
| BOT 134                | <i>B. dothidea</i> | <i>C. atlantica</i>         | Bar, Montenegro               | M. Zlatković                   | KF729101 | -             | -                | -    |
| BOT 4                  | <i>B. dothidea</i> | <i>S. giganteum</i>         | Valjevo, Serbia               | N. Keča                        | KF729102 | -             | -                | -    |
| BOT 24                 | <i>B. dothidea</i> | <i>Platanus acerifolia</i>  | Bosnia and Herzegovina        | D. Karadžić                    | KF729103 | -             | -                | -    |
| BOT 21                 | <i>B. dothidea</i> | <i>S. sempervirens</i>      | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković                   | KF729104 | -             | -                | -    |
| CMW 39311              | <i>B. dothidea</i> | <i>T. occidentalis</i>      | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković                   | KF729105 | -             | -                | -    |
| BOT 34                 | <i>B. dothidea</i> | <i>S. giganteum</i>         | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković/<br>I. Milenković | KF729106 | -             | -                | -    |
| BOT 18                 | <i>B. dothidea</i> | <i>C. atlantica</i>         | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković                   | KF729107 | -             | -                | -    |
| BOT 86                 | <i>B. dothidea</i> | <i>S. giganteum</i>         | Valjevo, Serbia               | N. Keča                        | KF729108 | -             | -                | -    |
| BOT 40                 | <i>B. dothidea</i> | <i>S. giganteum</i>         | Valjevo, Serbia               | N. Keča                        | KF729109 | -             | -                | -    |
| BOT 85                 | <i>B. dothidea</i> | <i>S. giganteum</i>         | Valjevo, Serbia               | N. Keča                        | KF729110 | -             | -                | -    |
| CMW 39312              | <i>B. dothidea</i> | <i>P. acerifolia</i>        | Bosnia and Herzegovina        | D. Karadžić                    | KF729111 | -             | -                | -    |
| BOT 32                 | <i>B. dothidea</i> | <i>S. giganteum</i>         | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković                   | KF729485 | -             | -                | -    |
| BOT 52                 | <i>B. dothidea</i> | <i>C. lawsoniana</i>        | Belgrade, Serbia              | N. Keča                        | KF729112 | -             | -                | -    |
| BOT 124                | <i>B. dothidea</i> | <i>C. lawsoniana</i>        | Belgrade, Serbia              | N. Keča                        | KF729113 | -             | -                | -    |
| BOT 58                 | <i>B. dothidea</i> | <i>C. atlantica</i>         | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković                   | KF729114 | -             | -                | -    |
| BOT 61                 | <i>B. dothidea</i> | <i>C. lawsoniana</i>        | Belgrade, Serbia              | N. Keča                        | KF729115 | -             | -                | -    |
| BOT 224                | <i>B. dothidea</i> | <i>T. plicata</i>           | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković                   | KF729116 | -             | -                | -    |
| BOT 120                | <i>B. dothidea</i> | <i>S. giganteum</i>         | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković                   | KF729117 | -             | -                | -    |



**Tabela S4.** Nastavak.

| Izolati <sup>a, b</sup> | Identitet          | Domaćin                 | Lokacija <sup>c, d</sup> | Kolektor                       | GenBank  |               |                  |      |
|-------------------------|--------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------------|----------|---------------|------------------|------|
|                         |                    |                         |                          |                                | ITS      | EF1- $\alpha$ | $\beta$ -tubulin | RPB2 |
| CMW 39309               | <i>B. dothidea</i> | <i>A. concolor</i>      | Belgrade, Serbia         | M. Zlatković                   | KF729118 | -             | -                | -    |
| BOT 80                  | <i>B. dothidea</i> | <i>T. plicata</i>       | Belgrade, Serbia         | M. Zlatković                   | KF729119 | -             | -                | -    |
| BOT 118                 | <i>B. dothidea</i> | <i>C. atlantica</i>     | Belgrade, Serbia         | N. Keča/<br>M. Zlatković       | KF729140 | -             | -                | -    |
| CMW 39305               | <i>B. dothidea</i> | <i>Q. ilex</i>          | Podgorica, Montenegro    | J. Lazarević/<br>M. Zlatković  | KF729120 | -             | -                | -    |
| BOT 91                  | <i>B. dothidea</i> | <i>S. giganteum</i>     | Belgrade, Serbia         | M. Zlatković                   | KF729121 | -             | -                | -    |
| BOT 168                 | <i>B. dothidea</i> | <i>S. giganteum</i>     | Belgrade, Serbia         | M. Zlatković                   | KF729122 | -             | -                | -    |
| BOT 99                  | <i>B. dothidea</i> | <i>S. giganteum</i>     | Belgrade, Serbia         | M. Zlatković                   | KF729123 | -             | -                | -    |
| BOT 122                 | <i>B. dothidea</i> | <i>C. atlantica</i>     | Belgrade, Serbia         | M. Zlatković                   | KF729124 | -             | -                | -    |
| BOT 156                 | <i>B. dothidea</i> | <i>P. menziesii</i>     | Belgrade, Serbia         | M. Zlatković                   | KF729125 | -             | -                | -    |
| CMW 39307               | <i>B. dothidea</i> | <i>T. plicata</i>       | Belgrade, Serbia         | M. Zlatković/<br>I. Milenković | KF729126 | -             | -                | -    |
| BOT 178                 | <i>B. dothidea</i> | <i>S. giganteum</i>     | Belgrade, Serbia         | M. Zlatković                   | KF729127 | -             | -                | -    |
| BOT 2                   | <i>B. dothidea</i> | <i>C. atlantica</i>     | Belgrade, Serbia         | M. Zlatković                   | KF729128 | -             | -                | -    |
| CMW 39315               | <i>B. dothidea</i> | <i>C. lawsoniana</i>    | Bar, Montenegro          | M. Zlatković                   | KF729129 | -             | -                | -    |
| BOT 110                 | <i>B. dothidea</i> | <i>S. giganteum</i>     | Valjevo, Serbia          | N. Keča                        | KF729130 | -             | -                | -    |
| BOT 106                 | <i>B. dothidea</i> | <i>S. giganteum</i>     | Belgrade, Serbia         | M. Zlatković                   | KF729141 | -             | -                | -    |
| BOT 66                  | <i>B. dothidea</i> | <i>C. lawsoniana</i>    | Belgrade, Serbia         | N. Keča                        | KF729131 | -             | -                | -    |
| BOT 176                 | <i>B. dothidea</i> | <i>C. lawsoniana</i>    | Morović, Serbia          | M. Zlatković                   | KF729132 | -             | -                | -    |
| BOT 68                  | <i>B. dothidea</i> | <i>S. sempervirens</i>  | Belgrade, Serbia         | M. Zlatković                   | KF729133 | -             | -                | -    |
| BOT 81                  | <i>B. dothidea</i> | <i>T. plicata</i>       | Belgrade, Serbia         | M. Zlatković                   | KF729134 | -             | -                | -    |
| BOT 175                 | <i>B. dothidea</i> | <i>T. plicata</i>       | Belgrade, Serbia         | M. Zlatković                   | KF729135 | -             | -                | -    |
| BOT 190                 | <i>B. dothidea</i> | <i>S. giganteum</i>     | Belgrade, Serbia         | M. Zlatković                   | KF729136 | -             | -                | -    |
| BOT 44                  | <i>B. dothidea</i> | <i>A. hippocastanum</i> | Obrenovac, Serbia        | D. Karadžić                    | KF729137 | -             | -                | -    |
| BOT 70                  | <i>B. dothidea</i> | <i>S. giganteum</i>     | Belgrade, Serbia         | M. Zlatković                   | KF729138 | -             | -                | -    |
| BOT 121                 | <i>B. dothidea</i> | <i>Q. ilex</i>          | Podgorica, Montenegro    | J. Lazarević/<br>M. Zlatković  | KF729139 | -             | -                | -    |
| BOT 92                  | <i>B. dothidea</i> | <i>S. giganteum</i>     | Belgrade, Serbia         | M. Zlatković                   | KF729142 | -             | -                | -    |
| BOT 108                 | <i>B. dothidea</i> | <i>C. atlantica</i>     | Belgrade, Serbia         | M. Zlatković                   | KF729143 | -             | -                | -    |
| BOT 111                 | <i>B. dothidea</i> | <i>C. lawsoniana</i>    | Belgrade, Serbia         | N. Keča                        | KF729144 | -             | -                | -    |
| BOT 263                 | <i>B. dothidea</i> | <i>S. sempervirens</i>  | Belgrade, Serbia         | M. Zlatković                   | KF729145 | -             | -                | -    |

Tabela S4. Nastavak.

| Izolot <sup>a, b</sup> | Identitet          | Domaćin                                  | Lokacija <sup>c, d</sup>      | Kolektor                      | GenBank  |               |                  |      |
|------------------------|--------------------|--|-------------------------------|-------------------------------|----------|---------------|------------------|------|
|                        |                    |  |                               |                               | ITS      | EF1- $\alpha$ | $\beta$ -tubulin | RPB2 |
| CMW 39300              | <i>B. dothidea</i> | <i>C. sempervirens</i>                   | Podgorica, Montenegro         | M. Zlatković/<br>J. Lazarević | KF729161 | -             | -                | -    |
| BOT 53                 | <i>B. dothidea</i> | <i>A. concolor</i>                       | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković                  | KF729146 | -             | -                | -    |
| CMW 39301              | <i>B. dothidea</i> | <i>C. lawsoniana</i>                     | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković                  | KF729147 | -             | -                | -    |
| BOT 213                | <i>B. dothidea</i> | <i>C. lawsoniana</i>                     | Belgrade, Serbia              | N. Keča                       | KF729148 | -             | -                | -    |
| BOT 73                 | <i>B. dothidea</i> | <i>P. menziesii</i>                      | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković                  | KF729149 | -             | -                | -    |
| BOT 41                 | <i>B. dothidea</i> | <i>C. atlantica</i>                      | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković                  | KF729150 | -             | -                | -    |
| BOT 72                 | <i>B. dothidea</i> | <i>P. menziesii</i>                      | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković                  | KF729151 | -             | -                | -    |
| BOT 47                 | <i>B. dothidea</i> | <i>S. giganteum</i>                      | Valjevo, Serbia               | N. Keča                       | KF729152 | -             | -                | -    |
| BOT 93                 | <i>B. dothidea</i> | <i>S. sempervirens</i>                   | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković                  | KF729153 | -             | -                | -    |
| BOT 75                 | <i>B. dothidea</i> | <i>Q. ilex</i>                           | Podgorica, Montenegro         | J. Lazarević/                 | KF729154 | -             | -                | -    |
| CMW 39306              | <i>B. dothidea</i> | <i>Liriodendron tulipifera</i>           | Belgrade, Serbia              | D. Karadžić/                  | KF729155 | -             | -                | -    |
| BOT 78                 | <i>B. dothidea</i> | <i>C. lawsoniana</i>                     | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković                  | KF729156 | -             | -                | -    |
| CMW 39298              | <i>B. dothidea</i> | <i>C. atlantica</i>                      | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković                  | KF729157 | -             | -                | -    |
| BOT 215                | <i>B. dothidea</i> | <i>C. atlantica</i>                      | Bar, Montenegro               | M. Zlatković                  | KF729158 | -             | -                | -    |
| BOT 181                | <i>B. dothidea</i> | <i>S. giganteum</i>                      | Valjevo, Serbia               | N. Keča                       | KF729159 | -             | -                | -    |
| BOT 94                 | <i>B. dothidea</i> | <i>C. lawsoniana</i>                     | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković                  | KF729160 | -             | -                | -    |
| BOT 166                | <i>B. dothidea</i> | <i>C. lawsoniana</i>                     | Bar, Montenegro               | M. Zlatković                  | KF729162 | -             | -                | -    |
| BOT 76                 | <i>B. dothidea</i> | <i>C. arizonica</i>                      | Herceg Novi, Montenegro       | M. Zlatković                  | KF729163 | -             | -                | -    |
| CMW 39303              | <i>B. dothidea</i> | <i>C. arizonica</i>                      | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković                  | KF729164 | -             | -                | -    |
| BOT 216                | <i>B. dothidea</i> | <i>C. atlantica</i>                      | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković                  | KF729165 | -             | -                | -    |
| CMW 39299              | <i>B. dothidea</i> | <i>A. hippocastanum</i>                  | Obrenovac, Serbia             | D. Karadžić                   | KF729166 | -             | -                | -    |
| BOT 165                | <i>B. dothidea</i> | <i>C. atlantica</i>                      | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković                  | KF729167 | -             | -                | -    |
| BOT 9                  | <i>B. dothidea</i> | <i>S. sempervirens</i>                   | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković                  | KF729168 | -             | -                | -    |
| BOT 262                | <i>B. dothidea</i> | <i>S. sempervirens</i>                   | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković                  | KF729169 | -             | -                | -    |
| CMW 45089              | <i>B. dothidea</i> | <i>Populus nigra</i> var. <i>italica</i> | Vršac, Serbia                 | N. Keča                       | KT964313 | -             | -                | -    |
| CMW 45091              | <i>B. dothidea</i> | <i>Salix caprea</i>                      | Pirot, Serbia                 | M. Zlatković                  | KT964320 | -             | -                | -    |
| BOT 283                | <i>B. dothidea</i> | <i>S. caprea</i>                         | Pirot, Serbia                 | M. Zlatković                  | KT964314 | -             | -                | -    |
| CMW 45096              | <i>B. dothidea</i> | <i>Taxus baccata</i>                     | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković                  | KT964315 | -             | -                | -    |
| CMW 45097              | <i>B. dothidea</i> | <i>Populus tremula</i>                   | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković                  | KT964322 | -             | -                | -    |
| BOT 298                | <i>B. dothidea</i> | <i>P. tremula</i>                        | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković                  | KT964323 | -             | -                | -    |
| CMW 45098              | <i>B. dothidea</i> | <i>Quercus cerris</i>                    | Mt. Suva, Serbia <sup>c</sup> | N. Keča                       | KT964316 | -             | -                | -    |

Tabela S4. Nastavak.

| Izolati <sup>a, b</sup> | Identitet                      | Domaćin                     | Lokacija <sup>c, d</sup>      | Kolektor                       | GenBank  |               |                  |      |
|-------------------------|--------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|--------------------------------|----------|---------------|------------------|------|
|                         |                                |                             |                               |                                | ITS      | EF1- $\alpha$ | $\beta$ -tubulin | RPB2 |
| <b>BOT 300</b>          | <i>B. dothidea</i>             | <i>Q. cerris</i>            | Mt. Suva, Serbia <sup>c</sup> | N. Keča                        | KT964317 | -             | -                | -    |
| <b>BOT 302</b>          | <i>B. dothidea</i>             | <i>C. lawsoniana</i>        | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković                   | KT964318 | -             | -                | -    |
| <b>BOT 305</b>          | <i>B. dothidea</i>             | <i>J. horizontalis</i>      | Pirot, Serbia                 | M. Zlatković                   | KT964321 | -             | -                | -    |
| <b>BOT 306</b>          | <i>B. dothidea</i>             | <i>J. horizontalis</i>      | Pirot, Serbia                 | M. Zlatković                   | KT964319 | -             | -                | -    |
| MUCC 501                | <i>B. dothidea</i>             | <i>Eucalyptus marginata</i> | Yalgorup, Australia           | K. M. Taylor                   | EF591916 | EF591969      | EF591952         | -    |
| ATCC 22927              | <i>Botryosphaeria corticis</i> | <i>Vaccinium sp.</i>        | USA                           | R. D. Millholland              | DQ299247 | EU673291      | EU673108         | -    |
| CBS 119047              | <i>B. corticis</i>             | <i>Vaccinium corymbosum</i> | New Jersey, USA               | P. V. Oudemans                 | DQ299245 | EU017539      | EU673107         | -    |
| IMI 63581b              | <i>Dothiorella sarmentorum</i> | <i>Ulmus sp.</i>            | England                       | E. A. Ellis                    | AY573212 | AY573235      | EU673102         | -    |
| CMW 39366               | <i>Do. sarmentorum</i>         | <i>A. hippocastanum</i>     | Belgrade, Serbia              | I. Milenković                  | KF575009 | KF575047      | KF575105         | -    |
| CMW 39364               | <i>Do. sarmentorum</i>         | <i>C. lawsoniana</i>        | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković                   | KF575010 | KF575048      | KF575106         | -    |
| CMW 39370               | <i>Do. sarmentorum</i>         | <i>C. atlantica</i>         | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković                   | KF575011 | KF575049      | KF575107         | -    |
| <b>CMW 39369</b>        | <i>Do. sarmentorum</i>         | <i>Cryptomeria japonica</i> | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković                   | KF729075 | -             | -                | -    |
| <b>CMW 39368</b>        | <i>Do. sarmentorum</i>         | <i>Forsythia europaea</i>   | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković                   | KF729076 | -             | -                | -    |
| <b>CMW 39367</b>        | <i>Do. sarmentorum</i>         | <i>T. plicata</i>           | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković                   | KF729077 | -             | -                | -    |
| <b>BOT 144</b>          | <i>Do. sarmentorum</i>         | <i>T. occidentalis</i>      | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković                   | KF729078 | -             | -                | -    |
| <b>BOT 195</b>          | <i>Do. sarmentorum</i>         | <i>C. atlantica</i>         | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković                   | KF729080 | -             | -                | -    |
| <b>BOT 173</b>          | <i>Do. sarmentorum</i>         | <i>T. occidentalis</i>      | Pirot, Serbia                 | M. Zlatković                   | KF729081 | -             | -                | -    |
| <b>CMW 39365</b>        | <i>Do. sarmentorum</i>         | <i>T. occidentalis</i>      | Pirot, Serbia                 | M. Zlatković                   | KF729079 | -             | -                | -    |
| <b>CMW 45095</b>        | <i>Do. sarmentorum</i>         | <i>Q. rubra</i>             | Belgrade, Serbia              | S. Milanović                   | -        | -             | -                | -    |
| CBS 115038              | <i>Do. sarmentorum</i>         | <i>Malus pumila</i>         | The Netherlands               | A. J. L. Phillips              | AY573206 | AY573223      | EU673101         | -    |
| CBS 128309              | <i>Dothiorella americana</i>   | <i>V. vinifera</i>          | Missouri, USA                 | K. Striegler/<br>G. M. Leavitt | HQ288218 | HQ288262      | HQ288297         | -    |
| CBS 128310              | <i>Do. americana</i>           | <i>V. vinifera</i>          | Missouri, USA                 | K. Striegler/<br>G. M. Leavitt | HQ288219 | HQ288263      | HQ288298         | -    |
| CBS 124716              | <i>Dothiorella sp. 2</i>       | <i>Juglans regia</i>        | Iran                          | J. Abdollahzadeh/<br>A. Javadi | KC898232 | KC898215      | -                | -    |
| CBS 124717              | <i>Dothiorella sp. 2</i>       | <i>J. regia</i>             | Iran                          | J. Abdollahzadeh/<br>A. Javadi | KC898233 | KC898216      | -                | -    |
| CMW 39360               | <i>Dothiorella sp. 2</i>       | <i>Fraxinus excelsior</i>   | Bosnia and Herzegovina        | D. Karadžić                    | KF575012 | KF575052      | KF575108         | -    |
| CMW 39361               | <i>Dothiorella sp. 2</i>       | <i>C. sempervirens</i>      | Podgorica, Montenegro         | M. Zlatković                   | KF729083 | KT253576      | KT253570         | -    |
| CMW 39362               | <i>Dothiorella sp. 2</i>       | <i>Thuja occidentalis</i>   | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković                   | KF575013 | KF575053      | KF575109         | -    |

**Tabela S4.** Nastavak.

| Izolot <sup>a, b</sup> | Identitet                         | Domaćin                    | Lokacija <sup>c, d</sup>      | Kolektor                    | GenBank  |               |                  |         |
|------------------------|-----------------------------------|----------------------------|-------------------------------|-----------------------------|----------|---------------|------------------|---------|
|                        |                                   |                            |                               |                             | ITS      | EF1- $\alpha$ | $\beta$ -tubulin | RPB2    |
| CMW 39363              | <i>Dothiorella</i> sp. 2          | <i>C. lawsoniana</i>       | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković                | KF575014 | KF575054      | KF575110         | -       |
| <b>BOT 177</b>         | <b><i>Dothiorella</i> sp. 2</b>   | <i>S. giganteum</i>        | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković                | KF729082 | -             | -                | -       |
| <b>CMW 39359</b>       | <b><i>Dothiorella</i> sp. 2</b>   | <i>S. giganteum</i>        | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković                | KF729084 | -             | -                | -       |
| MFLUCC13-0497          | <i>Dothiorella</i> sp. 1          | <i>Symphoricarpos</i> sp.  | Italy                         | Erio Camporesi              | KJ742378 | KJ742381      | -                | -       |
| MFLUCC13-0498          | <i>Dothiorella</i> sp. 1          | <i>Symphoricarpos</i> sp.  | Italy                         | Erio Camporesi              | KJ742379 | KJ742382      | -                | -       |
| DAR 78992              | <i>Dothiorella vidmadera</i>      | <i>V. vinifera</i>         | Eden Valley, Australia        | W. M. Pitt/<br>A. Loschiavo | EU768874 | EU768881      | HM800522         | -       |
| DAR 78993              | <i>Do. vidmadera</i>              | <i>V. vinifera</i>         | Loxton, Australia             | W. M. Pitt/<br>A. Loschiavo | EU768876 | EU768882      | HM800523         | -       |
| CBS 115041             | <i>Dothiorella iberica</i>        | <i>Q. ilex</i>             | Aragón, Spain                 | J. Luque                    | AY57320  | AY57322       | EU673096         | -       |
| CBS 113188             | <i>Do. iberica</i>                | <i>Quercus suber</i>       | Andalucia, Spain              | M. E. Sánchez               | AY57319  | EU673278      | EU673097         | -       |
| JL 599                 | <i>Dothiorella parva</i>          | <i>Corylus avelana</i>     | Spain                         | J. Luque                    | EU673314 | EU673281      | EU673099         | -       |
| CBS124720              | <i>Do. parva</i>                  | <i>C. avelana</i>          | Iran, Ardabil                 | J. Abdollahzadeh            | KC89823  | KC89821       | -                | -       |
| CBS 124719             | <i>Dothiorella sempervirentis</i> | <i>C. sempervirens</i>     | Iran, Golestan                | M. A. Aghajani              | KC89823  | KC89822       | -                | -       |
| CBS 124718             | <i>Do. sempervirentis</i>         | <i>C. sempervirens</i>     | Iran, Golestan                | M. A. Aghajani              | KC89823  | KC89821       | -                | -       |
| MUCC 507               | <i>Dothiorella moneti</i>         | <i>Acacia rostellifera</i> | Yalgorup, Australia           | K. M. Taylor                | EF591922 | EF591973      | EF591956         | -       |
| MUCC 505               | <i>Do. moneti</i>                 | <i>A. rostellifera</i>     | Yalgorup, Australia           | K. M. Taylor                | EF591920 | EF591971      | EF591954         | -       |
| <b>BOT 79</b>          | <b><i>N. parvum</i></b>           | <i>C. atlantica</i>        | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković                | KF729038 | KF729368      | KF729328         | KF72928 |
| <b>BOT 6</b>           | <b><i>N. parvum</i></b>           | <i>A. hippocastanum</i>    | Belgrade, Serbia              | I. Milenković               | KF729039 | KF729369      | KF729329         | KF72928 |
| <b>BOT 275</b>         | <b><i>N. parvum</i></b>           | <i>P. laurocerasus</i>     | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković                | KF729040 | KF729370      | KF729330         | KF72928 |
| <b>CMW 39323</b>       | <b><i>N. parvum</i></b>           | <i>C. obtusa</i>           | Kanjiža, Serbia               | N. Keča                     | KF729041 | KF729371      | KF729331         | KF72928 |
| <b>BOT 267</b>         | <b><i>N. parvum</i></b>           | <i>A. hippocastanum</i>    | Obrenovac, Serbia             | D. Karadžić                 | KF729042 | KF729372      | KF729332         | KF72928 |
| <b>CMW 39320</b>       | <b><i>N. parvum</i></b>           | <i>S. sempervirens</i>     | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković                | KF729043 | KF729373      | KF729333         | KF72928 |
| <b>BOT 87</b>          | <b><i>N. parvum</i></b>           | <i>S. giganteum</i>        | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković                | KF729044 | KF729374      | KF729334         | KF72928 |
| <b>CMW 39324</b>       | <b><i>N. parvum</i></b>           | <i>C. pisifera</i>         | Belgrade, Serbia <sup>d</sup> | M. Zlatković                | KF729045 | KF729375      | KF729335         | KF72928 |
| <b>BOT 90</b>          | <b><i>N. parvum</i></b>           | <i>C. lawsoniana</i>       | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković                | KF729046 | KF729376      | KF729336         | KF72928 |
| CMW 9081               | <i>Neofusicoccum parvum</i>       | <i>Populus nigra</i>       | New Zealand                   | G. J. Samuels               | AY23694  | AY23688       | AY236917         | -       |
| CMW 39328              | <i>N. parvum</i>                  | <i>Pittosporum tobira</i>  | Herceg Novi, Montenegro       | M. Zlatković                | KF575017 | KF575041      | KF575113         | KF72931 |
| CMW 39321              | <i>N. parvum</i>                  | <i>Prunus laurocerasus</i> | Budva, Montenegro             | M. Zlatković                | KF575018 | KF575042      | KF575114         | KF72931 |

Tabela S4. Nastavak.

| Izolot <sup>a, b</sup> | Identitet        | Domaćin                    | Lokacija <sup>c, d</sup>      | Kolektor                 | GenBank  |               |                  |          |
|------------------------|------------------|----------------------------|-------------------------------|--------------------------|----------|---------------|------------------|----------|
|                        |                  |                            |                               |                          | ITS      | EF1- $\alpha$ | $\beta$ -tubulin | RPB2     |
| CMW 39326              | <i>N. parvum</i> | <i>Eucalyptus globulus</i> | Herceg Novi, Montenegro       | M. Zlatković             | KF575019 | KF575043      | KF575115         | KF729320 |
| CMW 39325              | <i>N. parvum</i> | <i>A. hippocastanum</i>    | Belgrade, Serbia              | I. Milenković            | KF575021 | KF575045      | KF575117         | KF729322 |
| CMW 39318              | <i>N. parvum</i> | <i>C. lawsoniana</i>       | Belgrade, Serbia              | N. Keča/<br>M. Zlatković | KF575022 | KF575046      | KF575118         | KF729323 |
| <b>BOT 107</b>         | <i>N. parvum</i> | <i>S. giganteum</i>        | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković             | KF729034 | KF729364      | KF729324         | KF729277 |
| <b>BOT 3</b>           | <i>N. parvum</i> | <i>S. giganteum</i>        | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković             | KF729035 | KF729365      | KF729325         | KF729278 |
| <b>BOT 15</b>          | <i>N. parvum</i> | <i>S. giganteum</i>        | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković             | KF729036 | KF729366      | KF729326         | KF729279 |
| <b>BOT 49</b>          | <i>N. parvum</i> | <i>C. lawsoniana</i>       | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković             | KF729037 | KF729367      | KF729327         | KF729280 |
| <b>CMW 39322</b>       | <i>N. parvum</i> | <i>P. abies</i>            | Niš, Serbia                   | M. Zlatković             | KF729047 | KF729377      | KF729337         | KF729290 |
| <b>BOT 43</b>          | <i>N. parvum</i> | <i>C. atlantica</i>        | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković             | KF729048 | KF729378      | KF729338         | KF729291 |
| <b>BOT 82</b>          | <i>N. parvum</i> | <i>S. giganteum</i>        | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković             | KF729049 | KF729379      | KF729339         | KF729292 |
| <b>CMW 39327</b>       | <i>N. parvum</i> | <i>S. giganteum</i>        | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković             | KF729050 | KF729380      | KF729340         | KF729293 |
| <b>BOT 42</b>          | <i>N. parvum</i> | <i>T. occidentalis</i>     | Belgrade, Serbia <sup>d</sup> | M. Zlatković             | KF729051 | KF729381      | KF729341         | KF729294 |
| <b>BOT 59</b>          | <i>N. parvum</i> | <i>S. giganteum</i>        | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković             | KF729052 | KF729382      | KF729342         | KF729295 |
| <b>BOT 136</b>         | <i>N. parvum</i> | <i>C. atlantica</i>        | Herceg Novi, Montenegro       | M. Zlatković             | KF729053 | KF729383      | KF729343         | KF729296 |
| <b>CMW 39319</b>       | <i>N. parvum</i> | <i>T. occidentalis</i>     | Belgrade, Serbia <sup>d</sup> | M. Zlatković             | KF729054 | KF729384      | KF729344         | KF729297 |
| <b>BOT 281</b>         | <i>N. parvum</i> | <i>A. hippocastanum</i>    | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković             | KF729055 | KF729385      | KF729345         | KF729298 |
| <b>BOT 64</b>          | <i>N. parvum</i> | <i>S. giganteum</i>        | Kumane, Serbia                | N. Keča                  | KF729056 | KF729386      | KF729346         | KF729299 |
| <b>BOT 112</b>         | <i>N. parvum</i> | <i>S. giganteum</i>        | Valjevo, Serbia               | N. Keča                  | KF729057 | KF729387      | KF729347         | KF729300 |
| <b>BOT 113</b>         | <i>N. parvum</i> | <i>S. giganteum</i>        | Valjevo, Serbia               | N. Keča                  | KF729058 | KF729388      | KF729348         | KF729301 |
| <b>BOT 214</b>         | <i>N. parvum</i> | <i>S. giganteum</i>        | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković             | KF729059 | KF729389      | KF729349         | KF729302 |
| <b>BOT 17</b>          | <i>N. parvum</i> | <i>S. giganteum</i>        | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković             | KF729060 | KF729390      | KF729350         | KF729303 |
| <b>BOT 16</b>          | <i>N. parvum</i> | <i>S. giganteum</i>        | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković             | KF729062 | KF729392      | KF729352         | KF729305 |
| <b>CMW 39316</b>       | <i>N. parvum</i> | <i>P. halepensis</i>       | Herceg Novi, Montenegro       | M. Zlatković             | KF729061 | KF729391      | KF729351         | KF729304 |
| <b>BOT 160</b>         | <i>N. parvum</i> | <i>S. giganteum</i>        | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković             | KF729063 | KF729393      | KF729353         | KF729306 |
| <b>BOT 26</b>          | <i>N. parvum</i> | <i>A. hippocastanum</i>    | Obrenovac, Serbia             | D. Karadžić              | KF729064 | KF729394      | KF729354         | KF729307 |
| <b>BOT 1</b>           | <i>N. parvum</i> | <i>S. giganteum</i>        | Kumane, Serbia                | N. Keča                  | KF729065 | KF729395      | KF729355         | KF729308 |
| <b>BOT 39</b>          | <i>N. parvum</i> | <i>S. giganteum</i>        | Valjevo, Serbia               | N. Keča                  | KF729066 | KF729396      | KF729356         | KF729309 |
| <b>BOT 27</b>          | <i>N. parvum</i> | <i>S. giganteum</i>        | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković             | KF729067 | KF729397      | KF729357         | KF729310 |
| <b>BOT 131</b>         | <i>N. parvum</i> | <i>P. laurocerasus</i>     | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković             | KF729068 | KF729398      | KF729358         | KF729311 |
| <b>BOT 13</b>          | <i>N. parvum</i> | <i>S. giganteum</i>        | Kumane, Serbia                | N. Keča                  | KF729069 | KF767529      | KF729484         | KF729312 |

Tabela S4. Nastavak.

| Izolot <sup>a, b</sup> | Identitet                                      | Domaćin                             | Lokacija <sup>c, d</sup> | Kolektor        | GenBank  |               |                  |          |
|------------------------|--|-------------------------------------|--------------------------|-----------------|----------|---------------|------------------|----------|
|                        |  |                                     |                          |                 | ITS      | EF1- $\alpha$ | $\beta$ -tubulin | RPB2     |
| <b>BOT 30</b>          | <i>N. parvum</i>                               | <i>S. giganteum</i>                 | Belgrade, Serbia         | M. Zlatković    | KF729070 | KF729399      | KF729359         | KF729313 |
| <b>BOT 8</b>           | <i>N. parvum</i>                               | <i>S. giganteum</i>                 | Kumane, Serbia           | N. Keča         | KF729071 | KF729400      | KF729360         | KF729314 |
| <b>BOT 11</b>          | <i>N. parvum</i>                               | <i>S. giganteum</i>                 | Valjevo, Serbia          | N. Keča         | KF729072 | KF729401      | KF729361         | KF729315 |
| <b>BOT 286</b>         | <i>N. parvum</i>                               | <i>C. lawsoniana</i>                | Belgrade, Serbia         | M. Zlatković    | KF729073 | KF729402      | KF729362         | KF729316 |
| <b>BOT 14</b>          | <i>N. parvum</i>                               | <i>S. giganteum</i>                 | Kumane, Serbia           | N. Keča         | KF729074 | KF729403      | KF729363         | KF729317 |
| <b>CMW 45090</b>       | <i>N. parvum</i>                               | <i>P. nigra</i> var. <i>italica</i> | Vršac, Serbia            | N. Keča         | KT964325 | -             | -                | -        |
| <b>CMW 45093</b>       | <i>N. parvum</i>                               | <i>Q. rubra</i>                     | Pirot, Serbia            | M. Zlatković    | KT964326 | -             | -                | -        |
| <b>BOT 288</b>         | <i>N. parvum</i>                               | <i>A. hippocastanum</i>             | Belgrade, Serbia         | M. Zlatković    | KT964327 | -             | -                | -        |
| <b>BOT 289</b>         | <i>N. parvum</i>                               | <i>A. hippocastanum</i>             | Belgrade, Serbia         | M. Zlatković    | KT964328 | -             | -                | -        |
| <b>BOT 290</b>         | <i>N. parvum</i>                               | <i>A. hippocastanum</i>             | Belgrade, Serbia         | M. Zlatković    | KT964329 | -             | -                | -        |
| <b>BOT 291</b>         | <i>N. parvum</i>                               | <i>A. hippocastanum</i>             | Belgrade, Serbia         | M. Zlatković    | KT964332 | -             | -                | -        |
| <b>BOT 292</b>         | <i>N. parvum</i>                               | <i>A. hippocastanum</i>             | Belgrade, Serbia         | M. Zlatković    | KT964330 | -             | -                | -        |
| <b>BOT 293</b>         | <i>N. parvum</i>                               | <i>A. hippocastanum</i>             | Belgrade, Serbia         | M. Zlatković    | KT964333 | -             | -                | -        |
| <b>BOT 301</b>         | <i>N. parvum</i>                               | <i>C. lawsoniana</i>                | Belgrade, Serbia         | M. Zlatković    | KT964331 | -             | -                | -        |
| CMW 9071               | <i>N. parvum</i>                               | <i>Ribes</i> sp.                    | Australia                | M. J. Wingfield | EU339552 | AY236880      | AY23690          | -        |
| CBS 123639             | <i>Neofusicoccum</i><br><i>kwambonambiense</i> | <i>S. cordatum</i>                  | South Africa             | D. Pavlic       | EU821900 | EU821870      | EU821840         | -        |
| CBS 123641             | <i>N. kwambonambiense</i>                      | <i>S. cordatum</i>                  | South Africa             | D. Pavlic       | EU821919 | EU821889      | EU821859         | -        |
| CMW 14054              | <i>Neofusicoccum cordaticola</i>               | <i>S. cordatum</i>                  | South Africa             | D. Pavlic       | EU821906 | EU821876      | EU821846         | -        |
| CMW 13992              | <i>N. cordaticola</i>                          | <i>S. cordatum</i>                  | South Africa             | D. Pavlic       | EU821898 | EU821868      | EU821838         | -        |
| CBS 117448             | <i>Pseudofusicoccum</i><br><i>stromaticum</i>  | <i>Eucalyptus</i> hybrid            | Venezuela                | S. Mohali       | AY693974 | AY693975      | EU673094         | -        |
| CBS 117449             | <i>P. stromaticum</i>                          | <i>Eucalyptus</i> hybrid            | Venezuela                | S. Mohali       | DQ436935 | DQ436936      | EU673093         | -        |

**Tabela S4.** Kolekcije kultura: CMW: FABI, University of Pretoria, South Africa; CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands; CPC: Collection of Pedro Crous housed at CBS; IRAN: Iranian Fungal Culture Collection, Iranian Research Institute of Plant Protection, Iran; ATCC, American Type Culture Collection; MUCC: Murdoch University Culture Collection; DAR: Plant Pathology Herbarium, Orange Agricultural Institute, DPI, Orange, NSW, Australia; IMI: CABI Genetic Resource Collection Bioscience, Egham, Surrey, United Kingdom; JL: J. Luque, IRTA, Barcelona, Spain; MFLUCC: Mae Fah Luang University Culture Collection, Chiang Rai, Thailand. <sup>a</sup> Izolati sekvencirani u ovom istraživanju su boldovani. Ostali su preuzeti iz Banke Gena. <sup>b</sup> Pristupni brijevi izolata napisani kosim brojevima odnose se na kulture morfološki vezane za tipski materijal. <sup>c</sup> Šumska sastojina, <sup>d</sup> Rasadnik.

### 10.3. Prilozi: Poglavlje 7

**10.3.1. Tabela S5.** Izolati *Diplodia sapinea* i *Neofusicoccum parvum* analizirani u ovom istraživanju.

| Izolot    | Identitet         | Domaćin                       | Lokacija                             | Kolektor     | GenBank Pristupni br. |               |                  |          |      | Haplotip |
|-----------|-------------------|-------------------------------|--------------------------------------|--------------|-----------------------|---------------|------------------|----------|------|----------|
|           |                   |                               |                                      |              | ITS                   | EF1- $\alpha$ | $\beta$ -tubulin | LSU      | RPB2 |          |
| CMW 39341 | <i>D. sapinea</i> | <i>Cedrus deodara</i>         | Podgorica, Montenegro                | M. Zlatković | KF574998              | KF575028      | KF575094         | KF575062 | -    | H1       |
| CMW 39338 | <i>D. sapinea</i> | <i>Cedrus atlantica</i>       | Belgrade, Serbia                     | M. Zlatković | KF574999              | KF575029      | KF575095         | KF575063 | -    | H2       |
| CMW 39346 | <i>D. sapinea</i> | <i>Picea omorika</i>          | Belgrade, Serbia                     | M. Zlatković | KF575000              | KF575030      | KF575096         | KF575064 | -    | H1       |
| CMW 39335 | <i>D. sapinea</i> | <i>Pinus halepensis</i>       | Belgrade, Serbia                     | M. Zlatković | KF729170              | KF729404      | -                | -        | -    | H1       |
| BOT 229   | <i>D. sapinea</i> | <i>Picea pungens</i>          | Belgrade, Serbia                     | M. Zlatković | KF729171              | KF729405      | -                | -        | -    | H1       |
| BOT 33    | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>           | Belgrade, Serbia                     | M. Zlatković | KF729172              | KF729406      | -                | -        | -    | H1       |
| CMW 39330 | <i>D. sapinea</i> | <i>Juniperus horizontalis</i> | Belgrade, Serbia                     | M. Zlatković | KF729173              | KF729407      | -                | -        | -    | H1       |
| BOT 204   | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>           | Belgrade, Serbia                     | M. Zlatković | KF729174              | KF729408      | -                | -        | -    | H1       |
| BOT 157   | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>           | Belgrade, Serbia                     | M. Zlatković | KF729175              | KF729409      | -                | -        | -    | H1       |
| BOT 60    | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>           | Belgrade, Serbia                     | M. Zlatković | KF729176              | KF729410      | -                | -        | -    | H1       |
| CMW 39329 | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>           | Belgrade, Serbia                     | M. Zlatković | KF729177              | KF729411      | -                | -        | -    | H1       |
| BOT 63    | <i>D. sapinea</i> | <i>J. horizontalis</i>        | Belgrade, Serbia                     | M. Zlatković | KF729178              | KF729412      | -                | -        | -    | H1       |
| BOT 169   | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>           | Belgrade, Serbia                     | M. Zlatković | KF729179              | KF729413      | -                | -        | -    | H1       |
| BOT 248   | <i>D. sapinea</i> | <i>P. pungens</i>             | Belgrade, Serbia                     | M. Zlatković | KF729180              | KF729414      | -                | -        | -    | H1       |
| BOT 242   | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>           | Niš, Serbia                          | M. Zlatković | KF729181              | KF729415      | -                | -        | -    | H1       |
| BOT 220   | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>           | Belgrade, Serbia                     | M. Zlatković | KF729182              | KF729416      | -                | -        | -    | H1       |
| BOT 253   | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>           | Nikšić, Montenegro                   | M. Zlatković | KF729183              | KF729417      | -                | -        | -    | H1       |
| BOT 147   | <i>D. sapinea</i> | <i>Pinus nigra</i>            | Deliblato sands, Serbia <sup>1</sup> | D. Karadžić  | KF729184              | KF729418      | -                | -        | -    | H1       |
| BOT 277   | <i>D. sapinea</i> | <i>Pinus sylvestris</i>       | Belgrade, Serbia                     | M. Zlatković | KF729185              | KF729419      | -                | -        | -    | H1       |
| BOT 268   | <i>D. sapinea</i> | <i>P. sylvestris</i>          | Bar, Montenegro                      | M. Zlatković | KF729186              | KF729420      | -                | -        | -    | H1       |
| BOT 100   | <i>D. sapinea</i> | <i>P. nigra</i>               | Belgrade, Serbia                     | M. Zlatković | KF729187              | KF729421      | -                | -        | -    | H1       |
| CMW 39345 | <i>D. sapinea</i> | <i>Pinus pinea</i>            | Budva, Montenegro                    | M. Zlatković | KF729188              | KF729422      | -                | -        | -    | H1       |
| BOT 212   | <i>D. sapinea</i> | <i>Abies concolor</i>         | Belgrade, Serbia                     | M. Zlatković | KF729189              | KF729423      | -                | -        | -    | H1       |
| CMW 39344 | <i>D. sapinea</i> | <i>P. pungens</i>             | Niš, Serbia                          | M. Zlatković | KF729190              | KF729424      | -                | -        | -    | H1       |
| BOT 251   | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>           | Nikšić, Montenegro                   | M. Zlatković | KF729191              | KF729425      | -                | -        | -    | H1       |
| BOT 285   | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>           | Belgrade, Serbia                     | M. Zlatković | KF729192              | KF729426      | -                | -        | -    | H1       |
| BOT 196   | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>           | Niš, Serbia                          | M. Zlatković | KF729193              | KF729427      | -                | -        | -    | H1       |
| BOT 266   | <i>D. sapinea</i> | <i>P. nigra</i>               | Belgrade, Serbia                     | M. Zlatković | KF729194              | KF729428      | -                | -        | -    | H1       |



**Tabela S5.** Nastavak.

| Izolat    | Identitet         | Domaćin               | Lokacija                      | Kolektor     | GenBank Pristupni br. |               |                  |     |      | Haplotip |
|-----------|-------------------|-----------------------|-------------------------------|--------------|-----------------------|---------------|------------------|-----|------|----------|
|           |                   |                       |                               |              | ITS                   | EF1- $\alpha$ | $\beta$ -tubulin | LSU | RPB2 |          |
| CMW 39343 | <i>D. sapinea</i> | <i>P. sylvestris</i>  | Niš, Serbia                   | M. Zlatković | KF729195              | KF729429      | -                | -   | -    | H1       |
| BOT 222   | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>   | Bar, Montenegro               | M. Zlatković | KF729196              | KF729430      | -                | -   | -    | H1       |
| BOT 115   | <i>D. sapinea</i> | <i>P. sylvestris</i>  | Niš, Serbia                   | M. Zlatković | KF729197              | KF729431      | -                | -   | -    | H1       |
| CMW 44981 | <i>D. sapinea</i> | <i>P. omorika</i>     | Mt. Tara, Serbia <sup>2</sup> | D. Karadžić  | KF729198              | KF729432      | -                | -   | -    | H1       |
| CMW 39342 | <i>D. sapinea</i> | <i>A. concolor</i>    | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković | KF729199              | KF729433      | -                | -   | -    | H1       |
| CMW 39340 | <i>D. sapinea</i> | <i>P. omorika</i>     | Mt. Tara, Serbia <sup>2</sup> | D. Karadžić  | KF729200              | KF729434      | -                | -   | -    | H1       |
| BOT 228   | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>   | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković | KF729201              | KF729435      | -                | -   | -    | H1       |
| BOT 10    | <i>D. sapinea</i> | <i>P. nigra</i>       | Mt. Goč, Serbia <sup>2</sup>  | D. Karadžić  | KF729202              | KF729436      | -                | -   | -    | H1       |
| BOT 101   | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>   | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković | KF729203              | KF729437      | -                | -   | -    | H1       |
| BOT 153   | <i>D. sapinea</i> | <i>P. nigra</i>       | Mt. Goč., Serbia <sup>2</sup> | D. Karadžić  | KF729204              | KF729438      | -                | -   | -    | H1       |
| CMW 39339 | <i>D. sapinea</i> | <i>Pinus pinaster</i> | Miločer, Montenegro           | M. Zlatković | KF729205              | KF729439      | -                | -   | -    | H1       |
| BOT 104   | <i>D. sapinea</i> | <i>P. nigra</i>       | Niš, Serbia                   | M. Zlatković | KF729206              | KF729440      | -                | -   | -    | H1       |
| BOT 97    | <i>D. sapinea</i> | <i>P. sylvestris</i>  | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković | KF729207              | KF729441      | -                | -   | -    | H1       |
| BOT 119   | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>   | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković | KF729208              | KF729442      | -                | -   | -    | H1       |
| BOT 137   | <i>D. sapinea</i> | <i>P. nigra</i>       | Mt. Goč, Serbia <sup>2</sup>  | D. Karadžić  | KF729209              | KF729443      | -                | -   | -    | H1       |
| BOT 133   | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>   | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković | KF729210              | KF729444      | -                | -   | -    | H1       |
| BOT 201   | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>   | Bar, Montenegro               | M. Zlatković | KF729211              | KF729445      | -                | -   | -    | H1       |
| BOT 130   | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>   | Bar, Montenegro               | M. Zlatković | KF729212              | KF729446      | -                | -   | -    | H1       |
| BOT 184   | <i>D. sapinea</i> | <i>P. sylvestris</i>  | Bar, Montenegro               | M. Zlatković | KF729213              | KF729447      | -                | -   | -    | H1       |
| BOT 148   | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>   | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković | KF729214              | KF729478      | -                | -   | -    | H1       |
| BOT 241   | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>   | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković | KF729215              | KF729449      | -                | -   | -    | H1       |
| BOT 198   | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>   | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković | KF729216              | KF729450      | -                | -   | -    | H1       |
| BOT 207   | <i>D. sapinea</i> | <i>P. halepensis</i>  | Herceg Novi,<br>Monenegro     | M. Zlatković | KF729217              | KF729451      | -                | -   | -    | H1       |
| BOT 194   | <i>D. sapinea</i> | <i>P. sylvestris</i>  | Bar, Montenegro               | M. Zlatković | KF729218              | KF729452      | -                | -   | -    | H1       |
| BOT 199   | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>   | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković | KF729219              | KF729453      | -                | -   | -    | H1       |
| BOT 183   | <i>D. sapinea</i> | <i>P. nigra</i>       | Niš, Serbia                   | M. Zlatković | KF729220              | KF729454      | -                | -   | -    | H1       |
| BOT 230   | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>   | Bar, Montenegro               | M. Zlatković | KF729221              | KF729455      | -                | -   | -    | H1       |
| BOT 162   | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>   | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković | KF729222              | KF729456      | -                | -   | -    | H1       |
| BOT 182   | <i>D. sapinea</i> | <i>P. nigra</i>       | Mt. Goč, Serbia <sup>2</sup>  | D. Karadžić  | KF729223              | KF729457      | -                | -   | -    | H1       |

**Tabela S5.** Nastavak.

| Izolot    | Identitet         | Domaćin                         | Lokacija                        | Kolektor     | GenBank Pristupni br. |               |                  |     |      | Haplotip |
|-----------|-------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------|-----------------------|---------------|------------------|-----|------|----------|
|           |                   |                                 |                                 |              | ITS                   | EF1- $\alpha$ | $\beta$ -tubulin | LSU | RPB2 |          |
| BOT 211   | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>             | Belgrade, Serbia                | M. Zlatković | KF729224              | KF729458      | -                | -   | -    | H1       |
| BOT 138   | <i>D. sapinea</i> | <i>P. pungens</i>               | Belgrade, Serbia                | M. Zlatković | KF729225              | KF729459      | -                | -   | -    | H1       |
| BOT 171   | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>             | Podgorica, Montenegro           | M. Zlatković | KF729226              | KF729440      | -                | -   | -    | H1       |
| BOT 128   | <i>D. sapinea</i> | <i>P. sylvestris</i>            | Belgrade, Serbia                | M. Zlatković | KF729227              | KF729461      | -                | -   | -    | H1       |
| BOT 126   | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>             | Belgrade, Serbia                | M. Zlatković | KF729228              | KF729462      | -                | -   | -    | H1       |
| BOT 200   | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>             | Niš, Serbia                     | M. Zlatković | KF729229              | KF729463      | -                | -   | -    | H1       |
| BOT 174   | <i>D. sapinea</i> | <i>P. sylvestris</i>            | Budva, Montenegro               | M. Zlatković | KF729230              | KF729464      | -                | -   | -    | H1       |
| BOT 179   | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>             | Belgrade, Serbia                | M. Zlatković | KF729231              | KF729465      | -                | -   | -    | H1       |
| BOT 203   | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>             | Belgrade, Serbia                | M. Zlatković | KF729232              | KF729466      | -                | -   | -    | H1       |
| CMW 39334 | <i>D. sapinea</i> | <i>Pseudotsuga menziesii</i>    | Belgrade, Serbia                | M. Zlatković | KF729233              | KF729467      | -                | -   | -    | H1       |
| BOT 20    | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>             | Belgrade, Serbia                | M. Zlatković | KF729234              | KF729468      | -                | -   | -    | H1       |
| CMW 39332 | <i>D. sapinea</i> | <i>P. nigra</i>                 | Piroć, Serbia                   | M. Zlatković | KF729235              | KF729469      | -                | -   | -    | H1       |
| CMW 39331 | <i>D. sapinea</i> | <i>Cedrus libani</i>            | Podgorica, Montenegro           | M. Zlatković | KF729236              | KF729470      | -                | -   | -    | H1       |
| BOT 205   | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>             | Bar, Montenegro                 | M. Zlatković | KF729237              | KF729471      | -                | -   | -    | H1       |
| BOT 280   | <i>D. sapinea</i> | <i>Chamaecyparis lawsoniana</i> | Herceg Novi, Monenegro          | M. Zlatković | KF729238              | KF729472      | -                | -   | -    | H5       |
| CMW 39333 | <i>D. sapinea</i> | <i>C. lawsoniana</i>            | Herceg Novi, Montenegro         | M. Zlatković | KF729239              | KF729473      | -                | -   | -    | H5       |
| BOT 150   | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>             | Belgrade, Serbia                | M. Zlatković | KF729240              | KF729474      | -                | -   | -    | H1       |
| BOT 223   | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>             | Bar, Montenegro                 | M. Zlatković | KF729241              | KF729475      | -                | -   | -    | H1       |
| BOT 170   | <i>D. sapinea</i> | <i>P. omorika</i>               | Belgrade, Serbia                | M. Zlatković | KF729242              | KF729476      | -                | -   | -    | H2       |
| BOT 152   | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>             | Belgrade, Serbia                | M. Zlatković | KF729243              | KF729477      | -                | -   | -    | H3       |
| BOT 237   | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>             | Belgrade, Serbia                | M. Zlatković | KF729244              | KF729478      | -                | -   | -    | H2       |
| BOT 227   | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>             | Belgrade, Serbia                | M. Zlatković | KF729245              | KF729479      | -                | -   | -    | H2       |
| CMW 39337 | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>             | Bar, Montenegro                 | M. Zlatković | KF729246              | KF729480      | -                | -   | -    | H2       |
| CMW 39336 | <i>D. sapinea</i> | <i>Fagus sylvatica</i>          | Mt. Rudnik, Serbia <sup>2</sup> | N. Keća      | KF729247              | KF729481      | -                | -   | -    | H2       |
| BOT 245   | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>             | Nikšić, Montenegro              | M. Zlatković | KF729248              | KF729482      | -                | -   | -    | H4       |
| BOT 246   | <i>D. sapinea</i> | <i>C. atlantica</i>             | Belgrade, Serbia                | M. Zlatković | KF729249              | KF729483      | -                | -   | -    | H2       |
| CMW 39347 | <i>D. sapinea</i> | <i>Pinus radiata</i>            | Mt. Athos, Greece <sup>1</sup>  | D. Karadžić  | KT749856              | KT749858      | -                | -   | -    | H1       |
| BOT 239   | <i>D. sapinea</i> | <i>P. radiata</i>               | Mt. Athos, Greece <sup>1</sup>  | D. Karadžić  | KT749857              | KT749859      | -                | -   | -    | H1       |

**Tabela S5.** Nastavak.

| Izolat    | Identitet        | Domaćin                         | Lokacija                      | Kolektor                 | GenBank Pristupni br. |               |                  |          |          | Haplotip |
|-----------|------------------|---------------------------------|-------------------------------|--------------------------|-----------------------|---------------|------------------|----------|----------|----------|
|           |                  |                                 |                               |                          | ITS                   | EF1- $\alpha$ | $\beta$ -tubulin | LSU      | RPB2     |          |
| CMW 39321 | <i>N. parvum</i> | <i>Prunus laurocerasus</i>      | Budva, Montenegro             | M. Zlatković             | KF575018              | KF575042      | KF575114         | KF575081 | KF729319 | H3       |
| CMW 39328 | <i>N. parvum</i> | <i>Pittosporum tobira</i>       | Herceg Novi, Monenegro        | M. Zlatković             | KF575017              | KF575041      | KF575113         | KF575080 | KF729318 | H5       |
| CMW 39321 | <i>N. parvum</i> | <i>Prunus laurocerasus</i>      | Budva, Montenegro             | M. Zlatković             | KF575018              | KF575042      | KF575114         | KF575081 | KF729319 | H3       |
| CMW 39326 | <i>N. parvum</i> | <i>Eucalyptus globulus</i>      | Herceg Novi, Montenegro       | M. Zlatković             | KF575019              | KF575043      | KF575115         | KF575082 | KF729320 | H4       |
| CMW 39317 | <i>N. parvum</i> | <i>E. globulus</i>              | Bar, Montenegro               | M. Zlatković             | KF575020              | KF575044      | KF575116         | KF575083 | KF729321 | H1       |
| CMW 39325 | <i>N. parvum</i> | <i>Aesculus hippocastanum</i>   | Belgrade, Serbia              | I. Milenković            | KF575021              | KF575045      | KF575117         | KF575084 | KF729322 | H1       |
| CMW 39318 | <i>N. parvum</i> | <i>C. lawsoniana</i>            | Belgrade, Serbia              | N. Keča/<br>M. Zlatković | KF575022              | KF575046      | KF575118         | KF575085 | KF729323 | H1       |
| BOT 107   | <i>N. parvum</i> | <i>Sequoiadendron giganteum</i> | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković             | KF729034              | KF729364      | KF729324         | -        | KF729277 | H1       |
| BOT 3     | <i>N. parvum</i> | <i>S. giganteum</i>             | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković             | KF729035              | KF729365      | KF729325         | -        | KF729278 | H1       |
| BOT 15    | <i>N. parvum</i> | <i>S. giganteum</i>             | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković             | KF729036              | KF729366      | KF729326         | -        | KF729279 | H1       |
| BOT 49    | <i>N. parvum</i> | <i>C. lawsoniana</i>            | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković             | KF729037              | KF729367      | KF729327         | -        | KF729280 | H1       |
| BOT 79    | <i>N. parvum</i> | <i>C. atlantica</i>             | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković             | KF729038              | KF729368      | KF729328         | -        | KF729281 | H1       |
| BOT 6     | <i>N. parvum</i> | <i>A. hippocastanum</i>         | Belgrade, Serbia              | I. Milenković            | KF729039              | KF729369      | KF729329         | -        | KF729282 | H1       |
| BOT 275   | <i>N. parvum</i> | <i>P. laurocerasus</i>          | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković             | KF729040              | KF729370      | KF729330         | -        | KF729283 | H1       |
| CMW 39323 | <i>N. parvum</i> | <i>Chamaecyparis obtusa</i>     | Kanjiža, Serbia               | N. Keča                  | KF729041              | KF729371      | KF729331         | -        | KF729284 | H1       |
| BOT 267   | <i>N. parvum</i> | <i>A. hippocastanum</i>         | Obrenovac, Serbia             | D. Karadžić              | KF729042              | KF729372      | KF729332         | -        | KF729285 | H1       |
| CMW 39320 | <i>N. parvum</i> | <i>Sequoia sempervirens</i>     | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković             | KF729043              | KF729373      | KF729333         | -        | KF729286 | H1       |
| BOT 87    | <i>N. parvum</i> | <i>S. giganteum</i>             | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković             | KF729044              | KF729374      | KF729334         | -        | KF729287 | H1       |
| CMW 39324 | <i>N. parvum</i> | <i>Chamaecyparis pisifera</i>   | Belgrade, Serbia <sup>3</sup> | M. Zlatković             | KF729045              | KF729375      | KF729335         | -        | KF729288 | H1       |
| BOT 90    | <i>N. parvum</i> | <i>C. lawsoniana</i>            | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković             | KF729046              | KF729376      | KF729336         | -        | KF729289 | H1       |
| CMW 39322 | <i>N. parvum</i> | <i>Picea abies</i>              | Niš, Serbia                   | M. Zlatković             | KF729047              | KF729377      | KF729337         | -        | KF729290 | H1       |
| BOT 43    | <i>N. parvum</i> | <i>C. atlantica</i>             | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković             | KF729048              | KF729378      | KF729338         | -        | KF729291 | H1       |
| BOT 82    | <i>N. parvum</i> | <i>S. giganteum</i>             | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković             | KF729049              | KF729379      | KF729339         | -        | KF729292 | H1       |
| CMW 39327 | <i>N. parvum</i> | <i>S. giganteum</i>             | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković             | KF729050              | KF729380      | KF729340         | -        | KF729293 | H1       |
| BOT 42    | <i>N. parvum</i> | <i>Thuja occidentalis</i>       | Belgrade, Serbia <sup>3</sup> | M. Zlatković             | KF729051              | KF729381      | KF729341         | -        | KF729294 | H1       |

**Tabela S5.** Nastavak.

| Izolot           | Identitet        | Domaćin                                     | Lokacija                      | Kolektor     | GenBank Pristupni br. |               |                  |     |          | Haplotip |
|------------------|------------------|---|-------------------------------|--------------|-----------------------|---------------|------------------|-----|----------|----------|
|                  |                  |   |                               |              | ITS                   | EF1- $\alpha$ | $\beta$ -tubulin | LSU | RPB2     |          |
| <b>BOT 59</b>    | <i>N. parvum</i> | <i>S. giganteum</i>                         | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković | KF729052              | KF729382      | KF729342         | -   | KF729295 | H1       |
| <b>CMW 39319</b> | <i>N. parvum</i> | <i>T. occidentalis</i>                      | Belgrade, Serbia <sup>3</sup> | M. Zlatković | KF729054              | KF729384      | KF729344         | -   | KF729297 | H1       |
| <b>BOT 281</b>   | <i>N. parvum</i> | <i>A. hippocastanum</i>                     | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković | KF729055              | KF729385      | KF729345         | -   | KF729298 | H1       |
| <b>BOT 136</b>   | <i>N. parvum</i> | <i>C. atlantica</i>                         | Herceg Novi,<br>Montenegro    | M. Zlatković | KF729053              | KF729383      | KF729343         | -   | KF729296 | H2       |
| <b>BOT 64</b>    | <i>N. parvum</i> | <i>S. giganteum</i>                         | Kumane, Serbia                | N. Keča      | KF729056              | KF729386      | KF729346         | -   | KF729299 | H1       |
| <b>BOT 112</b>   | <i>N. parvum</i> | <i>S. giganteum</i>                         | Valjevo, Serbia               | N. Keča      | KF729057              | KF729387      | KF729347         | -   | KF729300 | H1       |
| <b>BOT 113</b>   | <i>N. parvum</i> | <i>S. giganteum</i>                         | Valjevo, Serbia               | N. Keča      | KF729058              | KF729388      | KF729348         | -   | KF729301 | H1       |
| <b>BOT 214</b>   | <i>N. parvum</i> | <i>S. giganteum</i>                         | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković | KF729059              | KF729389      | KF729349         | -   | KF729302 | H1       |
| <b>BOT 17</b>    | <i>N. parvum</i> | <i>S. giganteum</i>                         | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković | KF729060              | KF729390      | KF729350         | -   | KF729303 | H1       |
| <b>BOT 16</b>    | <i>N. parvum</i> | <i>S. giganteum</i>                         | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković | KF729062              | KF729392      | KF729352         | -   | KF729305 | H1       |
| <b>CMW 39316</b> | <i>N. parvum</i> | <i>P. halepensis</i>                        | Herceg Novi,<br>Montenegro    | M. Zlatković | KF729061              | KF729391      | KF729351         | -   | KF729304 | H1       |
| <b>BOT 160</b>   | <i>N. parvum</i> | <i>S. giganteum</i>                         | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković | KF729063              | KF729393      | KF729353         | -   | KF729306 | H1       |
| <b>BOT 26</b>    | <i>N. parvum</i> | <i>A. hippocastanum</i>                     | Obrenovac, Serbia             | D. Karadžić  | KF729064              | KF729394      | KF729354         | -   | KF729307 | H1       |
| <b>BOT 1</b>     | <i>N. parvum</i> | <i>S. giganteum</i>                         | Kumane, Serbia                | N. Keča      | KF729065              | KF729395      | KF729355         | -   | KF729308 | H1       |
| <b>BOT 39</b>    | <i>N. parvum</i> | <i>S. giganteum</i>                         | Valjevo, Serbia               | N. Keča      | KF729066              | KF729396      | KF729356         | -   | KF729309 | H1       |
| <b>BOT 27</b>    | <i>N. parvum</i> | <i>S. giganteum</i>                         | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković | KF729067              | KF729397      | KF729357         | -   | KF729310 | H1       |
| <b>BOT 131</b>   | <i>N. parvum</i> | <i>P. laurocerasus</i>                      | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković | KF729068              | KF729398      | KF729358         | -   | KF729311 | H1       |
| <b>BOT 30</b>    | <i>N. parvum</i> | <i>S. giganteum</i>                         | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković | KF729070              | KF729399      | KF729359         | -   | KF729313 | H1       |
| <b>BOT 8</b>     | <i>N. parvum</i> | <i>S. giganteum</i>                         | Kumane, Serbia                | N. Keča      | KF729071              | KF729400      | KF729360         | -   | KF729314 | H1       |
| <b>BOT 11</b>    | <i>N. parvum</i> | <i>S. giganteum</i>                         | Valjevo, Serbia               | N. Keča      | KF729072              | KF729401      | KF729361         | -   | KF729315 | H1       |
| <b>BOT 286</b>   | <i>N. parvum</i> | <i>C. lawsoniana</i>                        | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković | KF729073              | KF729402      | KF729362         | -   | KF729316 | H1       |
| <b>BOT 14</b>    | <i>N. parvum</i> | <i>S. giganteum</i>                         | Kumane, Serbia                | N. Keča      | KF729074              | KF729403      | KF729363         | -   | KF729317 | H1       |
| <b>BOT 13</b>    | <i>N. parvum</i> | <i>S. giganteum</i>                         | Kumane, Serbia                | N. Keča      | KF729069              | KF767529      | KF729484         | -   | KF729312 | H1       |
| <b>CMW 45090</b> | <i>N. parvum</i> | <i>Populus nigra</i><br>var. <i>italica</i> | Vršac, Serbia                 | N. Keča      | KT964325              | -             | -                | -   | -        | H1       |
| <b>CMW 45093</b> | <i>N. parvum</i> | <i>Q. rubra</i>                             | Belgrade, Serbia              | S. Milanović | KT964326              | -             | -                | -   | -        | H1       |
| <b>BOT 288</b>   | <i>N. parvum</i> | <i>A. hippocastanum</i>                     | Belgrade, Serbia              | M. Zlatković | KT964327              | -             | -                | -   | -        | H1       |

**Tabela S5. Nastavak.**

| Izolat         | Identitet        | Domaćin                 | Lokacija         | Kolektor     | GenBank Pristupni br. |               |                  |     |      | Haplotip |
|----------------|------------------|-------------------------|------------------|--------------|-----------------------|---------------|------------------|-----|------|----------|
|                |                  |                         |                  |              | ITS                   | EF1- $\alpha$ | $\beta$ -tubulin | LSU | RPB2 |          |
| <b>BOT 289</b> | <i>N. parvum</i> | <i>A. hippocastanum</i> | Belgrade, Serbia | M. Zlatković | KT964328              | -             | -                | -   | -    | H1       |
| <b>BOT 290</b> | <i>N. parvum</i> | <i>A. hippocastanum</i> | Belgrade, Serbia | M. Zlatković | KT964329              | -             | -                | -   | -    | H1       |
| <b>BOT 291</b> | <i>N. parvum</i> | <i>A. hippocastanum</i> | Belgrade, Serbia | M. Zlatković | KT964332              | -             | -                | -   | -    | H1       |
| <b>BOT 292</b> | <i>N. parvum</i> | <i>A. hippocastanum</i> | Belgrade, Serbia | M. Zlatković | KT964330              | -             | -                | -   | -    | H1       |
| <b>BOT 293</b> | <i>N. parvum</i> | <i>A. hippocastanum</i> | Belgrade, Serbia | M. Zlatković | KT964333              | -             | -                | -   | -    | H1       |
| <b>BOT 301</b> | <i>N. parvum</i> | <i>C. lawsoniana</i>    | Belgrade, Serbia | M. Zlatković | KT964331              | -             | -                | -   | -    | H1       |

Kolekcije kultura: CMW: FABI, University of Pretoria, South Africa. <sup>1</sup> Plantaža bora. <sup>2</sup> Šumska sastojina. <sup>3</sup> Rasadnik.

**10.3.2. Tabela S6.** Preklapanje multilokusnih genotipova (MLG) koji se odnose na različite domačine *Neofusicoccum parvum* i *Diplodia sapinea*.

| <i>N. parvum</i>                | Ng | Ni | Ns | N <sub>h</sub> | <i>D. sapinea</i>             | Ng | Ni | Ns | N <sub>h</sub> | Statistička značajnost |                |
|---------------------------------|----|----|----|----------------|-------------------------------|----|----|----|----------------|------------------------|----------------|
| Domaćin                         |    |    |    |                | Domaćin                       |    |    |    |                |                        |                |
| <i>Chamaecyparis lawsoniana</i> | 1  | 4  | 1  | 2              | <i>C. lawsoniana</i>          | 1  | 2  | 1  | 5              | A <sup>1</sup>         | B <sup>2</sup> |
| <i>Cedrus atlantica</i>         | 2  | 3  | 1  | 2              | <i>C. atlantica</i>           | 7  | 42 | 7  | 15             | B                      | A              |
| <i>Sequoiadendron giganteum</i> | 1  | 21 | 1  | 2              | <i>Abies concolor</i>         | 1  | 2  | 1  | 5              | A                      | B              |
| <i>Thuja occidentalis</i>       | 1  | 2  | 1  | 2              | <i>P. halepensis</i>          | 2  | 2  | 2  | 5              | A                      | B              |
| <i>Pinus halepensis</i>         | 1  | 1  | 1  | 1              | <i>Juniperus horizontalis</i> | 1  | 2  | 1  | 5              | A                      | B              |
| <i>Sequoia sempervirens</i>     | 1  | 1  | 1  | 2              | <i>P. nigra</i>               | 3  | 10 | 3  | 5              | A                      | B              |
| <i>C. pisifera</i>              | 1  | 1  | 1  | 2              | <i>P. sylvestris</i>          | 3  | 9  | 3  | 6              | A                      | B              |
| <i>C. obtusa</i>                | 1  | 1  | 1  | 2              | <i>C. deodara</i>             | 1  | 1  | 1  | 2              | A                      | C              |
| <i>Picea abies</i>              | 1  | 1  | 1  | 2              | <i>C. libani</i>              | 1  | 1  | 1  | 5              | A                      | B              |
| <i>Aesculus hippocastanum</i>   | 1  | 5  | 1  | 2              | <i>P. pungens</i>             | 3  | 4  | 3  | 6              | A                      | B              |
| <i>Prunus laurocerasus</i>      | 2  | 3  | 1  | 2              | <i>P. omorika</i>             | 2  | 4  | 2  | 6              | A                      | B              |
| <i>Pittosporum tobira</i>       | 1  | 1  | 0  | 0              | <i>P. radiata</i>             | 1  | 2  | 1  | 2              | A                      | C              |
| <i>Eucalyptus globulus</i>      | 2  | 2  | 1  | 1              | <i>P. pinea</i>               | 1  | 1  | 1  | 5              | A                      | B              |
|                                 |    |    |    |                | <i>P. pinaster</i>            | 1  | 1  | 1  | 2              | A                      | C              |
|                                 |    |    |    |                | <i>Fagus sylvatica</i>        | 1  | 1  | 1  | 2              | A                      | C              |
|                                 |    |    |    |                | <i>Pseudotsuga menziesii</i>  | 1  | 1  | 1  | 1              | A                      | C              |
| Urbane sredine                  | 6  | 43 | 1  |                | Urbane sredine                | 7  | 75 | 3  |                | A                      |                |
| Rasadnici                       | 1  | 3  | 1  |                | Planataže bora                | 2  | 3  | 2  |                | A                      |                |
|                                 |    |    |    |                | Šumske satojine               | 2  | 7  | 2  |                | A                      |                |

Ng-broj MLG, Ni-broj izolata, Ns-broj MLG deljen sa ostalim domačinima /sredinama, N<sub>h</sub>- broj ostalih domačina koji imaju iste MLG.<sup>1</sup> Domaćini sa istim slovom se nisu značajno razlikovali po broju MLG deljenim sa ostalim domačinima pri vrednosti verovatnoće od 0.05 koristeći LSD test.<sup>2</sup> Domaćini sa istim slovom nisu se značajno razlikovali u pogledu broja ostalih domačina koji imaju isti MLG pri vrednosti verovatnoće od 0.05 koisteći LSD test.

**10.3.3. Tabela S7.** Izolati *Diplodia sapinea* i *Neofusicoccum parvum* preuzeti iz Banke Gena i korišćeni za konstrukciju haploidnih mreža.

| Isolat     | Identitet        | Domaćin                     | Lokacija           | ITS      | GenBank       |                  |
|------------|------------------|-----------------------------|--------------------|----------|---------------|------------------|
|            |                  |                             |                    |          | EF1- $\alpha$ | $\beta$ -tubulin |
| UCR 1566   | <i>N. parvum</i> | <i>Ficus microcarpa</i>     | USA,<br>California | JN543669 | –             | JQ080552         |
| PD 17      | <i>N. parvum</i> | <i>Prunus dulcis</i>        | USA,<br>California | GU251143 | GU251275      | GU251803         |
| 1L 83      | <i>N. parvum</i> | <i>Juglans regia</i>        | USA,<br>California | KF778854 | KF779044      | KF778949         |
| CDFa B139  | <i>N. parvum</i> | <i>Vaccinium corymbosum</i> | USA,<br>California | KJ126850 | KJ126847      | –                |
| PD 106     | <i>N. parvum</i> | <i>Prunus dulcis</i>        | USA,<br>California | GU251139 | GU251271      | GU251799         |
| PD 39      | <i>N. parvum</i> | <i>Prunus dulcis</i>        | USA,<br>California | GU251144 | GU251276      | GU251804         |
| UCR 735    | <i>N. parvum</i> | <i>Prunus americana</i>     | USA,<br>California | HQ529766 | –             | HQ529735         |
| UCR 295    | <i>N. parvum</i> | <i>P. americana</i>         | USA,<br>California | HQ529765 | –             | HQ529734         |
| CMW 9081   | <i>N. parvum</i> | <i>Populus nigra</i>        | New Zealand        | AY236943 | AY236888      | AY236917         |
| CMW 9077   | <i>N. parvum</i> | <i>Actinidia deliciosa</i>  | New Zealand        | AY236939 | AY236884      | AY236913         |
| CMW 994    | <i>N. parvum</i> | <i>Malus sylvestris</i>     | New Zealand        | AF243395 | AY236883      | AY236912         |
| CMM 1845   | <i>N. parvum</i> | <i>Mangifera indica</i>     | Brasil             | KC507814 | KC507811      | KC507808         |
| CMM 1291   | <i>N. parvum</i> | <i>M. indica</i>            | Brasil             | JX513633 | JX513613      | KC794029         |
| N 46       | <i>N. parvum</i> | <i>Psidium guajava</i>      | Brasil             | KC621070 | KM349776      | KC621058         |
| CMM 3944   | <i>N. parvum</i> | <i>M. indica</i>            | Brasil             | JX513636 | JX513616      | KC794028         |
| BV 23      | <i>N. parvum</i> | <i>Vitis vinifera</i>       | Brasil             | JX521862 | –             | –                |
| CMM 1846   | <i>N. parvum</i> | <i>M. indica</i>            | Brasil             | KC507812 | KC507809      | KC507806         |
| PD 62      | <i>N. parvum</i> | <i>Pistacia vera</i>        | Greece             | GU251133 | GU251265      | GU251793         |
| 2E 29      | <i>N. parvum</i> | <i>P. vera</i>              | Greece             | KF955752 | KF955851      | KF955950         |
| CMW 1130   | <i>N. parvum</i> | <i>Sequoiadendron</i>       | South Africa       | AY236945 | AY236890      | AY236919         |
| CMW 26714  | <i>N. parvum</i> | <i>Terminalia catappa</i>   | South Africa       | FJ900610 | FJ900656      | FJ900637         |
| CMW 10122  | <i>N. parvum</i> | <i>Eucalyptus grandis</i>   | South Africa       | AF283681 | AY236882      | AY236911         |
| PD 251     | <i>N. parvum</i> | <i>Eucalyptus</i> sp.       | South Africa       | GU251124 | GU251256      | GU251784         |
| CPC 23297  | <i>N. parvum</i> | <i>M. indica</i>            | South Africa       | KJ193657 | KJ193701      | –                |
| A 4        | <i>N. parvum</i> | –                           | Peru               | FJ528596 | FJ528597      | –                |
| SCCDJF 01S | <i>N. parvum</i> | <i>V. vinifera</i>          | China              | JX275796 | JX462299      | JX462272         |
| AH-3-1-01s | <i>N. parvum</i> | <i>V. vinifera</i>          | China              | –        | JX462283      | JX462257         |
| R1         | <i>N. parvum</i> | <i>Rhododendron decorum</i> | China              | KJ657709 | –             | –                |
| CMW 27135  | <i>N. parvum</i> | <i>Eucalyptus dunnii</i>    | China              | HQ332205 | HQ332221      | –                |
| MPT 1      | <i>N. parvum</i> | <i>Vitis heyneana</i>       | China              | KJ599627 | KM921768      | –                |
| SDAU 08-55 | <i>N. parvum</i> | <i>Populus</i> sp.          | China              | FJ214103 | FJ238524      | GU997687         |
| SDAU 07-16 | <i>N. parvum</i> | <i>Populus</i> sp.          | China              | GU997688 | FJ238526      | FJ238525         |
| NF-37      | <i>N. parvum</i> | <i>M. indica</i>            | Italy              | N814442  | JN814485      | –                |
| BA 20      | <i>N. parvum</i> | <i>Quercus robur</i>        | Italy              | HQ893535 | HQ893537      | –                |
| NF-10      | <i>N. parvum</i> | <i>M. indica</i>            | Italy              | JN814454 | JN814497      | –                |
| PVFnP 28   | <i>N. parvum</i> | <i>V. vinifera</i>          | Italy              | GU188007 | GU188037      | –                |
| NF-62      | <i>N. parvum</i> | <i>M. indica</i>            | Italy              | JN814450 | JN814493      | –                |
| NF-82      | <i>N. parvum</i> | <i>M. indica</i>            | Italy              | JN814456 | JN814499      | –                |
| F 49       | <i>N. parvum</i> | <i>Quercus suber</i>        | Italy              | DQ487157 | DQ487158      | –                |

**Tabela S7.** Nastavak.

| Izolot      | Identitet        | Domaćin                       | Lokacija    | ITS      | GenBank       |                  |
|-------------|------------------|-------------------------------|-------------|----------|---------------|------------------|
|             |                  |                               |             |          | EF1- $\alpha$ | $\beta$ -tubulin |
| B 93        | <i>N. parvum</i> | <i>V. vinifera</i>            | Italy       | KM67576  | KM82273       | –                |
| NF-5        | <i>N. parvum</i> | <i>M. indica</i>              | Italy       | JN814430 | JN814473      | –                |
| DB 05112010 | <i>N. parvum</i> | <i>Rhododendron</i> sp.       | Italy       | HQ58925  | –             | –                |
| N 12        | <i>N. parvum</i> | <i>V. vinifera</i>            | Italy       | KJ946457 | KJ946459      | KJ946461         |
| UCD 577S    | <i>N. parvum</i> | <i>V. vinifera</i>            | Spain       | DQ35635  | GU29474       | DQ356365         |
| CMW 10089   | <i>N. parvum</i> | <i>Eucalyptus</i> sp.         | Ethiopia    | AY21047  | AY21048       | –                |
| 5B 602      | <i>N. parvum</i> | <i>Juglans regia</i>          | Spain       | KF778863 | KF779053      | KF778958         |
| BN 66       | <i>N. parvum</i> | <i>Eryobotrya japonica</i>    | Spain       | KT240279 | KT240253      | –                |
| F 49        | <i>N. parvum</i> | <i>Quercus suber</i>          | Spain       | DQ48715  | DQ48715       | –                |
| EFA 183     | <i>N. parvum</i> | <i>V. vinifera</i>            | Spain       | JQ974953 | JQ974954      | –                |
| 6.1         | <i>N. parvum</i> | <i>Vaccinium</i> sp.          | Spain       | KC55696  | KC55696       | –                |
| KC 15       | <i>N. parvum</i> | <i>M. indica</i>              | Puerto Rico | KC63166  | KC63165       | KC631654         |
| Npa 1       | <i>N. parvum</i> | <i>Prunus dulcis</i>          | Mallorca    | JF330779 | –             | JN191296         |
| MUCC 673    | <i>N. parvum</i> | <i>Eucalyptus globulus</i>    | Australia   | EU339553 | EU339520      | EU339483         |
| CMW 9071    | <i>N. parvum</i> | <i>Ribes</i> sp.              | Australia   | AY23693  | AY23688       | AY236909         |
| MUCC 124    | <i>N. parvum</i> | <i>E. dunnii</i>              | Australia   | EU339544 | EU339518      | EU339481         |
| CMW 6235    | <i>N. parvum</i> | <i>Tibouchina lepidota</i>    | Australia   | AY61513  | AY61512       | AY615120         |
| WAC 13381   | <i>N. parvum</i> | <i>Araucaria heterophylla</i> | Australia   | HM54514  | HM54514       | HM545151         |
| MUCC 211    | <i>N. parvum</i> | <i>Corymbia torrelliana</i>   | Australia   | EU301017 | EU339517      | EU339480         |
| IRN 1       | <i>N. parvum</i> | <i>V. vinifera</i>            | Iran        | GU12189  | GU12186       | GU121836         |
| IRAN 1528C  | <i>N. parvum</i> | <i>Juglans regia</i>          | Iran        | JQ772031 | JQ772068      | –                |
| IRAN 1535C  | <i>N. parvum</i> | <i>Salix</i> sp.              | Iran        | JQ772045 | JQ772082      | –                |
| CJA 8       | <i>N. parvum</i> | <i>J. regia</i>               | Iran        | JQ772040 | JQ772077      | –                |
| CJA 56      | <i>N. parvum</i> | <i>Actinidia deliciosa</i>    | Iran        | JQ772036 | JQ772073      | –                |
| CBS 110301  | <i>N. parvum</i> | <i>V. vinifera</i>            | Portugal    | AY25909  | AY57322       | EU673095         |
| CAA 126     | <i>N. parvum</i> | <i>Juniperus communis</i>     | Portugal    | JX878535 | –             | –                |
| NpSV        | <i>N. parvum</i> | <i>V. vinifera</i>            | France      | KP190147 | KP190149      | KP190148         |
| SO 334      | <i>N. parvum</i> | <i>V. vinifera</i>            | Croatia     | KF296318 | KF296319      | –                |
| HPP 121     | <i>N. parvum</i> | <i>V. vinifera</i>            | Croatia     | KF923329 | KF923331      | –                |
| HPP 110     | <i>N. parvum</i> | <i>V. vinifera</i>            | Croatia     | KF923328 | KF923330      | –                |
| APEC 1210   | <i>N. parvum</i> | <i>Juglans sinensis</i>       | Korea       | KC81861  | –             | –                |
| CRM 36      | <i>N. parvum</i> | <i>Vaccinium corymbosum</i>   | Mexico      | JQ647905 | –             | –                |
| CPONa 3     | <i>N. parvum</i> | <i>M. indica</i>              | Mexico      | JQ619648 | –             | –                |
| CIAD0 2111  | <i>N. parvum</i> | <i>Persea Americana</i>       | Mexico      | JN203129 | –             | –                |
| CRM 152     | <i>N. parvum</i> | <i>V. corymbosum</i>          | Mexico      | JQ647912 | –             | –                |
| FM          | <i>N. parvum</i> | <i>E. globulus</i>            | Mexico      | KC47918  | –             | –                |
| i53         | <i>N. parvum</i> | <i>V. vinifera</i>            | Turkey      | KJ921842 | KP721665      | KP721703         |
| MBA i27AG   | <i>N. parvum</i> | <i>V. vinifera</i>            | Turkey      | KF182330 | –             | –                |
| 3852        | <i>N. parvum</i> | <i>Solanum melongena</i>      | Bulgaria    | KT966746 | –             | –                |
| A4B         | <i>N. parvum</i> | <i>Eucalyptus</i> sp.         | Uganda      | –        | GU06494       | –                |
| 830         | <i>N. parvum</i> | <i>Eucalyptus</i> sp.         | Uganda      | JQ772545 | JQ982036      | –                |
| P3          | <i>N. parvum</i> | <i>Eucalyptus</i> sp.         | Uganda      | JQ981975 | JQ982027      | –                |
| MT8B        | <i>N. parvum</i> | <i>Eucalyptus</i> sp.         | Uganda      | –        | GU13053       | –                |
| 20819       | <i>N. parvum</i> | <i>Grevillea robusta</i>      | Uganda      | GQ92250  | –             | –                |
| P301        | <i>N. parvum</i> | <i>Eucalyptus</i> sp.         | Uganda      | JQ981987 | JQ982028      | –                |
| 822         | <i>N. parvum</i> | <i>Eucalyptus</i> sp.         | Uganda      | JQ772544 | JQ982021      | –                |
| EG36        | <i>N. parvum</i> | <i>Eucalyptus grandis</i>     | Kenia       | FJ904816 | FJ904894      | –                |



**Tabela S7.** Nastavak.

| Izolot      | Identitet         | Domaćin                      | Lokacija      | ITS      | GenBank       |                  |
|-------------|-------------------|------------------------------|---------------|----------|---------------|------------------|
|             |                   |                              |               |          | EF1- $\alpha$ | $\beta$ -tubulin |
| GRF42       | <i>N. parvum</i>  | <i>G. robusta</i>            | Kenia         | –        | FJ904895      | –                |
| CMW 25468   | <i>N. parvum</i>  | <i>G. robusta</i>            | Kenia         | –        | FJ904895      | –                |
| WASWS       | <i>N. parvum</i>  | <i>Platanus acerifolia</i>   | Switzerland   | KR97844  | –             | –                |
| CMW 38724   | <i>N. parvum</i>  | <i>Eucalyptus</i> sp.        | Zimbabwe      | KF923244 | KF923277      | KF923265         |
| CPC 22752   | <i>N. parvum</i>  | <i>Prunus cerasoides</i>     | Thailand      | KM00643  | KM00646       | –                |
| CPC 22757   | <i>N. parvum</i>  | <i>Eucalyptus obliqua</i>    | Thailand      | KM00643  | KM00646       | –                |
| CMW 7885    | <i>N. parvum</i>  | <i>Eucalyptus</i> sp.        | Hawaii (USA)  | AY23694  | AY23688       | AY23691          |
| CMW 13350   | <i>N. parvum</i>  | <i>Psidium guajava</i>       | Venezuela     | EF118036 | –             | –                |
| CMW 13555   | <i>N. parvum</i>  | <i>Eucalyptus urophylla</i>  | Venezuela     | EF118035 | –             | –                |
| B 168       | <i>N. parvum</i>  | <i>Malus</i> sp.             | Uruguay       | KJ499744 | KJ499657      | –                |
| UY 231      | <i>N. parvum</i>  | <i>Eucalyptus</i> sp.        | Uruguay       | EU080917 | EU863164      | –                |
| B 171       | <i>N. parvum</i>  | –                            | Uruguay       | KJ499745 | KJ499658      | –                |
| UY 37       | <i>N. parvum</i>  | –                            | Uruguay       | EU080909 | EU863161      | –                |
| V 2         | <i>N. parvum</i>  | <i>V. vinifera</i>           | Uruguay       | JX271830 | –             | –                |
| VID 1560    | <i>N. parvum</i>  | <i>V. vinifera</i>           | Chile         | KM87022  | –             | KP762485         |
| DP 001      | <i>D. sapinea</i> | <i>Pseudotsuga menziesii</i> | Turkey        | KF372874 | –             | –                |
| CBS 393.84  | <i>D. sapinea</i> | <i>Pinus nigra</i>           | Netherlands   | DQ45889  | DQ45888       | DQ45886          |
| CBS 109727  | <i>D. sapinea</i> | <i>Pinus radiata</i>         | South Africa  | DQ45889  | DQ45888       | DQ45886          |
| CBS 109725  | <i>D. sapinea</i> | <i>Pinus patula</i>          | South Africa  | DQ45889  | DQ45888       | DQ45886          |
| CMW 4898    | <i>D. sapinea</i> | <i>Pinus greggii</i>         | South Africa  | AY25329  | –             | –                |
| CMW 190     | <i>D. sapinea</i> | <i>Pinus banksiana</i>       | USA           | KF766159 | AY62425       | AY62425          |
| CMW 8745    | <i>D. sapinea</i> | <i>P. menziesii</i>          | USA           | EU220435 | –             | EU220471         |
| PD 23       | <i>D. sapinea</i> | <i>Malus</i> sp.             | USA           | GU25111  | GU25124       | GU25177          |
| 1031        | <i>D. sapinea</i> | <i>P. nigra</i>              | USA           | AY15671  | –             | –                |
| BOT 275     | <i>D. sapinea</i> | <i>P. patula</i>             | Indonesia     | AF283689 | –             | –                |
| CMW 4876    | <i>D. sapinea</i> | <i>P. patula</i>             | Indonesia     | AY25329  | AY62425       | AY62425          |
| CBS109943   | <i>D. sapinea</i> | <i>P. patula</i>             | Indonesia     | DQ45889  | DQ45888       | DQ45886          |
| CMW 14656   | <i>D. sapinea</i> | <i>Pinus merkusii</i>        | Indonesia     | EU220447 | –             | EU220483         |
| DpEST 1     | <i>D. sapinea</i> | <i>P. nigra</i>              | Estonia       | EU330229 | –             | –                |
| WA 19144    | <i>D. sapinea</i> | –                            | Poland        | JX981458 | –             | –                |
| IRAN 2208c  | <i>D. sapinea</i> | <i>Pinus</i> sp.             | Iran          | KF890210 | KF890192      | –                |
| Dp 1992     | <i>D. sapinea</i> | <i>P. sylvestris</i>         | Russia        | KJ401036 | –             | –                |
| CMW 11250   | <i>D. sapinea</i> | <i>P. patula</i>             | Ethiopia      | AY24440  | –             | –                |
| CMW 11252   | <i>D. sapinea</i> | <i>P. patula</i>             | Ethiopia      | AY24440  | –             | –                |
| 910843      | <i>D. sapinea</i> | –                            | Canada        | AF110814 | –             | –                |
| CAP 166     | <i>D. sapinea</i> | <i>Olea europaea</i>         | Italy         | EU392284 | EU392261      | –                |
| 11Do37      | <i>D. sapinea</i> | –                            | Korea         | KF717040 | –             | –                |
| CJK 2       | <i>D. sapinea</i> | <i>P. sylvestris</i>         | Austria       | JX431883 | –             | JX431879         |
| ZP 31       | <i>D. sapinea</i> | <i>P. sylvestris</i>         | China         | HQ84504  | –             | –                |
| VL 150      | <i>D. sapinea</i> | <i>Pinus mugo</i>            | Lithuania     | JF440618 | –             | –                |
| CI-63       | <i>D. sapinea</i> | <i>P. radiata</i>            | Chile         | EF506938 | –             | –                |
| CAA 025     | <i>D. sapinea</i> | <i>Thuja plicata</i>         | Portugal      | JX878530 | –             | –                |
| NZFS 2992   | <i>D. sapinea</i> | <i>P. radiata</i>            | New Zealand   | JQ922534 | –             | –                |
| CMW 12513   | <i>D. sapinea</i> | <i>Larix</i> sp.             | France        | EU22044  | –             | EU220477         |
| BEI 06      | <i>D. sapinea</i> | <i>V. vinifera</i>           | France        | KT595692 | –             | KT595693         |
| BEI 39      | <i>D. sapinea</i> | <i>V. vinifera</i>           | France        | KT954169 | –             | KT954170         |
| CMW 13234   | <i>D. sapinea</i> | <i>Cedrus deodara</i>        | France        | EU220440 | –             | EU220476         |
| CMW 8750    | <i>D. sapinea</i> | <i>P. menziesii</i>          | Great Britain | EU220436 | –             | EU220472         |
| KUP 5.2.1.2 | <i>D. sapinea</i> | <i>Pinus contorta</i>        | Latvia        | KP698189 | –             | –                |

**Tabela S7.** Nastavak.

| Izolat     | Identitet         | Domaćin                       | Lokacija       | ITS     | GenBank       |                  |
|------------|-------------------|-------------------------------|----------------|---------|---------------|------------------|
|            |                   |                               |                |         | EF1- $\alpha$ | $\beta$ -tubulin |
| CAP 339    | <i>D. sapinea</i> | <i>Pinus</i> sp.              | Belgium        | GQ92387 | GQ92384       | –                |
| CMW 30129  | <i>D. sapinea</i> | <i>Pinus oocarpa</i>          | Zambia         | –       | –             | FJ858720         |
| 5 F        | <i>D. sapinea</i> | –                             | Central Europe | GQ33649 | –             | –                |
| BR 4       | <i>D. sapinea</i> | –                             | Central Europe | GQ33650 | –             | –                |
| 2 B        | <i>D. sapinea</i> | –                             | Central Europe | GQ33648 | –             | –                |
| BL 1       | <i>D. sapinea</i> | –                             | Central Europe | GQ33649 | –             | –                |
| DIP-15     | <i>D. sapinea</i> | <i>Dryocoetes autographus</i> | Spain          | DQ67437 | –             | –                |
| UASWS 1111 | <i>D. sapinea</i> | <i>Pinus</i> sp.              | Switzerland    | KM28003 | –             | –                |

Kolekcije kultura: CMW: FABI, University of Pretoria, South Africa. <sup>1</sup> Plantaža bora. <sup>2</sup> Šumska sastojina. <sup>3</sup> Rasdnik.

**10.3.4. Tabela S8.** Patogenost i agresivnost različitih genotipova *Neofusicoccum parvum* i *Diplodia sapinea* inokuliranih u sadnice različitih vrsta (Poglavlja 4, 5, 6). + Gljiva je bila patogena prema domaćinu, – Gljiva nije bila patogena prema domaćinu, / Izolat nije bio korišćen u inokulaciji, \* Genotip je bio agresivniji prema određenom domaćinu. <sup>1</sup> Izolat je bio najagresivniji, <sup>2</sup> Izolat je bio srednje agresivan, <sup>3</sup> Izolat je bio najmanje agresivan. Rezultati inokulacija *C. lawsoniana*, *C. atlantica*, *C. deodara*, *P. laurocerasus*, *T. occidentalis* i *E. grandis* sa izolatima *D. sapinea* nisu prikazani jer se pokazalo da ova gljiva ne može inficirati ove domaćine.

*Neofusicoccum parvum*

| Izolat    | Genotip   | Vrsta drveća            |                            |                                 |                           |                      |                 |                           |                               |                     |                           |
|-----------|-----------|-------------------------|----------------------------|---------------------------------|---------------------------|----------------------|-----------------|---------------------------|-------------------------------|---------------------|---------------------------|
|           |           | <i>Cedrus atlantica</i> | <i>Prunus laurocerasus</i> | <i>Sequoiadendron giganteum</i> | <i>Thuja occidentalis</i> | <i>Picea omorika</i> | <i>P. abies</i> | <i>Pittosporum tobira</i> | <i>Aesculus hippocastanum</i> | <i>Pinus patula</i> | <i>Eucalyptus grandis</i> |
| CMW 39327 | <b>S1</b> | +                       | +                          | +*                              | +                         | +                    | +*              | +                         | +                             | +                   | +                         |
| CMW 39317 | <b>S4</b> | –                       | +*                         | +                               | +*                        | /                    | +               | +                         | +                             | +*                  | +*                        |

*Diplodia sapinea*

| Izolat    | Genotip   | <i>Abies concolor</i> | <i>P. nigra</i> | <i>P. sylvestris</i> | <i>Fagus sylvatica</i> | <i>P. pungens</i> | <i>P. abies</i> | <i>Juniperus horizontalis</i> | <i>Pseudotsuga menziesii</i> | <i>P. patula</i> |
|-----------|-----------|-----------------------|-----------------|----------------------|------------------------|-------------------|-----------------|-------------------------------|------------------------------|------------------|
|           |           | CMW 39329             | <b>S4</b>       | +                    | + <sup>2</sup>         | +                 | +               | +*                            | +                            | +                |
| CMW 39337 | <b>S4</b> | +                     | + <sup>3</sup>  | +                    | +                      | +                 | +               | +                             | +                            | +                |
| CMW 39343 | <b>S7</b> | /                     | + <sup>1</sup>  | /                    | +                      | /                 | /               | /                             | /                            | /                |
| CMW 39332 | <b>S2</b> | /                     | + <sup>2</sup>  | /                    | +                      | /                 | /               | /                             | /                            | /                |

## **Biografija studenta doktorskih studija Milice Zlatković**

Milica P. Zlatković rođena je 22.3.1982 godine u Pirotu. Gimnaziju u Pirotu završila je sa prosečnom ocenom 5.00 i diplomom "Vuk Karadžić". Šumarski fakultet Univerziteta u Beogradu završila je školske 2008/09 godine sa prosečnom ocenom tokom studija 8.71. Diplomski rad iz oblasti Zaštite šuma (Šumska fitopatologija) „Uticaj klimatskih promena na bolesti šumskog drveća“ odbranila je sa ocenom 10 (mentor: Prof. Dr. Nenad Keča). Doktorske studije iz oblasti Šumarstva (izborna grupa Zaštita šuma) upisala je školske 2009/10. godine. Položila je sve ispite predviđene planom i programom doktorskih studija sa prosečnom ocenom 10. U periodu od februara 2011 do aprila 2012. godine bila je zaposlena na Šumarskom fakultetu Univerziteta u Beogradu u zvanju istraživač-pripravnik, a od aprila 2012. godine do danas u zvanju istraživač-saradnik.

Naučno-istraživačko interesovanje dipl.inž. Milice Zlatković odnosi se na evoluciju biologiju gljiva šumskog i ukrasnog drveća, sa posebnim akcentom na taksonomiju, filogenetiku, populacionu genetiku i patologiju. Član je Društva za zaštitu bilja Srbije, Američkog fitopatološkog društva (APS) i Južnoafričkog fitopatološkog društva (SASPP). Učestvovala je u 11 treninga i radionica u Srbiji, Crnoj Gori, Poljskoj, Portugalu i Južnoj Africi, a usavršavala se i u molekularnim laboratorijama Instituta za šumartvo u Sloveniji (3 meseca) i Instituta za šumarstvo, poljoprivredu i biotehnologiju Univerziteta u Pretoriji, Južnoafrička Republika (FABI, ukupno 1 godina i dva meseca). Dobitnik je stipendija COST akcija: PERMIT FP1002 (Pathway Evaluation and Pest Risk Management In Transport), ALIEN Challenge TD1209 i Global Warning FP1401. Njen naučno-istraživački rad finansira i Univerzitet u Pretoriji (Južnoafrička Republika), ko-operativni program za zaštitu šuma (Tree Protection Co-operative Programme-TPCP) i Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (projekat TR37008). Do sada je objavila 17 naučnih i stručnih radova, od čega su dva (u kojima je prvi autor) objavljena u časopisima sa SCI liste.

## **Milica Zlatković, PhD student**

### **Biographical note**

Milica P. Zlatković was born on 22.3.1982 in Pirot, Serbia where she finished primary school and high school with honours. She graduated from the Faculty of Forestry-University of Belgrade in the academic year of 2008/2009 with average grade 8.71/10.00. She successfully defended the graduate engineer degree thesis: “Impacts of climate change on forest tree diseases” (Forest Pathology) with grade 10.00/10.00 (supervisor: Prof. Dr. Nenad Keča). She enrolled as a PhD candidate at the Faculty of Forestry-University of Belgrade (Forestry, Forest Protection) in the academic year of 2009/2010. She passed all the exams with the average grade 10.00/10.00. Since February 2011, she has been employed at the Faculty of Forestry, University of Belgrade (as a research assistant until April 2012, and then as a research associate).

Her research interests lie in the field of evolutionary biology of fungal pathogens of forest and ornamental trees, especially taxonomy, phylogeny and population genetics. She has been a member of the following professional societies: Serbian Society of Plant Protection, American Phytopathological Society and South African Society of Plant Pathology. She has attended 11 workshops and trainings in Serbia, Montenegro, Poland, Portugal and South Africa. She has worked in the research labs of the Slovenian Forestry Institute (3 months) and Forestry and Agricultural Biotechnology Institute (FABI, Pretoria, South Africa, one year and two months). She has received grants from COST actions: PERMIT FP1002 (Pathway Evaluation and Pest Risk Management In Transport), ALIEN Challenge TD1209 and Global Warning FP1401. She has also received funding support from the University of Pretoria (South Africa), Tree Protection Co-operative Programme (TPCP) and Ministry of Science and Education of the Republic of Serbia (project TR37008). Milica has published two peer-reviewed articles, two articles in Serbian academic journals and 13 poster/oral presentations at international and local conferences.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Златковић Милица

број уписа 612009

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

BOTRYOSPHERACEAE КОМПЛЕКС НА РАЗЛИЧИТИМ ДРВЕНАСТИМ  
ВРСТАМА У СРБИЈИ (BOTRYOSPHERACEAE SPECIES OCCURRING ON  
VARIOUS WOODY HOSTS IN SERBIA)

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 1.9.2016

Златковић Милица

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Милица Златковић  
Број уписа 612009  
Студијски програм ШУМАРСТВО / ЗАШТИТА ШУМА  
Наслов рада ВОДНОСНА ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА КОМПЛЕКС НА РАЗЛИЧИТИМ ДРВЕНАСТИМ  
ВРСТАМА У СРБИЈИ  
Ментор ПРОФ. ДР. НЕНАД КЕЧА, ПРОФ. ДР. BERNARD SLIPPER

Потписани Златковић Милица

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 1.9.2016

Златковић Милица

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

БОТРОСНАЕЦИЈАЕ КОМПЛЕКС НА РАЗЛИЧИТИМ ДРВЕНАТИМ ВРСТАМА У СРБИЈИ (BOTRYOSPHAERIACEAE SPECIES OCCURRING ON VARIOUS WOODY HOSTS IN SERBIA)  
која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 1.9.2016.

Златко Бек Милова



1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.