

Patogenost gljive *Diaporthe eres* Nitschke na hrastu lužnjaku (*Quercus robur* L.)

Cindrić, Fran Bono

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:108:759693>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET ŠUMARSTVA I DRVNE TEHNOLOGIJE
ŠUMARSKI ODSJEK

**Patogenost gljive *Diaporthe eres* Nitschke na hrastu lužnjaku
(*Quercus robur* L.)**

DIPLOMSKI RAD

Diplomski studij: Urbano šumarstvo, zaštita prirode i okoliša

Predmet: Integrirana zaštita šuma u zaštićenim područjima

Ispitno povjerenstvo: 1. prof. dr. sc. Danko Diminić
2. doc. dr. sc. Milivoj Franjević
3. dr. sc. Jelena Kranjec Orlović

Student: Fran Bono Cindrić

JMBAG: 0068224854

Broj indeksa: 1078/19

Datum odobrenja teme: 04.05.2021.

Datum predaje rada: 10.09.2021.

Datum obrane rada: 24.09.2021.

Zagreb, rujan 2021.

Dokumentacijska kartica

Naslov	Patogenost gljive <i>Diaporthe eres</i> Nitschke na hrastu lužnjaku (<i>Quercus robur</i> L.)
Title	Pathogenicity of the fungus <i>Diaporthe eres</i> Nitschke towards pedunculate oak (<i>Quercus robur</i> L.)
Autor	Fran Bono Cindrić
Adresa autora	Gojka Šuška 12, Slunj
Mjesto izrade	Sveučilište u Zagrebu, Fakultet šumarstva i drvne tehnologije
Vrsta objave	Diplomski rad
Mentor	prof. dr. sc. Danko Diminić
Komentorica	dr. sc. Jelena Kranjec Orlović
Godina objave	2021.
Obujam	31 stranica, 24 slike, 20 literaturnih referenci
Ključne riječi	hrast lužnjak, inokulacija, izolacija, micelij
Key words	pedunculate oak, inoculation, isolation, mycelium
Sažetak	<p>Tijekom 2020. godine je na području Gunje zabilježeno odumiranje sadnica hrasta lužnjaka (<i>Quercus robur</i> L.) starosti šest godina na velikim površinama. Iz simptomatičnog tkiva drva i kore je izolirana gljiva <i>Diaporthe eres</i> Nitschke. Cilj ovoga rada je utvrditi patogenost nađene gljive inokulacijom u zdrave sadnice hrasta lužnjaka. Na inokuliranim sadnicama biti će praćen razvoj simptoma te će potom ponovno biti izvršen pokušaj izolacije gljive iz simptomatičnog tkiva. Dobiveni rezultati će ukazati na patogenost istraživane gljive prema hrastu lužnjaku.</p>



IZJAVA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

OB FŠDT 05 07

Revizija: 2

Datum: 29.04.2021.

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

U Zagrebu, 24. rujna 2021. godine

vlastoručni potpis

Fran Bono Cindrić

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Hrast lužnjak (<i>Quercus robur</i> L.) i njegovo značenje u Hrvatskoj	1
1.2. Općenito o patogenu <i>Diaporthe eres</i> Nitschke	5
2. CILJ RADA.....	7
3. MATERIJALI I METODE	8
3.1. Čiste kulture micelija korištene za inokulaciju.....	8
3.2. Inokulacija sadnica u prirodnim uvjetima	8
3.3. Inokulacija sadnica u kontroliranim uvjetima	10
3.4. Praćenje razvoja simptoma na sadnicama	12
3.5. Izolacija micelija gljiva	13
3.6. Presađivanje micelija radi dobivanja čistih kultura.....	16
4. Rezultati istraživanja.....	18
4.1. Simptomi na sadnicama iz rasadnika	18
4.2. Simptomi na sadnicama iz komora rasta.....	21
4.3. Izolirani miceliji gljiva iz tkiva oko mjesta inokulacije	23
5. RASPRAVA.....	26
6. ZAKLJUČAK.....	29
7. LITERATURA.....	30

Popis slika

Slika 1. Hrast lužnjak (*Quercus robur* L.)

(Izvor:https://sites.google.com/site/stablauhrvatskoj/_/rsrc/1457547485949/hrast-luznjak/hrast.jpg)

Slika 2. Prikaz areala hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L.) uz tok rijeke Save (izvor: Šumarski list, 7–8 (2013) 367–378)

Slika 3. Hrastova pepelnica (*Microsphaera alphitoides*) na mladoj biljci

(izvor:[https://stetnici.sumins.hr/SumskiStetnici/hrastova_pepelnica_\(microsphaera_alphitoides\)](https://stetnici.sumins.hr/SumskiStetnici/hrastova_pepelnica_(microsphaera_alphitoides)))

Slika 4. Imago hrastove mrežasta stjenice (*Corythucha arcuata*)

(izvor:[https://stetnici.sumins.hr/SumskiStetnici/mrezasta_hrastova_stjenica_\(corythucha_arcuata\)](https://stetnici.sumins.hr/SumskiStetnici/mrezasta_hrastova_stjenica_(corythucha_arcuata)))

Slika 5. Primjer obilježavanja inokuliranih sadnica hrasta lužnjaka u prirodnim uvjetima

Slika 6. Inokulacija sadnica u Laboratoriju za šumsko sjemenarstvo i rasadničarstvo

Slika 7. Primjer dovršenog postupka inokulacije sadnice hrasta lužnjaka gljivom *Diaporthe eres*

Slika 8. Priprema uzoraka grana sadnica hrasta lužnjaka za laboratorijsku obradu

Slika 9. Rad u laminarnom kabinetu za rad u atmosferi čistog zraka (laminaru)

Slika 10. Prikaz posuda u kojima je vršena površinska sterilizacija uzoraka za izolaciju micelija gljiva na hranjive podloge

Slika 11. Prikaz razvijenih micelija gljiva iz komadića tkiva zaraženih grana hrasta lužnjaka

Slika 12. Primjer razvijenih micelija gljive *D. eres* i oznaka na Petrijevim zdjelicama

Slika 13. Presađivanje dobivenih micelija radi dobivanja čistih kultura

Slika 14. Prikaz razvijene čiste kulture *Diaporthe eres*

Slika 15. Izgled prvih simptoma na zaraženim sadnicama hrasta lužnjaka

Slika 16. Primjer izgleda mjesta inokulacije: a) crni nekrotični prste na zaraženim sadnicama; b) kalusno tkivo na kontrolnim sadnicama

Slika 17. Prikaz dubine progresije gljive *Diaporthe eres* na uzdužnom presjeku zaražene grane hrasta lužnjaka

Slika 18. Prikaz dubine progresije gljive *Diaporthe eres* na poprečnom presjeku zaražene grane hrasta lužnjaka

Slika 19. Crni, odnosno smeđi prsten oko kalusnog tkiva uočeni na kontrolnim sadnicama broj 1 i broj 3

Slika 20. Prikaz izgleda nekroze oko mjesta inokulacije na sadnici izloženoj prekomjernom zalijevanju

Slika 21. Prikaz kalusiranog mjesta inokulacije na kontrolnoj sadnici

Slika 22. Prikaz izoliranih kultura micelija *Diaporthe eres* iz zaraženih sadnica hrasta lužnjaka iz rasadnika

Slika 23. Prikaz izoliranih kultura micelija iz kontrolnih sadnica broj 2, broj 4 i broj 7, koji po morfološkim karakteristikama nalikuju vrsti *Diaporthe eres*

Slika 24. Izolirane kulture micelija iz sadnica čuvanih u komorama rasta: a) miceliji koji morfološki nalikuju gljivi *D. eres* dobiveni iz kontrolnih sadnica K38 i K42; b) miceliji dobiveni iz zaražene sadnice N12 koji zasigurno ne pripadaju rodu *Diaporthe*

1. UVOD

1.1. Hrast lužnjak (*Quercus robur* L.) i njegovo značenje u Hrvatskoj

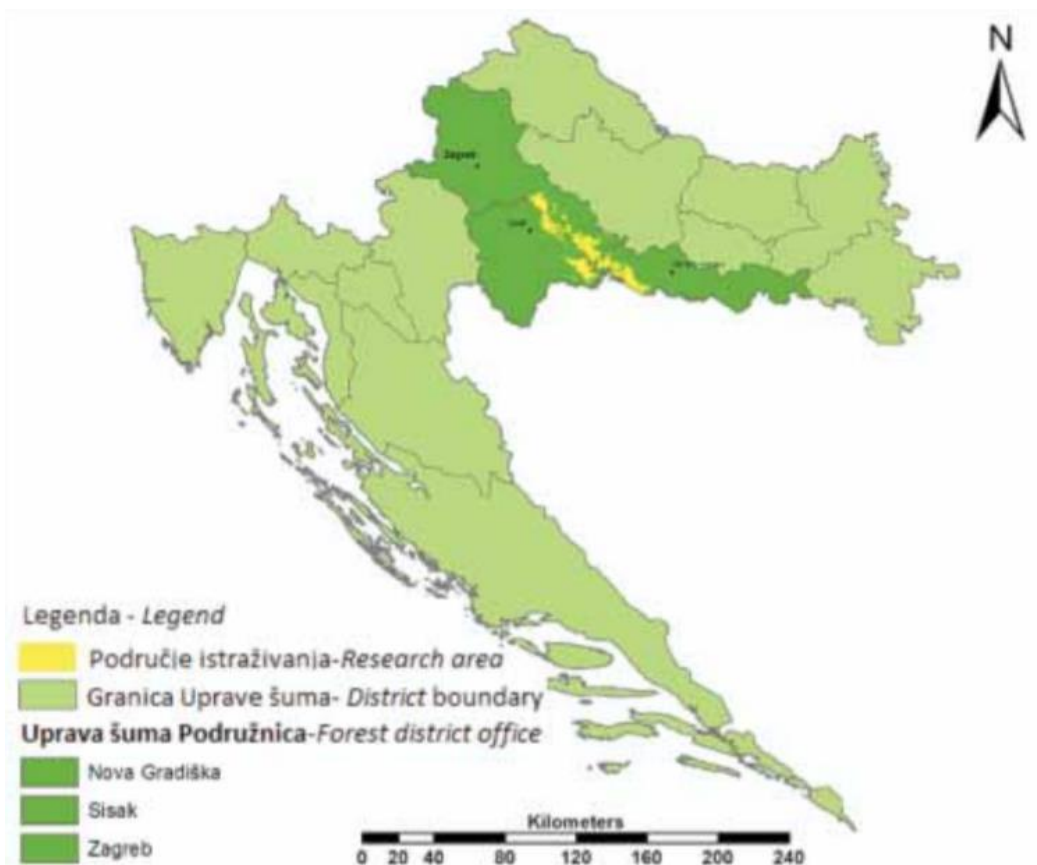
Hrast lužnjak (*Quercus robur* L.) je listopadna i heliofilna vrsta koja raste na glinastim i pjeskovitim tlima, sa značajnim udjelom vlage i visokom razinom podzemne vode. Pretežno je rasprostranjen na većem području Europe, te na dijelovima Kavkaza i Male Azije (Franjić i Škvorc, 2010). Krošnja mu je široka i dobro razgranata (Slika 1). Hrast lužnjak ima duboko korijenje sa žilom srčanicom. Podzemna voda neophodna je za rast, razvoj i njegovu opstojnost, dok dugotrajne poplave hrast lužnjak kao vrsta ne podnosi (Ugarković i Pleša, 2017). Najvažnije biljne zajednice našeg područja u kojima je hrast lužnjak glavna vrsta su šuma hrasta lužnjaka s velikom žutilovkom (*Genisto elatae - Quercetum roboris*) i šuma hrasta lužnjaka i običnog graba (*Carpino betuli-Quercetum roboris*) (Vukelić, 2012).



Slika 1. Hrast lužnjak (*Quercus robur* L.)

(Izvor:https://sites.google.com/site/stablauhrvatskoj/_/rsrc/1457547485949/hrast-luznjak/hrast.jpg)

Šume hrasta lužnjaka su među najznačajnijim i najvrjednijim šumama našeg područja, te su u velikoj mjeri smještene uz tok rijeke Save (Slika 2). Iako je njihov ekonomski potencijal od velike važnosti, ekološki aspekt kojeg one pružaju u nizinskim područjima njihovog pridolaska je daleko značajniji. Unatoč tome, u ovom se nizinskom šumskom ekosustavu već početkom 20. stoljeća primjećuju znatni nepovoljni utjecaji kako biotskih, tako i abiotskih čimbenika.



Slika 2. Prikaz areala hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L.) uz tok rijeke Save (Izvor: Šumarski list, 7–8 (2013) 367–378)

Kao posljedica se počelo javljati postepeno odumiranje hrastovih stabala i sastojina, u većoj ili manjoj mjeri, koje se i u današnje vrijeme bilježi. Prve takve promjene su se kroz povijest kontinuirano javljale uslijed štetnog djelovanja pepelnice (Slika 3), dok su defolijacije od strane štetnika poput gubara bile najizraženije za sušnih razdoblja.



Slika 3. Hrastova pepelnica (*Microsphaera alphitoides*) na mladoj biljci
(Izvor:[https://stetnici.sumins.hr/SumskiStetnici/hrastova_pepelnica_\(microsphaera_alphitoides\)\)](https://stetnici.sumins.hr/SumskiStetnici/hrastova_pepelnica_(microsphaera_alphitoides))))

Kako su ove šume primarno vezane uz hidrološke uvjete, neki od glavnih abiotskih čimbenika koji su uvjetovali promjene u ovim iznimno vrijednim sastojinama ogledaju se u promjenama vodnog režima i dugotrajnim i čestim sušnim razdobljima (Dubravac, 2010). Razni hidrotehnički zahvati tijekom godina su doveli do primjetnog pada vitaliteta i, krajnje, sušenja brojnih stabala zahvaćenih područja, poglavito uslijed spuštanja razina podzemnih voda i poremećaja u režimima plavljenja (Ugarković i Pleša, 2017). Klimatske promjene imaju svoj utjecaj na ove komplekse šuma, već spomenutim izraženijim i dužim sušnim razdobljima, no i u pogledu klimatskih ekscesa koji su se tijekom godina periodično pojavljivali. Jedan od najrecentnijih biotskih nepovoljnih čimbenika u ovim šumama je pojava nove invazivne vrste hrastove mrežaste stjenice (Slika 4), a utvrđivanje same štetnosti njenog utjecaja na stabla hrasta lužnjaka će zahtijevati daljnja istraživanja (Hrašovec i sur., 2013). Problemi koji se vežu uz ovu značajnu gospodarsku vrstu su raznoliki, te se iz navedenog može zaključiti da ne postoji jedinstveni čimbenik koji bi bio odgovoran za zabilježena sušenja stabala, već skup njih koji svojim međudjelovanjem dovode u pitanje opstanak ovog osjetljivog šumskog ekosustava čija se vrijednost ne može dovoljno naglasiti.



Slika 4. Imago hrastove mrežaste stjenice (*Corythucha arcuata*)

(Izvor: [https://stetnici.sumins.hr/SumskiStetnici/mrezasta_hrastova_stjenica_\(corythucha_arcuata\)](https://stetnici.sumins.hr/SumskiStetnici/mrezasta_hrastova_stjenica_(corythucha_arcuata)))

1.2. Općenito o patogenu *Diaporthe eres* Nitschke

Rod *Diaporthe* sastoji se od patogenih, endofitskih i saprotrofnih vrsta. Velika raznolikost, fenotipska plastičnost i velik broj domaćina jedne su od osnovnih karakteristika vrsta ovoga roda (Udayanga i sur., 2014). Razgraničenje vrste *Diaporthe eres* od srodnih vrsta u rodu je zbog toga ponekad zahtjevno te je često potrebna dodatna molekularna analiza. U posljednja dva desetljeća postignut je velik napredak u determiniranju gljivičnih vrsta primjenom molekularnih podataka i analiza (Hibbett i Taylor, 2013).

Diaporthe eres Nitschke, tipičnu vrstu ovoga roda, izvorno je opisao Nitschke 1870. godine. Miceliji gljive su prikupljeni iz uzorka grane roda *Ulmus* sp. u Njemačkoj. Wehmeyer 1933. godine navodi niz sinonima gljive *D. eres* s približno 70 biljnih vrsta koje navodi kao domaćine dotične gljive. *D. eres* je kroz istraživanje odnosno otkrivanje dobivala mnoge sinonime. Jedan od najstarijih sinonima gljive opisan je pod nazivom *Phomopsis velata* Sacc. te je taj naziv prihvaćen od strane urednika *Index Fungorum*. Također, prema *Index Fungorum* (2014) prihvaćeni su mnogi sinonimi koji se i dalje navode u starijoj literaturi, kao što su: *Chorostate*, *Cucurbitaria*, *Diatrype*, *Phoma*, *Phomopsis*, *Sclerophoma*, *Sclerophomella* i *Valsa*. S obzirom na status genetičkog tipa i njegovu široku primjenu u literaturi predloženo je korištenje imena *Diaporthe eres* iznad svih potencijalnih sinonima (Rossman i sur., 2014). Prema sistematsko-mikološkoj klasifikaciji porodica *Diaporthaceae*, kojoj pripada gljiva *Diaporthe eres*, spada u red *Diaporthales*, odjel *Ascomycota*.

Diaporthe eres je prvi put u Hrvatskoj zabilježena na vinovoj lozi što je ujedno i prva potvrda patogenosti te vrste na vinovoj lozi u svijetu (Kaliterna i sur., 2012). U svijetu postoji niz primjera patogenog učinka gljive *D. eres*, kao npr. rak breskve u Grčkoj (Thomidis i Michailides, 2009), oboljenja vrsta roda *Vaccinium* u Europi (Lombard i sur., 2014) te rakaste tvorevine na vinovoj lozi u SAD-u (Baumgartner i sur., 2013.).

Nedavna istraživanja potvrdila su da su određene vrste roda *Diaporthe* povezane s odumiranjem više vrsta poljoprivrednih usjeva, ali i nekoliko slučajeva odumiranja velike skupine stabala gdje se navode rodovi poput *Camellia*, *Citrus*, *Glicinia*, *Helianthus*, *Vaccinium*, *Vitis* (Van Rensburg i sur., 2006).

Istraživanje patogenosti *D. eres* na borovnici (*Vaccinium myrtillus* L.) je pokazalo vrlo slabu reakciju biljke domaćina na gljivu (Cardinaals i sur., 2018), zbog čega je upitno može li se vrsta *D. eres* smatrati patogenom i isključivo zaslužnom za narušavanje vitaliteta domaćina, u ovom slučaju borovnice (Ivić i sur., 2018).

Udayanga i sur. (2014) opisuju *D. eres* kao oportunističkog parazita koji napada velik broj biljnih vrsta te na taj način stvara veliku genetsku varijabilnost ovisno o domaćinu kojeg napada.

Gljiva razvija anamorfni (nesavršeni, nespolni) stadij *Phomopsis oblonga*, dok je telemorfni (savršeni, spolni) stadij *D. eres*. U nesavršenom stadiju razvija piknide s konidijama. Na rast i klijanje konidija utječe nekoliko čimbenika kao što su: temperatura, aktivnost vode (a_w), pH vrijednost i supstrat. Temperatura i voda smatraju se najvažnijim čimbenicima koji definiraju sposobnost rasta gljive na biljkama. Temperatura pogodna za klijanje konidija kreće se u rasponu od 5 – 35 °C, optimalno 27 – 29 °C. Aktivnost vode potrebna za klijanje je oko 0,61 ($a_w = 0,99$ optimalno) (Arciuolo i sur., 2021).

2. CILJ RADA

Tijekom 2020. godine na području gospodarske jedinice Desićevo uočeno je odumiranje pojedinačnih grana u krošnjama sadnica hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L.) starosti šest godina. Iz simptomatičnog tkiva drva i kore je izolirana gljiva *Diaporthe eres* (Damijanić, 2021). Kako bi se utvrdilo je li zaista gljiva odgovorna za odumiranje grana (jer je moguće da je došla naknadno na već mrtvo tkivo u svojstvu saprotrofa), potrebno je provesti test patogenosti, odnosno u kontroliranim uvjetima inficirati / inokulirati biljke navedenom gljivom i pratiti hoće li gljiva uzrokovati slične simptome kao na terenu.

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

1. Patogeni mikroorganizam mora biti prisutan u svim organizmima koji pate od bolesti dok u zdravim organizmima ne bi smio biti prisutan,
2. Mikroorganizam mora biti izoliran iz oboljelog organizma i uzgojen u čistoj kulturi,
3. Uzgojeni patogeni mikroorganizam mora moći uzrokovati bolest, odnosno jednake simptome, nakon što je ponovno inokulacijom uveden u zdrav organizam,
4. Patogeni mikroorganizam mora biti ponovno izoliran iz inokulirana eksperimentalna domaćina na kojem su razvijeni simptomi bolesti te identificiran kao onaj koji je identičan izvornom specifičnom uzročniku bolesti (Koch, 1882; Lagier i sur., 2018).

Kako su u prethodno provedenom istraživanju odumiranja grana hrasta lužnjaka (Damijanić, 2021) zadovoljena samo prva dva Kochova postulata, cilj ovog istraživanja je bio ispitati jesu li zadovoljena i preostala dva Kochova postulata te na temelju dobivenih rezultata utvrditi je li gljiva ključan uzročnik sušenja sadnica hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L.).

Kochovi postulati su ispitani inokulacijom gljive u zdrave sadnice hrasta lužnjaka u prirodnim (rasadnik) i kontroliranim uvjetima (komora rasta) te izolacijom micelija prisutnih u tkivu oko mjesta inokulacije na hranjive podloge nakon perioda inkubacije.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Čiste kulture micelija korištene za inokulaciju

Izolat gljive *D. eres* korišten za inokulaciju sadnica hrasta lužnjaka preuzet je iz baze micelija koji su skladišteni na dugoročnoj pohrani u Laboratoriju za patologiju drveća Fakulteta šumarstva i drvne tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Korišten je izolat QRGU15 koji je dobiven iz simptomatičnih stanica drva hrasta lužnjaka s područja gospodarske jedinice Desićevo u istraživanju provedenom 2020. godine (Damijanić, 2021). Inokulacija je izvršena čistim kulturama micelija izolata QRGU15 starim sedam dana i uzgojenim na PDA (Potato Dextrose Agar) hranjivoj podlozi.

3.2. Inokulacija sadnica u prirodnim uvjetima

Ovaj dio istraživanja je proveden krajem svibnja 2021. godine u šumskom rasadniku „Šumski vrt i arboretum“ kojim gospodari Fakultet šumarstva i drvne tehnologije i koji je smješten u njegovoj neposrednoj blizini (45.8202° N, 16.0228° E). Inokulacija je provedena na otvorenoj površini šumarskog rasadnika izloženoj prirodnim okolišnim uvjetima. Inokulirane su grane ili gornji dio debla trogodišnjih sadnica hrasta lužnjaka prosječne visine $181,95 \pm 21,65$ cm i promjera debla u razini tla $1,81 \pm 0,3$ cm. Sadnice su bile pozicionirane u gustom sklopu unutar gredice koja se uzdužno protezala u smjeru istok – zapad, zbog čega je najveći dio sadnica bio izložen ili južnoj ili sjevernoj ekspoziciji.

Deset sadnica je inokulirano micelijem gljive *Diaporthe eres* uzgojenim na PDA hranjivoj podlozi, a deset sterilnom PDA hranjivom podlogom radi kontrole rada. U obje kategorije sadnica, dakle i kod zaraženih i kod kontrolnih sadnica, je odabrano pet biljaka na južnoj i pet biljaka na sjevernoj ekspoziciji. Inokulirane biljke su bile međusobno udaljene najmanje 20 cm. Svaka inokulirana sadnica je obilježena ljepljivom trakom u boji i pripadajućim brojem (zaražene sadnice 1 – 10, kontrolne sadnice 11 – 20). Bijela traka je označavala kontrolne sadnice koje su inokulirane sterilnom hranjivom podlogom (Slika 5), a žutozelena traka zaražene sadnice koje su inokulirane micelijem gljive *Diaporthe eres*.



Slika 5. Primjer obilježavanja inokuliranih sadnica hrasta lužnjaka u prirodnim uvjetima

Sterilnim skalpelom je zarezan površinski dio kore dimenzija približno 3 x 3 mm koja je prethodno površinski sterilizirana prskanjem 96 % - tnim etanolom. Sterilnom pincetom je prethodno pripremljeni micelij uzet iz Petrijeve zdjelice te prislonjen na ranu odnosno tkivo do kojeg smo došli odstranjivanjem kore. Mjesto inokulacije je potom pažljivo obloženo parafilmskom trakom (Bemis Company, Inc.) koja je samoprijanjavajuća i štiti mjesto inokulacije od gubitka vlage te utjecaja vanjskih čimbenika. Oko mjesta inokulacije je dodatno omotana aluminijska folija radi stvaranja tamnih uvjeta. Pošto aluminijska folija stvara odsjaj i samim time privlači određene ptice, prvenstveno vrane, radi izbjegavanja moguće štete je obložena tzv. „pik trakom“ radi sprječavanja odsjaja. Između svake inokulacije alat je steriliziran uranjanjem u 96 % etanol i kratkim izlaganjem plamenu.

3.3. Inokulacija sadnica u kontroliranim uvjetima

Sadnice hrasta lužnjaka golog korijena (2 + 0) su sađene u kontejnere zapremnine 2 l u supstrat (Klasmann containersubstrat, bijeli i crni treset sa drvnim vlaknima) obogaćen sa 6 g gnojiva (Osmocote exact standard 5-6 M) po svakom kontejneru.

Ukupno 30 sadnica hrasta lužnjaka starosti 2+0 je inokulirano micelijem gljive *D. eres*, dok je 10 kontrolnih sadnica iste starosti inokulirano sterilnim komadićem PDA hranjive podloge (Slika 6). Stabljika sadnica je prebrisana papirnatim ubrusom natopljenim etanolom. Na visini od približno 5 cm je sterilnim skalpelom skinuta kora površine 2 x 2 mm, umetnut čep micelija ili sterilne podloge, te je ozljeda zatvorena parafilmskom trakom radi sprječavanja isušivanja i prekrivena aluminijskom folijom (Slika 7).

Zaražene sadnice su podvrgnute različitim režimima zalijevanja. Deset sadnica obilježenih rednim brojevima od P1 do P10 (P = poplava) je zalijevano tri puta tjedno (ponedjeljkom, srijedom i petkom) sa 100 ml vode, zbog čega su dna PVC kontejnera u kojima su se nalazile bila stalno uronjena u vodu do visine od približno 3 cm. Deset sadnica obilježenih brojevima od N11 do N20 (N = normala) je zalijevano jednom tjedno (ponedjeljkom) sa 100 ml vode. Deset sadnica obilježenih brojevima od S21 do S30 (S = suša) je zalijevano u dva navrata, 24. svibnja i 4. lipnja 2021. g. sa po 100 ml vode. Kontrolne sadnice su zalijevane jednom tjedno (ponedjeljkom) sa 100 ml vode.

Sadnice S21 do S30 su stavljene u komoru rasta (Kambič RK-500 CH) u Laboratorij za patologiju drveća gdje su se nalazile u sljedećim uvjetima: temperatura 30 °C, relativna vlažnost zraka 40 %, 12 sati u uvjetima svjetla (dan) te 12 sati u uvjetima tame (noć). Ostale sadnice su stavljene u komoru rasta (Kambič RK-980 CHCO2) u Laboratorij za šumsko sjemenarstvo i rasadničarstvo, gdje su bile izložene sljedećim uvjetima: temperatura 20 °C, relativna vlažnost zraka 80 %, 12 sati u uvjetima svjetla (dan) te 12 sati u uvjetima tame (noć). Sve sadnice su prije inokulacije tretirane kontaktnim fungicidom na bazi sumpora protiv hrastove pepelnice (*Microsphaera alphitoides*).

Različitim režimima zalijevanja zaraženih sadnica su imitirani uvjeti premale, optimalne i prekomjerne količine vode, kako bi se istražio potencijalni utjecaj ovog parametra na patogenost gljive *D. eres*.



Slika 6. Inokulacija sadnica u Laboratoriju za šumsko sjemenarstvo i rasadničarstvo



Slika 7. Primjer dovršenog postupka inokulacije sadnice hrasta lužnjaka gljivom *Diaporthe eres*

3.4. Praćenje razvoja simptoma na sadnicama

Sadnice su, u početnoj fazi razvoja, pregledavane svakih tjedan dana (u par navrata), međutim nakon određenog perioda izostanka, odnosno stagnacije simptoma, je zaključeno da nema potrebe za daljnjim učestalim pregledavanjem. Prvi simptomi uočeni su pet tjedana nakon obavljene inokulacije.

Šest tjedana nakon inokulacije je uslijedila priprema sadnica iz rasadnika za laboratorijsku obradu, odnosno izolaciju gljiva iz simptomatičnog tkiva na hranjive podloge. Sa zaraženih i kontrolnih sadnica su sterilnim alatom (škarama prskanim etanolom između svakog uzorkovanja), odrezani dijelovi grana duljine 20 – 30 cm, koji su u laboratoriju sterilnim alatom prikraćeni na duljinu 5 – 8 cm koja je obuhvaćala mjesto inokulacije u sredini (Slika 8).

Izolacija gljiva iz sadnica koje su bile u komorama je izvršena sedam tjedana nakon inokulacije. Sadnice su sterilnim škarama odrezane pri samoj bazi stabljike, odnosno u razini supstrata te im je odrezana krošnja. Uzorci su dodatno prikraćeni na duljinu 5 – 8 cm koja je obuhvaćala mjesto inokulacije u sredini prije daljnje obrade u laminarnom kabinetu za rad u atmosferi čistog zraka (u daljnjem tekstu: laminar).



Slika 8. Priprema uzoraka grana sadnica hrasta lužnjaka za laboratorijsku obradu

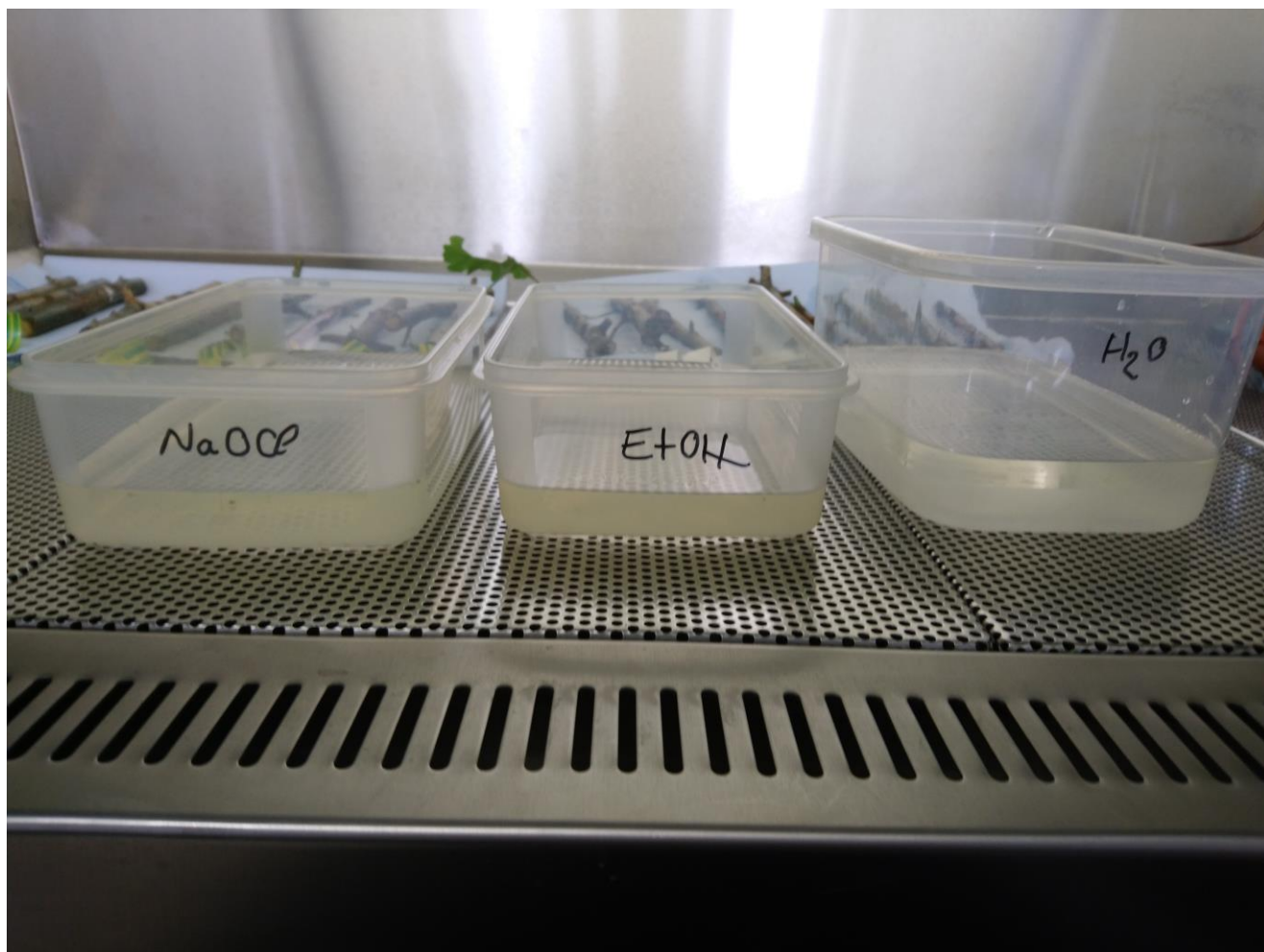
3.5. Izolacija micelija gljiva

Pripremljeni uzorci sadnica hrasta lužnjaka su premješteni u Laboratorij za patologiju drveća Zavoda za zaštitu šuma i lovno gospodarenje odmah nakon njihovog uzimanja iz rasadnika, odnosno iz komora rasta. Svi daljnji postupci obrade i izolacije vršeni su u laminaru što uvelike pomaže pri održavanju maksimalno sterilnih uvjeta rada (Slika 9). Radna površina i alat su sterilizirani 96 %-tnim etanolom i papirnatim ručnicima. Pribor, koji se sastojao od daske za rezanje, skalpela i pinceta, je prije korištenja izložen UV svjetlosti u laminaru u periodu od 30 minuta.



Slika 9. Rad u laminarnom kabinetu za rad u atmosferi čistog zraka (laminaru)

Prije postupka izolacije, svaki uzorak je površinski steriliziran papirnatim ubrusom prethodno natopljenim etanolom kako bi uklonili površinske nečistoće. Uzorci su pripremani u tri koraka, a to su: potapanje u dvije otopine, ispiranje i sušenje. Potapanje je vršeno u 0,5 %-tnom natrijevom hipokloritu (NaOCl) oko 10-15 sekundi, zatim 1 minutu u 96 %-tnom etanolu (EtOH), nakon čega je slijedilo ispiranje u destiliranoj sterilnoj vodi te na kraju odlaganje na papirnate ručnike kako bi se uzorci mogli u potpunosti osušiti (Slika 10).



Slika 10. Prikaz posuda u kojima je vršena površinska sterilizacija uzoraka za izolaciju micelija gljiva na hranjive podloge

Tako pripremljeni i prosušeni uzorci su u daljnjem procesu obrađivani na dasci za rezanje na način da je sterilnim skalpelom odstranjen dio zaraženog i zdravog tkiva koji se potom lagano postavljao na PDA hranjivu podlogu obogaćenu antibiotikom (streptomycin sulfat), u prethodno pripremljenim Petrijevim zdjelicama.

U svaku Petrijevu zdjelicu je stavljeno po 4 - 5 komadića tkiva raspoređeno tako da se u svaki kvadrant podloge postavi jedan komadić radi dovoljne količine prostora pri razvijanju micelija (Slika 11). Svaka Petrijeva zdjelica je označena na način da je napisan datum, redni broj uzorka (stabla) te ime i prezime radi lakšeg pronalaženja među ostalim uzorcima u laboratoriju (Slika 12). Petrijeve zdjelice sa komadićima tkiva (uzorcima) stavljene su u komoru rasta na inkubaciju u tamu i na temperaturu od 22 °C.



Slika 11. Prikaz razvijenih micelija gljiva iz komadića tkiva zaraženih grana hrasta lužnjaka



Slika 12. Primjer razvijenih micelija gljive *D. eres* i oznaka na Petrijevim zdjelicama

3.6. Presađivanje micelija radi dobivanja čistih kultura

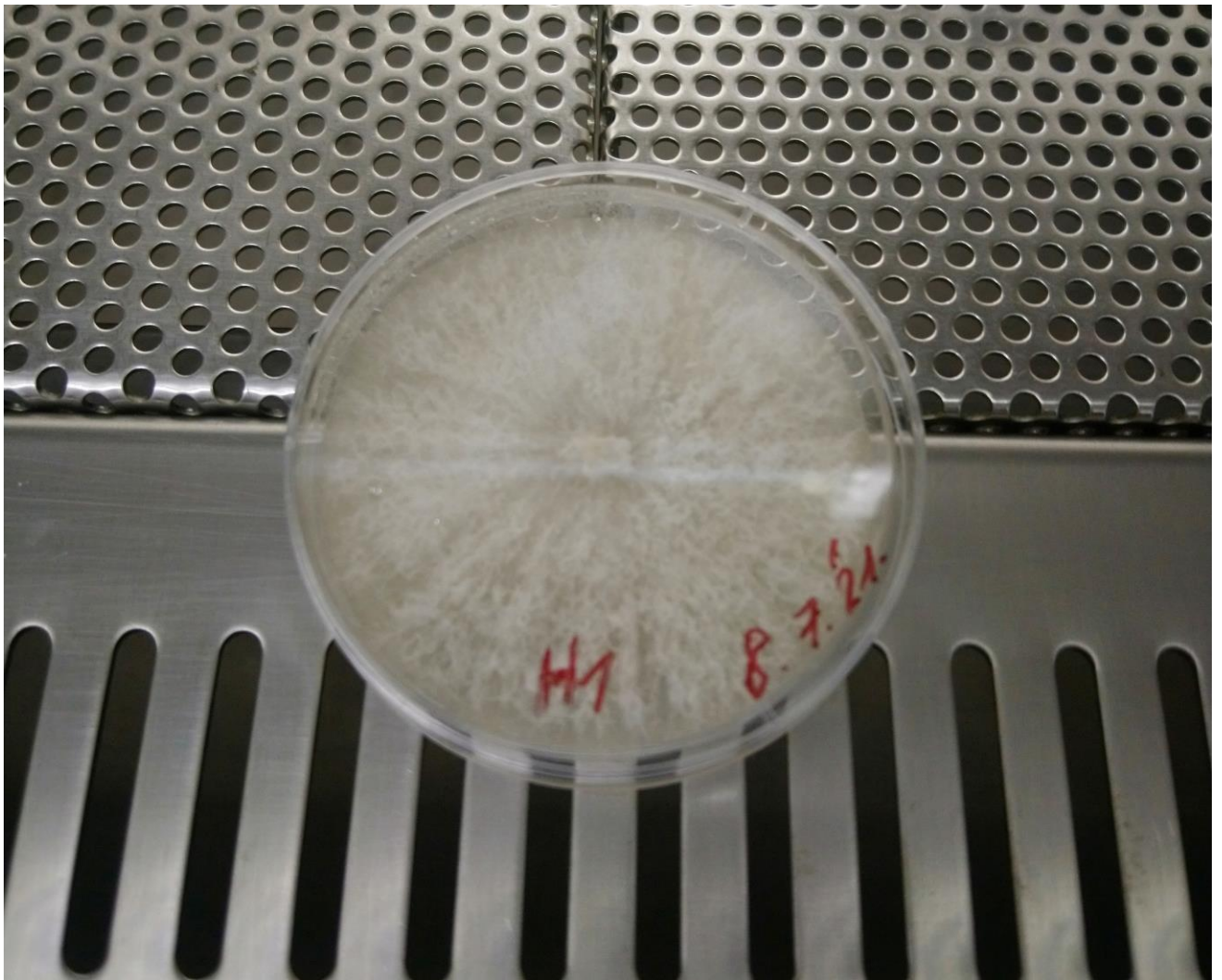
Prilikom ovoga postupka korišten je plamenik, 96 %-tni etanol te skalpel i pinceta. Prije svake upotrebe alat je uronjen u etanol i kratko izložen plamenu radi ostvarivanja sterilnih uvjeta prilikom rukovanja micelijima. Iz Petrijevih zdjelica sa razvijenim micelijima su sterilnim skalpelom i pincetom uzimani, sa aktivnog ruba rasta, komadići micelija veličine približno 0,5 centimetara te su potom lagano prislonjeni na PDA hranjivu podlogu u novu zasebnu Petrijevu zdjelicu promjera 55 mm (Slika 13).

Nakon perioda od šest dana su razvijene čiste kulture gljiva (Slika 14) koje su korištene za daljnju analizu.

Dobivene kulture micelija su u daljnjoj analizi identificirane na temelju morfoloških karakteristika.



Slika 13. Presađivanje dobivenih micelija radi dobivanja čistih kultura



Slika 14. Prikaz razvijene čiste kulture *Diaporthe eres*

4. Rezultati istraživanja

4.1. Simptomi na sadnicama iz rasadnika

Početne promjene na zaraženim sadnicama uočene su kao blage diskoloracije kore oko samog mjesta inokulacije (Slika 15). Diskoloracija / nekroza tkiva je pri svakom idućem pregledu sadnica zauzimala sve veću površinu, ali u granicama od svega 2 – 3 cm od mjesta inokulacije. Nekroza je bila vidljiva kao crni prsten oko mjesta inokulacije. U daljnjem periodu došlo je do blagog raspucavanja tkiva na mjestu inokulacije (Slika 16a). Simptomi u ovakvom obliku uočeni su pet tjedana nakon inokulacije. Skidanje kore sa mjesta inokulacije u laboratoriju je pokazalo da se nekroza proširila i u ksilem, ali prvenstveno samo u bijel, iznimno i u srž (Slika 17 i Slika 18). Kontrolne sadnice nisu pokazale nikakve promjene u boji, naprotiv, mjesta inokulacije su veoma uspješno kalusirala (Slika 16b). Iznimno je na kontrolnim sadnicama broj 1 i 3 uočen crni, odnosno smeđi prsten oko kalusnog tkiva (Slika 19).



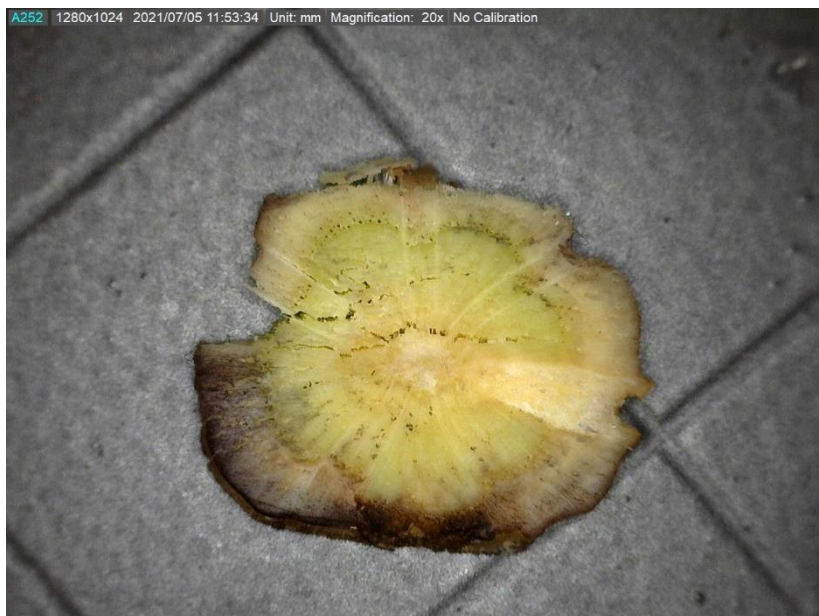
Slika 15. Izgled prvih simptoma na zaraženim sadnicama hrasta lužnjaka



Slika 16. Primjer izgleda mjesta inokulacije: a) crni nekrotični prsten na zaraženim sadnicama; b) kalusno tkivo na kontrolnim sadnicama



Slika 17. Prikaz dubine progresije gljive *Diaporthe eres* na uzdužnom presjeku zaražene grane hrasta lužnjaka



Slika 18. Prikaz dubine progresije gljive *Diaporthe eres* na poprečnom presjeku zaražene grane hrasta lužnjaka



Slika 19. Crni, odnosno smeđi prsten oko kalusnog tkiva uočeni na kontrolnim sadnicama broj 1 i broj 3

4.2. Simptomi na sadnicama iz komora rasta

Biljke zalijevane u normalnom režimu (N11-20), kao i biljke izložene prekomjernom zalijevanju (P1-10) imale su 1-2 milimetra proširenje nekroze kore na mjestu inokulacije (Slika 20). Nekroza je obuhvaćala samo koru, u rijetkim slučajevima je zahvatila i bijel. Sadnice izložene sušnim uvjetima (S21-30) su pokazivale nešto manje nekroze (samo kora) u odnosu na biljke tretirane poplavom i one podvrgnute normalnim uvjetima zalijevanja.

Kontrolne sadnice nisu imale nikakve diskoloracije, a na mjestu inokulacije biljka je u potpunosti kalusirala ranu (Slika 21).



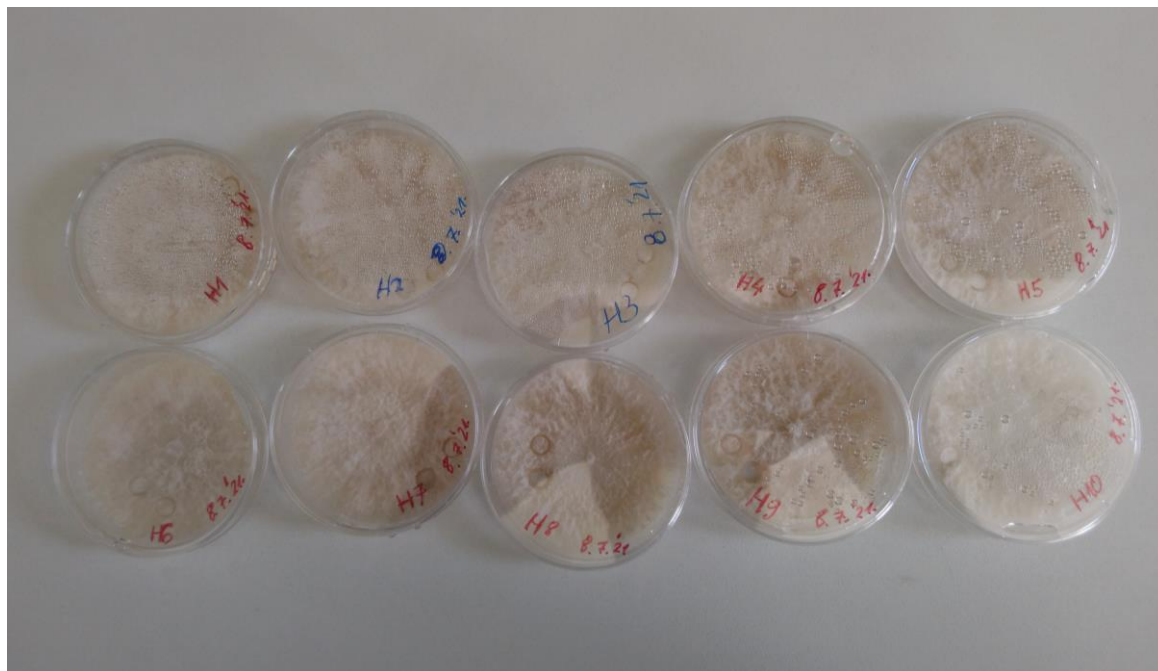
Slika 20. Prikaz izgleda nekroze oko mjesta inokulacije na sadnici izloženoj prekomjernom zalijevanju



Slika 21. Prikaz kalusiranog mjesta inokulacije na kontrolnoj sadnici

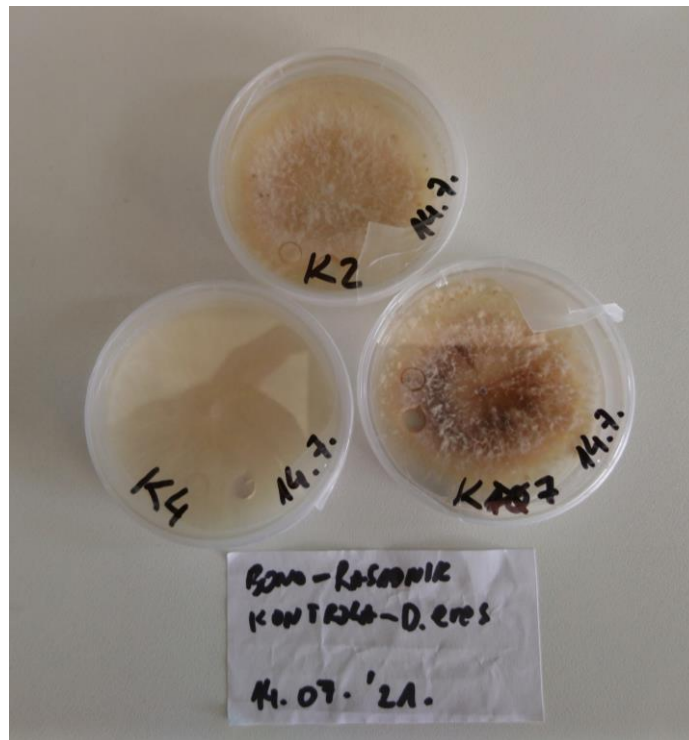
4.3. Izolirani miceliji gljiva iz tkiva oko mjesta inokulacije

Na temelju analize morfoloških karakteristika micelija utvrđeno je da svih deset čistih kultura izoliranih iz nekroza oko mjesta inokulacije na zaraženim sadnicama hrasta lužnjaka iz rasadnika pripada gljivi *D. eres* (Slika 22).



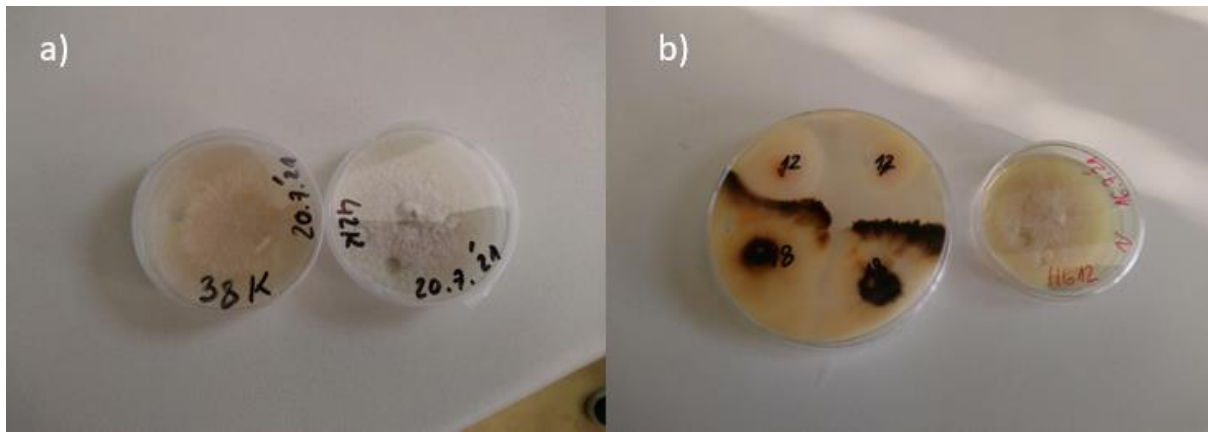
Slika 22. Prikaz izoliranih kultura micelija *Diaporthe eres* iz zaraženih sadnica hrasta lužnjaka iz rasadnika

Iz većine kontrolnih sadnica, njih 7 od 10, dobivene su kulture micelija koje po svojim morfološkim karakteristikama zasigurno ne pripadaju vrsti *Diaporthe eres*. Miceliji iz kontrolnih sadnica oznake K2, K4 i K7 (Slika 23) na temelju nekih morfoloških karakteristika nalikuju na *D. eres* te samim time ukazuju na mogućnost njene pojave, ali je potrebna molekularna analiza da bi se potvrdila prisutnost *D. eres*.



Slika 23. Prikaz izoliranih kultura micelija iz kontrolnih sadnica broj 2, broj 4 i broj 7, koji po morfološkim karakteristikama nalikuju vrsti *Diaporthe eres*

Što se tiče zaraženih sadnica iz komora rasta, od njih ukupno 30, iz 29 su izolirane čiste kulture micelija koje po svojim morfološkim karakteristikama pripadaju vrsti *Diaporthe eres*. Iz sadnice broj N12 su dobivena dva micelija koji zasigurno ne pripadaju rodu *Diaporthe* (Slika 24b). Iz većine (osam od 10) kontrolnih sadnica koje su čuvane u komori rasta, su izolacijom dobiveni miceliji koji ne pripadaju rodu *Diaporthe*. Iznimka su bile sadnice oznaka K38 i K42 iz kojih su dobiveni miceliji koji morfološki nalikuju gljivi *D. eres*, ali je za potvrdu potrebno provesti analizu njihove DNK (Slika 24a).



Slika 24. Izolirane kulture micelija iz sadnica čuvanih u komorama rasta: a) miceliji koji morfološki nalikuju gljivi *D. eres* dobiveni iz kontrolnih sadnica K38 i K42; b) miceliji dobiveni iz zaražene sadnice N12 koji zasigurno ne pripadaju rodu *Diaporthe*

5. RASPRAVA

Vrsta *Diaporthe eres* zabilježena je kroz niz istraživanja kao značajni patogen te ključni uzročnik odumiranja velikog broja vrsta, kako stabala i voćkarica, tako i poljoprivrednih kultura (Van Rensburg i sur. 2006). Prema Bastide i sur. (2017) u Francuskoj je na poljoprivrednim kulturama utvrđena kao glavni uzročnik sušenja i pojave jakih simptoma u obliku nekrotičnih lezija i crnih nekrotičnih mrlja na stabljikama gdje je daljnjim razvojem došlo do sušenja poljoprivrednih kultura čime je potvrđena značajna patogenost ove gljive.

Nakon šest, odnosno sedam tjedana inkubacije, na sadnicama su zamijećeni slabo razvijeni simptomi poput diskoloracije / nekroze koje su se raširile samo u uskom prstenu oko mjesta inokulacije, te u rijetkim primjerima raspucavanje tkiva biljke na samome mjestu inokulacije, što navodi na zaključak da je gljiva u ovome slučaju slabi patogen, najvjerojatnije oportunistički patogen koji je u slučaju odumiranja mladih sadnica hrasta lužnjaka u Gunji već bio prisutan u zdravom tkivu te intenzivnije simptome počeo uzrokovati tek nakon nekog drugog čimbenika. S obzirom na kratko trajanje pokusa, moguće je da bi gljiva u duljem vremenskom periodu izazvala intenzivnije simptome. Radi dobivanja pouzdanijih rezultata pokus bi trebalo provesti u duljem vremenskom periodu, što nažalost zbog tehničkih ograničenja u ovome slučaju nije bilo moguće.

Promatrajući dva paralelna pokusa, u prirodnim i kontroliranim uvjetima, mogu se uvidjeti određene razlike u razvoju patogene gljive *Diaporthe eres*. Uspoređujući razvoj simptoma biljaka iz rasadnika u odnosu na biljke u komorama rasta mogu se primijetiti razlike u boji na mjestu inokulacije. Na biljkama iz rasadnika se na mjestu inokulacije stvorio tamni obruč koji kod sadnica iz komore rasta nije izražen. Nadalje, kod biljaka iz komore rasta nije došlo do raspucavanja tkiva u odnosu na biljke iz rasadnika. Progresija gljive u prirodnim uvjetima, odnosno rasadniku, ukazuje na bržu pojavu prvih simptoma, a samim time i jači utjecaj gljive na inokulirano stablo u odnosu na biljke koje su se nalazile u komorama rasta. Uvjeti u komori, koji su u ovom slučaju bili pogodni za biljke, usporili su i ublažili progresiju gljive za razliku od prirodnih uvjeta u rasadniku. Biljka je u savršanim uvjetima vlage, temperature i svjetla odolijevala napadu gljive *D. eres*. Progresija gljive na mlađim, dvogodišnjim biljkama u komorama rasta tekla je sporije u odnosu na trogodišnje biljke koje su inokulirane u rasadniku. Međutim, kako su dvogodišnje i trogodišnje biljke bile u različitim uvjetima, nemoguće je zaključiti je li i starost biljaka utjecala na napredak gljive. Nadalje, prisutnost hrastove pepelnice (*Microsphaera alphitoides*) i hrastove mrežaste stjenice (*Corythucha arcuata*) na biljkama u rasadniku dodatno su mogli utjecati na pad vitaliteta tih sadnica i potaknuti brži razvoj

simptoma, odnosno napredak gljive u prirodnim uvjetima. Ovi rezultati potvrđuju tezu kako je *D. eres* oportunistički patogen koji izraženije simptome uzrokuje tek padom vitaliteta domaćina.

Rezultati dijela pokusa koji se odnosio na sadnice tretirane nedovoljnom količinom vode, a koji ukazuju da su sadnice u sušnim uvjetima razvile samo blage simptome, ne mogu se smatrati u potpunosti pouzdanima, jer je supstrat u kojeg su bile posađene zadržavao velike količine vode i samim time onemogućio stvaranje dovoljno suhih uvjeta za potrebe pokusa. Također jedan od problema je predstavljao kontejner u kojima su se nalazile biljke jer nije propuštao dovoljne količine vode, tako da željeni sušni uvjeti nisu uspješno imitirani.

Na sadnicama koje su izložene prekomjernom zalijevanju uočena je sporija progresija gljive u odnosu na sadnice inokulirane u rasadniku, a samim time i slabije razvijeni simptomi. Međutim, uspoređujući sadnice iz komore koje su tretirane prekomjernom zalijevanju i sadnice izložene suhim uvjetima može se zaključiti da su uvjeti za sadnice koje su prekomjerno zalijevane bili znatno teži zbog činjenice da se pogrešnim odabirom supstrata i kontejnera dovelo biljke predviđene suhim uvjetima u optimalnije uvjete od očekivanih što je dovelo do sporijeg razvoja simptoma.

Dobivene čiste kulture micelija kod biljaka iz rasadnika su na svih 10 zaraženih uzoraka bile jednake boje i teksture te se može zaključiti da se radi o gljivi *D. eres*, dok je kod zaraženih sadnica iz komora rasta iz 30 biljaka izolirano 29 čistih kultura micelija koje po svojim morfološkim karakteristikama pripadaju vrsti *Diaporthe eres*. Kod sadnice oznake N12, kod koje nije uspješno izolirana gljiva *D. eres*, nije zadovoljen četvrti Kochov postulat koji zahtijeva izolaciju izvornog specifičnog uzročnika bolesti (patogena) i njegovu identifikaciju iz inokuliranog domaćina. Budući da gljiva nije pokazala veliku agresivnost postoji mogućnost da se sadnica hrasta lužnjaka uspjela oduprijeti napadu. Također jedan od razloga može biti da je prisutnost ostalih endofitskih patogena u sadnici nadjačala širenje gljive *D. eres* te je za potvrdu potrebna dodatna analiza. S obzirom da je od ukupno 40 pokusnih sadnica iz njih 39 uspješno izolirana gljiva *D. eres* i da su na njima nastali određeni simptomi, zadovoljeni su treći i četvrti Kochov postulat, i ovaj pokus se može smatrati uspješnim.

Kod dvije kontrolne sadnice iz komora rasta oznaka K38 i K42 te tri kontrolne sadnice oznaka K2, K4 i K7 iz rasadnika postoji sumnja na prisutnost gljive *D. eres*, tj. na mogućnost da je došlo do kontaminacije alata prilikom postupka izolacije ili presađivanja. Međutim, činjenica da je gljiva *D. eres* endofit ukazuje na moguću prethodnu prisutnost gljive u nekim sadnicama što je jedan od razloga zašto su se u kontrolama mogli pojaviti miceliji nalik na *D. eres*. Potrebna je molekularna analiza navedenih micelija kako bi se sa sigurnošću potvrdilo radi li se zaista o gljivi *D. eres*, jer je zbog visoke morfološke sličnosti micelija također moguće da se radi o micelijima nekih drugih vrsta iz roda *Diaporthe*.

6. ZAKLJUČAK

Cilj ovoga istraživanja bio je utvrditi patogenost gljive *Diaporthe eres* ispunjavanjem Kochovih postulata. Iz svih deset zaraženih sadnica iz rasadnika, koje su rasle u prirodnim uvjetima, razvili su se simptomi iz kojih su, u daljnjoj obradi, uspješno izolirane čiste kulture micelija *Diaporthe eres*. Od 30 zaraženih sadnica koje su čuvane u kontroliranim uvjetima u komorama rasta, na svima su razvijeni određeni simptomi oko mjesta inokulacije, a gljiva *D. eres* je ponovno izolirana iz njih 29. Uz iznimku jedne zaražene sadnice iz koje je izoliran micelij neke druge vrste gljive, može se reći kako su Kochovi postulati zadovoljeni i kako gljiva *D. eres* može u određenim uvjetima i određenoj mjeri uzrokovati simptome na mladim biljkama hrasta lužnjaka, odnosno pokazivati određeni stupanj patogenosti.

Budući da gljiva, u oba pokusa, na mjestu inokulacije nije uznapredovala velikom brzinom, odnosno nije uzrokovala značajne simptome, može se zaključiti kako ipak ne spada u agresivne, već slabe patogene te oportunističke patogene. Tome u prilog idu i rezultati usporedbe dvaju pokusa, koji su pokazali da kontrolirani uvjeti u komorama rasta koji su pogodni za biljke (dovoljno vlage, povoljna temperatura, izostanak drugih bolesti i štetnika) usporavaju razvitak simptoma i daljnju progresiju gljive *Diaporthe eres*.

Radi otkrivanja ključnog uzročnika sušenja velike skupine stabala na području Gunje potrebno je uzeti u obzir ostale čimbenike koju su mogli utjecati i na bilo koji način ubrzati proces sušenja i naposljetku odumiranje stabala.

Uzimajući u obzir da je hrast lužnjak (*Quercus robur* L.) jedna od dominantnijih vrsta uz tok rijeke Save, te jedna od najznačajnijih vrsta na području Slavonije potrebno je češće provoditi ovakva istraživanja kako bi se u budućnosti moglo na vrijeme i preventivno reagirati.

7. LITERATURA

Arciuolo i sur. 2021.: Ecology of *Diaporthe eres*, the causal agent of hazelnut defects

Baumgartner i sur. 2013.: Morphological characteristics and pathogenicity of *Diaporthe eres* isolates to the fruit tree shoots

Bastide i sur. 2017.: Characterization of fungal pathogens (*Diaporthe angelicae* and *D. eres*) responsible for umbel browning and stem necrosis on carrot in France

Cardinaals i sur. 2018.: Pathogenicity of *Diaporthe* spp. on two blueberry cultivars (*Vaccinium corymbosum*)

Damijanić, D., 2021: Uloga gljiva u odumiranju hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L.) na području GJ Desićevo (šumarija Gunja, UŠP Vinkovci). Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet šumarstva i drvne tehnologije, 1 – 26.

Dubravac, T., 2010.: Hrast lužnjak u Hrvatskoj i Spačvanskom bazenu - važnost, povijest sušenja i dosadašnje spoznaje, Hrvatski šumarski institut, Zavod za uzgajanje šuma

Franjić, J., Škvorc, Ž., 2010.: Šumsko drveće i grmlje Hrvatske, Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet, Zagreb, str. 296

Hibbet i Taylor 2013.: Fungal Systematics: Is a New Age of Enlightenment at Hand? *Nature Reviews Microbiology*, 11, 129-133.

Hrašovec i sur. 2013.: Prvi nalaz hrastove mrežaste stjenice (*Corythucha arcuata*) u Hrvatskoj, *Šumarski list* br. (9-10), str. 499-503

Ivić i sur. 2018.: *Diaporthe eres* Nitschke Is the only *Diaporthe* species found on blueberry in Croatia

Kaliterna J., Miličević T., Cvjetković B., 2012.: Grapevine trunk diseases associated with fungi from the *Diaporthaceae* family in Croatian vineyards

Koch R. 1882.: Die Aetiologie der Tuberculose. (Nach einem in der physiologischen Gesellschaft zu Berlin am 24.März cr. gehaltenem Vortrage) Berliner klin. Wochenschr., 19 , str. 221-230

Lagier. J-C., Dubourg G., Amrane S., Raoult D., 2018.: Koch Postulate: Why Should we Grow Bacteria?

Lombard i sur. 2014.: Diaporthe species associated with Vaccinium, with specific reference to Europe

Rossmann i sur. 2014.: Recommendations of generic names in Diaporthales competing for protection or use

Thomidis T. i Michailides J. 2009.: Studies on Diaporthe eres as a New Pathogen of Peach Trees in Greece

Udayanga i sur. 2014.: Insights into the genus Diaporthe: phylogenetic species delimitation in the D. eres species complex

Ugarković D., Pleša. K.: Usporedba odumiranja stabala hrasta lužnjaka i poljskog jasena u odnosu na ekološku konstituciju Šumarski list, br. 5–6 (2017): str. 227–236

Van Rensburg i sur. 2006.: Resolving the complex of Diaporthe (Phomopsis) species occurring on Foeniculum vulgare in Portugal.

Vukelić, J., 2012.: Šumska vegetacija Hrvatske, Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet, Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb